



Ana Catarina Teixeira Carvalho

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Otimização do método de produção de Oxitetraciclina Cálcica e Limeciclina:

***Downscale* dos processos industriais e
desenvolvimento de novo método analítico**

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

Orientador: Doutor Carlos Sousa, Cipan

Coorientador: Professor Mário Eusébio, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Teresa Maria Casimiro Ribeiro, Professora
assistente do Departamento de Química da FCT/UNL

Arguente: Professor Doutor Rui Manuel Oliveira, Professor associado com
agregação do Departamento de Química da FCT/UNL

Vogal: Doutor Carlos Sousa, Diretor do setor de Investigação e
Desenvolvimento da Cipan

Ana Catarina Teixeira Carvalho

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Otimização do método de produção de
Oxitetraciclina Cálcica e Limeciclina:
Downscale dos processos industriais e
desenvolvimento de novo método analítico**

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

Orientador: Doutor Carlos Sousa, Cipan
Coorientador: Professor Mário Eusébio, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Teresa Maria Casimiro Ribeiro, Professora assistente
do Departamento de Química da FCT/UNL

Arguente: Professor Doutor Rui Manuel Oliveira, Professor associado com agregação
do Departamento de Química da FCT/UNL

Vogal: Doutor Carlos Sousa, Diretor do setor de Investigação e Desenvolvimento da
Cipan

Dezembro de 2020

Otimização do método de produção de Limeciclina e Oxitetraciclina Cálcica: *downscale* dos processos industriais e desenvolvimento de novo método analítico

Copyright © Ana Catarina Teixeira Carvalho, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologias e a Universidade Nova de Lisboa tem 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.

Agradecimentos

Quero agradecer a todos os professores que me acompanharam durante o percurso escolar, especialmente da FCT/UNL, contribuindo para que chegasse até aqui, à fase final do meu curso. Um especial obrigado à professora Helena Martins, pela sua amizade e ajuda durante o ensino secundário.

Estou extremamente agradecida pela oportunidade que a Cipan me proporcionou para a realização do estágio. Agradeço a todos os colegas da empresa, que sempre me ajudaram e contribuíram para o meu crescimento a nível pessoal e profissional.

Em particular, aos meus colegas do departamento de Investigação e Desenvolvimento, que durante estes meses me orientaram e foram a melhor equipa com que poderia trabalhar. Ao meu orientador Dr. Carlos Sousa, à Dra. Catarina Dias, ao Ricardo Mendes, Henrique Batista, João Chainho e José Luís, ajudaram-me em tudo, sempre com as melhores palavras e brincadeiras. Especialmente, agradeço à melhor preparadora de laboratório: a minha Aninhas, que me ajudou em tudo o que conseguia e se tornou numa grande amiga.

Não me esqueço também do Lino. Extremamente agradecida por toda a ajuda e amizade durante o trabalho no kilo-lab. Sei que será sempre uma pessoa com quem poderei contar.

Agradeço ao Exmo. Sr. Eng. Bruno Silvano, pela agradável surpresa de o conhecer melhor e pelas extraordinárias boleias e conversas até à Cipan. Sobretudo, por me ajudar e esperar por mim quando precisei.

Ao professor Mário Eusébio: agradeço não só toda a orientação e acompanhamento durante a elaboração deste trabalho e das cadeiras de Projeto, como também as conversas partilhadas, sempre com boa disposição. Não me esqueço da imagem que fez para colocar na minha dissertação. Obrigada por me ter permitido conhecer um professor Eusébio diferente: divertido, sensível, compreensivo e que tem o dobro do trabalho para ajudar os alunos.

À minha Carrilha: a melhor pessoa que tenho na minha vida. Graças a ele consegui estar onde estou hoje. Obrigada por seres o meu grande apoio todos os dias e me motivares constantemente.

Por fim, fico eternamente grata à minha família. Principalmente, à minha querida mãe Crumilda e aos meus avós, por terem investido na minha educação e formação. Mesmo não percebendo muitas vezes o que fazia e dizia, foram sempre o apoio que precisei. Aos meus amigos, que sempre me acompanharam. Obrigada a todos, pela vossa compreensão, amizade e por me incentivarem sempre a lutar pelos meus objetivos.

Resumo

A oxitetraciclina cálcica e a Limeciclina são ingredientes farmacêuticos ativos (API) produzidos na Cipan, possuindo processos de fabrico muito semelhantes entre si, sendo a precipitação o passo crítico nas respetivas sínteses.

Um dos principais objetivos deste projeto visa à otimização da síntese de oxitetraciclina cálcica de forma a obter valores percentuais de cálcio estáveis, dentro dos limites de especificação. Foram estudadas as seguintes variáveis: tempo de adição da solução precipitante durante a precipitação, eliminação de uma das etapas do processo e redução da concentração de solução precipitante adicionada. Verificou-se que adições mais lentas conduzem a uma menor percentagem de cálcio no produto, que a eliminação da etapa seria economicamente viável e que a redução da concentração de solução precipitante para uma proporção estequiométrica (2:1), ou intermédia (2:1,2), seria a solução ideal para otimizar esta síntese. Foi realizado o *scale-up* do processo otimizado. Verificou-se que a falta de semelhança geométrica entre equipamentos e a agitação do sistema, são fatores limitantes para obtenção de resultados reprodutíveis aos laboratoriais, pois limitam o crescimento do cristal.

Relativamente à Limeciclina, tem-se verificado que se trata de um produto pouco estável. De forma a aumentar o tamanho do cristal e diminuir a humidade do produto, aumentando a sua estabilidade, foram estudadas alterações físicas ao processo padrão na etapa de precipitação: temperatura, velocidade de agitação e tempo de adição da solução precipitante. Os lotes sintetizados foram posteriormente submetidos a condições de estabilidade. Constatou-se que a estabilidade do produto não é influenciada pelos fatores estudados, nem consequentemente, pelo tamanho de grão. No entanto, a estabilidade aumenta quando a Limeciclina possui valores de humidade inferiores. Este API não provou ter natureza higroscópica, pelo que a absorção de água também não influencia a sua estabilidade.

Foi desenvolvido um novo método analítico para estudo de Limeciclina por HPLC, do qual se obtém boa separação entre picos, com resoluções superiores a 1,5 ao utilizar uma coluna C18 monolítica e um modo de eluição de gradiente. As fases móveis utilizadas recorrem apenas a três solventes, sendo ainda, compatíveis com LC-MS, possibilitando a identificação de picos desconhecidos. Este método foi validado ao provar a sua especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

Palavras-chave: precipitação; cristalização; *scale-up*; HPLC; LC-MS; validação.

Abstract

Calcium oxytetracycline and Limecycline are active pharmaceutical ingredients (API) produced at Cipan, with manufacturing processes very similar to each other, with precipitation being the critical step in the respective syntheses.

One of the main objectives of this project is to optimize the synthesis of calcium oxytetracycline in order to obtain stable percentage values of calcium, within the specification limits. The following variables were studied: addition time of precipitating solution during precipitation, elimination of one of the process steps and reduction of the concentration of precipitating solution. It was found that slower additions lead to a lower percentage of calcium in the product, that the elimination of the step would be economically viable and that the reduction of the concentration of precipitating solution to a stoichiometric ratio (2:1), or intermediate (2:1,2), would be the ideal solution to optimize this synthesis. The optimized process was scaled up. It was found that the lack of geometric similarity between equipments and the agitation of the system, are limiting factors for obtaining reproducible results to laboratories, as they limit the growth of the crystal.

Regarding Limecycline, it has been found that it is an unstable product. In order to increase the size of the crystal and decrease the humidity of the product, increasing its stability, physical changes to the standard process were studied in the precipitation stage: temperature, stirring speed and addition time of precipitating solution. The synthesized batches were subsequently submitted to stability conditions. It was found that the stability of the product is not influenced by the factors studied, nor, consequently, by the grain size. However, stability increases when Limecycline has lower humidity values. This API has not proven to be hygroscopic in nature, so water absorption does not influence its stability either.

A new analytical method has been developed to study Limecycline by HPLC, from which good separation between peaks is obtained, with resolutions greater than 1.5 when using a monolithic C18 column and a gradient elution mode. The mobile phases used use only three solvents, and are still compatible with LC-MS, allowing the identification of unknown peaks. This method was validated by proving its specificity, linearity, precision and accuracy.

Keywords: precipitation; crystallization; scale-up; HPLC; LC-MS; validation.

Índice

1. Enquadramento e motivação	1
1.1 Objetivos.....	3
2. Introdução.....	5
2.1 Tetraciclina	5
2.2 Oxitetraciclina cálcica	6
2.3 Limeciclina.....	8
2.4 Cristalização / Precipitação	10
2.5 <i>Downscale</i> / <i>Scale-up</i>	13
2.6 Desenho de experiências (DOE).....	16
2.7 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)	18
2.8 Desenvolvimento de método analítico para HPLC de fase reversa	25
2.9 Validação de métodos analíticos.....	27
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1 Otimização do processo de produção de Oxitetraciclina cálcica	29
3.1.1 Aumento de escala.....	32
3.2 Desenvolvimento de método analítico para estudo da Limeciclina	34
3.2.1 Validação do método analítico	37
3.3 Otimização do processo de produção de Limeciclina.....	44
4. Apresentação e Discussão de Resultados	49
4.1 Otimização do processo de produção de Oxitetraciclina cálcica	49
4.1.1 Aumento de escala.....	54
4.2 Desenvolvimento de método analítico para estudo da Limeciclina	57
4.2.1 Desenvolvimento do novo método analítico	57
4.2.2 Estudo da cinética de hidrólise da Limeciclina.....	69
4.2.3 Validação do método analítico desenvolvido	72
4.2.4 Análise em LC-MS.....	81
4.3 Otimização do processo de produção de Limeciclina.....	82
5. Conclusões e propostas de trabalho futuro	97
Referências Bibliográficas	101
Anexos	107
Anexo A: Técnica de preparação de oxitetraciclina cálcica à escala laboratorial	107
Anexo B: Técnica de preparação de Limeciclina à escala laboratorial.....	109
Anexo C: Resultados referentes à otimização de oxitetraciclina cálcica	111
Anexo D: Planeamento do Desenho de experiências	114
Anexo E: Fórmulas e elaboração de tabelas para estudo do DOE	115
Anexo F: Resultados do DOE.....	121
Anexo G: Análise do tamanho de grão.....	131

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Perfil cromatográfico de Limeciclina, obtido através do método compendial da FE.	2
Figura 2.1 - Estrutura geral das tetraciclina.	5
Figura 2.2 - Esquema reacional de obtenção de oxitetraclina cálcica.	6
Figura 2.3 - Equilíbrio entre as estruturas zwitterionica e não ionizada da oxitetraclina.	6
Figura 2.4 - Produtos de degradação de oxitetraclina sob condições ácidas.	7
Figura 2.5 - Esquema reacional de obtenção de Limeciclina.	8
Figura 2.6 - Tetraciclina e respetivos produtos de degradação por epimerização e desidratação.	9
Figura 2.7 - Diagrama de solubilidade.	10
Figura 2.8 - Diagrama de energia de ativação no processo de nucleação.	11
Figura 2.9 - Tanque de agitação equipado com baffles. Nomenclatura das respetivas dimensões.	13
Figura 2.10 - Esquema de abordagem para aplicação de DOE.	16
Figura 2.11 - Esquema de um sistema de HPLC.	19
Figura 2.12 - Representação da fase estacionária de uma coluna cromatográfica.	21
Figura 2.13 - Esquema de funcionamento de um detetor UV-PDA.	23
Figura 2.14 - Representação de um sistema LC-MS.	24
Figura 3.1 - Montagem da etapa de precipitação.	29
Figura 3.2 - Representação esquemática do procedimento para produção de oxitetraclina cálcica.	31
Figura 3.3 - Esquema temporal das alterações feitas para oxitetraclina cálcica.	32
Figura 3.4 - Equipamento de Kilo-lab utilizado no processo otimizado de oxitetraclina cálcica.	32
Figura 3.5 - Reator de 20L de vidro, equipado com uma hélice: RAP2751.	33
Figura 3.6 - Filtro Nutsche com agitação mecânica: FMP2751.	33
Figura 3.7 - Representação esquemática do procedimento interno Cipan para produção de Limeciclina.	45
Figura 4.1 - Média dos resultados de %cálcio, para alteração do tempo de adição Reagente B.	50
Figura 4.2 - Proposta de sequência de reação de oxitetraclina com cálcio.	50
Figura 4.3 - Representação gráfica dos resultados de IAL, para cada ensaio sem A.	52
Figura 4.4 - Resultados de doseamento de oxitetraclina cálcica, para cada ensaio sem A.	52
Figura 4.5 - Resultados de %Cálcio, para cada ensaio sem A.	52
Figura 4.6 - Resultados de %cálcio, para Reagente A:Reagente B na proporção estequiométrica 2:1.	53
Figura 4.7 - Resultados de %cálcio, para Reagente A:Reagente B na proporção 2:1,2.	54
Figura 4.8 - Cromatograma obtido ao utilizar as condições cromatográficas de partida.	57
Figura 4.9 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 1ª fase de testes.	58
Figura 4.10 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 2ª fase de testes.	60
Figura 4.11 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 3ª fase de testes.	61
Figura 4.12 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 4ª fase de testes.	63
Figura 4.13 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 5ª fase de testes.	65
Figura 4.14 - Cromatogramas obtidos para as repetições da experiência 24.	66
Figura 4.15 - Cromatogramas obtidos para as repetições da experiência 25.	66
Figura 4.16 - Perfil cromatográfico típico do padrão de Reagente C.	69
Figura 4.17 - Perfil cromatográfico típico de uma amostra de Limeciclina.	69
Figura 4.18 - Representação gráfica da cinética de hidrólise de Limeciclina.	70
Figura 4.19 - Resultados do teste F para a %PC em t=0 e t=2 minutos.	71
Figura 4.20 - Resultados do teste T para a %PC em t=0 e t=2 minutos.	72
Figura 4.21 - Cromatograma de uma mistura complexa de impurezas conhecidas.	73
Figura 4.22 - Representação gráfica da reta de calibração de Reagente C.	74
Figura 4.23 - Dispersão de resíduos para análise da linearidade de tetraciclina.	75
Figura 4.24 - Cromatograma de análise de Limeciclina em LC-MS.	81
Figura 4.25 - Variação de %PC de limeciclina de doseamento de impurezas totais, após estabilidade.	90
Figura 4.26 - Representação gráfica dos resultados da distribuição de tamanho em volume.	91
Figura 4.27 - Representação esquemática dos métodos de secagem na síntese de Limeciclina.	92
Figura 4.28 - Representação gráfica dos valores percentuais de humidade dos lotes de Limeciclina.	92
Figura 4.29 - Variação de %PC de limeciclina e do doseamento de imp. totais, em função da humidade.	93
Figura 4.30 - Cromatograma de Limeciclina obtida pelo processo padrão vs. Reagente H.	93
Figura 4.31 - Cromatograma de Limeciclina obtida pelo processo padrão vs. Reag. H, após estabilidade.	94
Figura 4.32 - Representação gráfica da variação de massa de Limeciclina.	95

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Aditivos comuns em HPLC e respetiva compatibilidade com LC-MS.....	26
Tabela 3.1 - Equipamento utilizado em cada etapa do processo nos ensaios do Kilo-lab.	33
Tabela 3.2 - Condições cromatográficas de partida para do novo método de Limeciclina.....	35
Tabela 3.3 - Condições de realização de cada experiência de desenvolvimento de método analítico	36
Tabela 3.4 - Descrição dos fatores e respetivos níveis utilizados no DOE.....	46
Tabela 4.1 – Limites de especificação da oxitetraciclina cálcica, de acordo com a BP.....	49
Tabela 4.2 - Valores de %cálcio correspondente a cada ensaio com diferentes tempos de adição	49
Tabela 4.3 – Dimensões e condições operacionais da etapa de precipitação no kilo-lab vs. laboratório...55	55
Tabela 4.4 – Resultados dos parâmetros de especificação obtidos nos ensaios de aumento de escala...56	56
Tabela 4.5 - Características de cada experiência, com vista a seleção da fase móvel aquosa.	58
Tabela 4.6 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 1ª fase de testes	59
Tabela 4.7 - Características de cada experiência, com vista à seleção do diluente.....	59
Tabela 4.8 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 2ª fase de testes.	60
Tabela 4.9 - Características de cada experiência, com vista a alteração da fase móvel orgânica.....	61
Tabela 4.10 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 3ª fase de testes.	62
Tabela 4.11 - Características de cada experiência, com vista a alteração do fluxo.	63
Tabela 4.12 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 4ª fase de testes.	64
Tabela 4.13 - Características de cada experiência, com vista a alteração do gradiente.	64
Tabela 4.14 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 5ª fase de testes.	65
Tabela 4.15 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para repetição de experiência 67	67
Tabela 4.16 - Parâmetros do novo método analítico desenvolvido, para o estudo de Limeciclina.....	67
Tabela 4.17 - Adequabilidade do sistema.	68
Tabela 4.18 - Soluções-mãe preparadas para a linearidade.....	73
Tabela 4.19 - Soluções diluídas preparadas para a linearidade.....	74
Tabela 4.20 - Valores obtidos para os parâmetros do teste de Mandel.	75
Tabela 4.21 - Resultados relativos ao teste de Rikilt.....	76
Tabela 4.22 - Resultados do teste de homogeneidade de variâncias.	76
Tabela 4.23 - resultados obtidos para os limites de deteção e de quantificação.....	76
Tabela 4.24 - Solução padrão de trabalho, preparada para a repetibilidade pelo analista 1, no dia A.....	77
Tabela 4.25 - Soluções repetibilidade de Reagente C	77
Tabela 4.26 - Solução padrão de trabalho, preparada para a precisão intermédia pelo analista 2.....	78
Tabela 4.27 - Soluções de precisão intermédia de Reagente C.....	78
Tabela 4.28 - Resultados do limite de repetibilidade e do coeficiente de variação.	79
Tabela 4.29 - Resultados do teste F obtidos por Excel, para os valores de %PC.....	79
Tabela 4.30 - Resultados do teste T obtidos por Excel, para os valores de %P	80
Tabela 4.31 - Solução padrão de trabalho, preparada para avaliar a exatidão do método	80
Tabela 4.32 - Soluções de Reagente C preparadas a 3 níveis	81
Tabela 4.33 - Identificação dos compostos de Limeciclina através de LC-MS.....	82
Tabela 4.34 - Tabela ANOVA - %PC de limeciclina.	83
Tabela 4.35 - Tabela ANOVA condensada - %PC de limeciclina.....	84
Tabela 4.36 - Melhores níveis - %PC de limeciclina.....	84
Tabela 4.37 – Tabela ANOVA - Doseamento de impurezas totais.....	85
Tabela 4.38 - Tabela ANOVA condensada - Doseamento de impurezas totais.	85
Tabela 4.39 - Melhores níveis - Doseamento de impurezas totais.	86
Tabela 4.40 - ANOVA – Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.	86
Tabela 4.41 - ANOVA condensada - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.....	86
Tabela 4.42 – Melhores níveis – Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.	87
Tabela 4.43 - ANOVA – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.	87
Tabela 4.44 - ANOVA condensada – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.	88
Tabela 4.45 – Melhores níveis – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.	88
Tabela 4.46 - Conclusão da escolha dos melhores níveis dos fatores.....	89
Tabela 4.47 - Descrição dos melhores níveis que conduzem à otimização do processo de Limeciclina. ..	89
Tabela 4.48 - Valor percentual observado na diminuição de limeciclina e aumento de impurezas.....	95

Lista de siglas, acrónimos e designações

API – *Active pharmaceutical ingredient*: Ingrediente farmacêutico ativo

BP – *British pharmacopoeia*: Farmacopeia britânica

CDMO - *contract development and manufacturing organization*

CQ – Controlo de Qualidade

DMF – *Drug Master File*

FDA – *Food and Drug Administration*

FE – Farmacopeia Europeia

FR – Fator de resposta

GMP – *Good Manufacturing Practice*

HPLC – *High performance liquid chromatography*: Cromatografia líquida de alta eficiência

IAL – Impurezas absorventes de luz

LCQ – Laboratório de Controlo de Qualidade

LC-MS - *Mass spectrometry for liquid chromatography*: Espetrometria de massa para cromatografia líquida

LIE – Limite inferior de especificação

Limeciclina – Refere-se ao composto preparado, tal como obtido e vendido

limeciclina – Refere-se à molécula em particular

LSE – Limite superior de especificação

MS – *Mass spectrometry*: Espetrometria de massa

Oxi.Ca – Oxitetraciclina cálcica

RT – *Retention time*: Tempo de retenção

RRT – *Relative retention time*: Tempo de retenção relativo

TNE – Transformações Não Estéreis

UHPLC – *Ultra high performance liquid chromatograph*: Cromatografia líquida de ultra alta eficiência

%PC – Percentagem de pureza cromatográfica

%RSD - *Relative Standard Deviation* – Desvio padrão relativo percentual

Enquadramento e motivação

A Cipan – Companhia Industrial de Produção de Antibióticos - é uma empresa do grupo SUANFARMA que se dedica principalmente à pesquisa, desenvolvimento e produção de ingredientes farmacêuticos ativos (API) e intermediários avançados, tendo também um grande foco na produção de antibióticos por fermentação e síntese química [1]. Muito recentemente tem-se afirmado também como uma CDMO (*contract development and manufacturing organization*).

Atualmente, o portefólio de produtos da empresa é composto por APIs e matérias-primas para produção de APIs, como o cloridrato de minociclina, a Limeciclina, base e cloridrato de tetraciclina, base e cloridrato de Sanciclina, oxitetraciclina cálcica e omadaciclina [2].

O presente projeto surge com o objetivo de otimizar o processo de produção da oxitetraciclina cálcica e da Limeciclina, cuja produção industrial é da responsabilidade do setor das Transformações Não Estéreis (TNE).

Comparativamente com os restantes APIs vendidos pela Cipan, a oxitetraciclina cálcica é a que apresenta menor quantidade produzida anualmente, com uma produção média anual de 600 kg por cada campanha de venda. Este valor deve-se ao facto de se tratar de um princípio ativo com pouca procura, sendo o Reino Unido o seu único mercado. Desta forma, existem apenas entre uma a duas campanhas anuais (ou a cada dois anos) na Cipan, sendo esta a única empresa produtora deste antibiótico.

De acordo com o processo atual, a oxitetraciclina cálcica é obtida através de uma reação de complexação da oxitetraciclina com o cálcio, obtida por precipitação entre Reagente A e Reagente B. O seu processo de produção é bastante empírico, não tendo existido desenvolvimentos no seu método de fabrico ao longo dos anos. Como tal, desde o início da sua produção que um dos parâmetros de especificação, o teor percentual de cálcio, apresenta valores fora dos limites da especificação estabelecidos. Este problema conduz a custos adicionais para a empresa, visto que o produto necessita de ser reprocessado. Desta forma, um dos principais objetivos deste trabalho visa à otimização da síntese deste API de forma a aumentar a sua qualidade, com valores percentuais de cálcio estáveis, obtendo um produto final que cumpra os limites da especificação em todos os parâmetros.

Relativamente à Limeciclina, com uma produção média anual de 50 toneladas por ano na Cipan, esta é obtida ao combinar Reagente C com Reagente D, na presença de Reagente E e Reagente F [3]. Tal como acontece com a oxitetraciclina cálcica, também o processo de produção deste API é bastante empírico. Ainda hoje, não são claras informações fundamentais, como a composição, estrutura e caracterização da Limeciclina. Adicionalmente, tem-se verificado que se trata de um produto instável. Ou seja, no qual se verifica, ao longo do tempo após a sua produção, o aumento de impurezas, assim como reprovação de determinados parâmetros da especificação

que se encontravam inicialmente cumpridos, tais como, principalmente: doseamento em limeciclina, doseamento de impurezas e impurezas absorventes de luz (IAL).

Existe a hipótese da origem da instabilidade da Limeciclina estar associada à absorção de água por parte deste antibiótico, ao facto desta se tratar de um pó muito fino e, adicionalmente, por ser produzido com uma percentagem de humidade significativa. Pretende-se aumentar o mercado deste produto para países com condições meteorológicas mais quentes e húmidas, onde a sua estabilidade se prevê ser muito difícil por tempos razoáveis. Desta forma, torna-se fundamental a melhoria do seu processo de produção que conduza ao aumento da sua estabilidade, principalmente neste tipo de condições meteorológicas.

O doseamento em Limeciclina, assim como a quantificação de substâncias relacionadas, é obtido por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) de acordo com o método compendial da FE (Farmacopeia Europeia). No entanto, este método apresenta limitações, na medida em que não analisa limeciclina. A limeciclina é totalmente hidrolisada em tetraciclina e, seguidamente, analisa-se apenas tetraciclina (**Figura 1.1**) [4]. Este produto é quantificado como sendo Limeciclina, tendo em conta as respetivas massas molares.

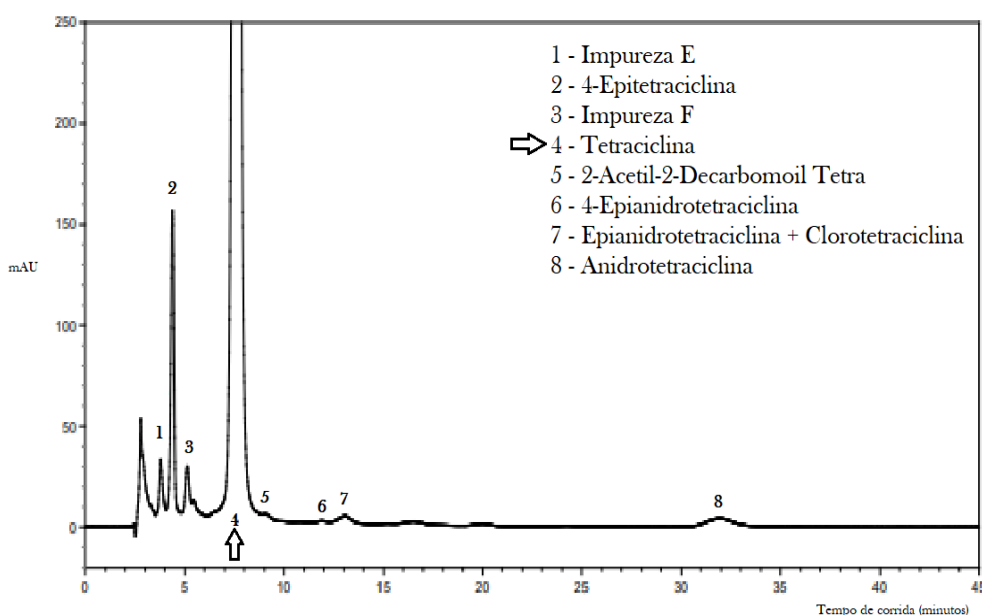


Figura 0.1 - Perfil cromatográfico de Limeciclina, obtido através do método compendial da FE para doseamento de Limeciclina e substâncias relacionadas por HPLC. Adaptado de: BP 2016 [4].

Ou seja, não é possível, com este método, visualizar o pico da limeciclina no cromatograma, dificultando assim a verificação de um possível doseamento inferior ao esperado, associado a esta molécula em particular, presente nos lotes de produção de Limeciclina.

Embora se consiga calcular as percentagens mássicas de limeciclina e de tetraciclina presentes na amostra com o método compendial, na realidade, a quantidade total de tetraciclina quantificada é resultante da hidrólise de limeciclina. Assim, como qualquer outro composto presente na amostra que hidrolise em tetraciclina, poderá ser inadequadamente quantificado

como limeciclina, contribuindo assim para um erro associado ao cálculo das respetivas percentagens mássicas.

Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de um novo método analítico que permita o estudo de Limeciclina, de onde seja possível determinar as purezas cromatográficas associadas aos compostos presentes no produto final. Pretende-se ainda, comparativamente ao método compendial, a diminuição da quantidade de solventes utilizados, a diminuição do tempo de análise (de modo também a limitar a hidrólise de limeciclina em tetraciclina) e a compatibilidade com espetrometria de massa (LC-MS), de forma a identificar possíveis substâncias presentes na Limeciclina, que possam causar variabilidade no processo.

1.1 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Realizar um *downscale* da produção para escala laboratorial, tanto de oxitetraciclina cálcica, como de Limeciclina. Ou seja, tenciona-se mimetizar o mais possível a produção destes compostos numa escala laboratorial para que, seguidamente, sejam estudadas possíveis alterações ao processo padrão que conduzam:
 - No caso da oxitetraciclina cálcica, a um produto final com valores percentuais de cálcio estáveis, dentro dos limites da especificação, assim como os restantes parâmetros. Após alcançar este objetivo, pretende-se realizar o *scale-up* do respetivo processo otimizado.
 - No caso da Limeciclina, a um produto com menor percentagem de humidade e maior estabilidade, com recurso a um desenho de experiências (DOE).
- Desenvolvimento e validação de um novo método analítico para o estudo de Limeciclina, do qual se obtém boa separação entre picos. Tenciona-se ainda que a fase móvel a desenvolver seja compatível com sistemas de deteção por LC-MS.

2. Introdução

2.1 Tetraciclinas

Apesar de atualmente já serem obtidas sinteticamente, as tetraciclinas são uma família de antibióticos provenientes da fermentação de bactérias presentes no solo, nomeadamente, estirpes de *Streptomyces aureofaciens*. Para além de terem ótimas propriedades de difusão, tanto tecidual como intracelular, são também conhecidas pela sua atividade no tratamento de um largo espetro de bactérias, micoplasmas e alguns protozoários [5,6]. As tetraciclinas atuam enquanto antibióticos bacteriostáticos, ou seja, não eliminam necessariamente as bactérias, mas, limitam o seu crescimento ao inibir a síntese proteica [7].

São denominadas de tetraciclinas pois são compostas por quatro anéis fundidos, cuja estrutura é dividida numa região modificável e não modificável (**Figura 2.1**). Os grupos funcionais específicos são necessários para a atividade antimicrobiana, pelo que a sua remoção ou modificação, afeta negativamente a farmacocinética [8]. O facto de existir nestas moléculas, uma região capaz de ser modificada através de semissíntese, dando origem a diferentes tetraciclinas com diferentes atividades antibióticas, torna-as bastante versáteis, na medida em que podem combater a resistência adquirida por muitos microrganismos [9].

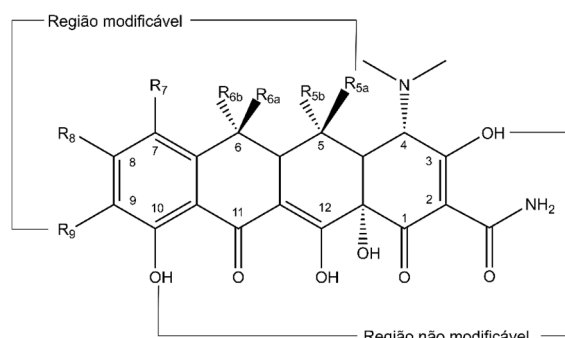


Figura 2.1 - Estrutura geral das tetraciclinas com identificação das respetivas regiões: modificável e não modificável.

As tetraciclinas estão divididas essencialmente em três gerações. Os primeiros destes compostos a serem descobertos, provenientes da fermentação das bactérias, são denominadas de tetraciclinas de 1^a geração, onde se inclui a oxitetraciclina [10].

Com o objetivo de aumentar a adsorção oral, foram realizadas experiências para verificar a solubilidade de tetraciclinas em água. Desta forma, surgiu a 2^a geração de tetraciclinas. Esta geração é definida pelo desenvolvimento de tetraciclinas semissintéticas, tais como a Limeciclina.

O aumento da resistência bacteriana às tetraciclinas existentes tornou-as menos eficazes, pelo que foi necessário o desenvolvimento da 3^a geração de tetraciclinas, especialmente criadas para superar os mecanismos de resistência. Ou seja, a 3^a geração é definida por tetraciclinas com modificação química de tetraciclinas de 1^a ou 2^a geração [10,11].

2.2 Oxitetraciclina cálcica

A oxitetraciclina cálcica é o sal de cálcio da oxitetraciclina, sendo a oxitetraciclina um derivado da tetraciclina, com ações e utilizações semelhantes. Estas moléculas diferem entre si devido à presença de um grupo OH no carbono 5 de oxitetraciclina [12].

Trata-se de um pó cristalino amarelo claro, tipicamente aplicado em combinação com outros agentes, numa variedade de gotas para os olhos e ouvidos, pomadas, cremes e sprays [13]. Como um antibiótico de amplo espectro, tem sido usado em aplicações clínicas para o tratamento ou prevenção de infeções na produção de bovinos, suínos, aves e peixes [14].

Este produto é obtido através de uma reação entre Reagente A e Reagente B, permitindo a complexação da oxitetraciclina com o íão cálcio (**Figura 2.2**). O produto desta reação detém boa solubilidade e estabilidade química [14].

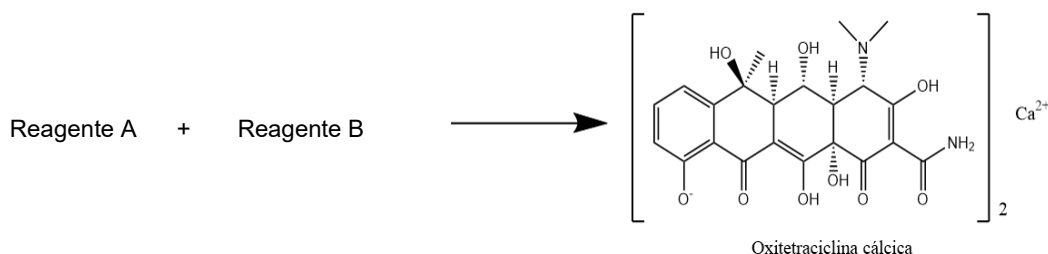


Figura 2.2 – Esquema reacional de obtenção de oxitetraciclina cálcica.

Estudos realizados por Hughes et al. (1979) [15] demonstraram que a base livre de oxitetraciclina pode adotar duas estruturas químicas bem definidas: *zwitterionica* – oxitetraciclina ($\pm$), e não ionizada - oxitetraciclina (0). As duas formas mostram conformação molecular específica, mesmo quando os substituintes, simetria do cristal e ligações de hidrogênio intermoleculares diferem. A forma *zwitterionica* parece ser a forma predominante mesmo quando pequenas concentrações de água estão presentes. As duas estruturas podem ter interpretadas em termos de equilíbrio dependente de solvente [16] (**Figura 2.3**).

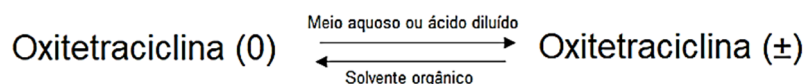


Figura 2.3 – Equilíbrio entre as estruturas *zwitterionica* e não ionizada da oxitetraciclina, dependente do solvente. Adaptado de Hughes et al. (1979) [15].

Para além dos mecanismos de degradação frequentes em tetraciclina, como epimerização e desidratação [17], a oxitetraciclina também se degrada em α -apo-oxitetraciclina e β -apo-oxitetraciclina (**Figura 2.4**), sob condições ácidas. Estes produtos de degradação são formulados como lactonas de estequiometria desconhecida [18].

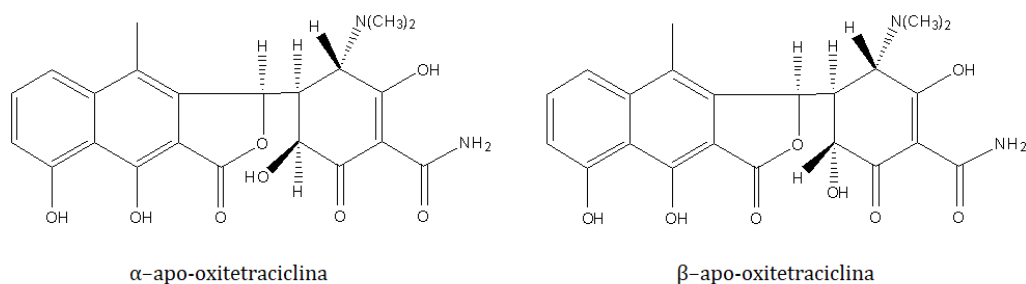


Figura 2.4 - Produtos de degradação de oxitetraciclina sob condições ácidas.

Uma investigação relativa à localização dos centros de complexação de íons de cálcio na oxitetraciclina foi desenvolvida por Newman et al. (1972) [19]. Foi estudada a formação destes complexos através de espectros de dicroísmo circular, tanto em solução aquosa com pH neutro, como em metanol 90%. Os autores concluíram que o complexo formado em metanol 90% entre cálcio e oxitetraciclina, cumpre uma proporção de 2:1, respetivamente. A formação deste complexo 2:1 foi muito favorável, exigindo apenas quantidades estequiométricas de cálcio e de oxitetraciclina para atingir 100% de complexação. Relatam ainda que os íons de cálcio se encontram associados ao oxigénio nos respetivos carbonos: C10, C11 e em C12, C1.

A formação do complexo de cálcio em solução aquosa de pH neutro não foi tão favorável como em metanol 90%. Foi necessária a adição em excesso de Ca^{2+} de modo a forçar a associação do primeiro catião aos oxigénios no local C10, C11, e o segundo catião não foi adicionado em nenhuma extensão significativa. Aparentemente, em solução aquosa, a remoção das moléculas de água da esfera de hidratação do ião metálico é mais exigente, dificultando a ligação dos íons de cálcio na formação do complexo [19].

Anos depois, Lambs et al. (1988) [12] ampliaram a informação relativamente ao modo como ocorre a complexação entre oxitetraciclina e cálcio. Observaram a coexistência de diversas espécies em solução dentro de uma grande faixa de concentrações. Devido à estrutura da oxitetraciclina, verificaram que esta tem a capacidade de formar complexos de diferentes estequiometrias, nomeadamente: 2:1, 1:1 e 1:2, sendo que alguns deles, também protonados.

Os autores concluíram também que:

- a oxitetraciclina exibe a mesma conformação a pH 8 (**Figura 2.2**), quer na presença de cálcio, quer em soluções isentas deste metal;
- A pH 11, com predominância de complexos 1:1, a oxitetraciclina exibe a mesma conformação que a pH 8. O cálcio liga-se, portanto, a oxitetraciclina por meio dos seus oxigénios doadores em C12 e C1;
- À medida que a concentração de complexos 1:2 de oxitetraciclina-cálcio se torna predominante, o primeiro ião Ca^{2+} liga-se aos oxigénios da oxitetraciclina entre os átomos C12 e C1 enquanto o segundo coordena os átomos de azoto e oxigénio das posições C4 e C12, respetivamente [12].

A existência de complexos 1:2 de metal-oxitetraciclina foi relatada por Kenneth et al. (1962) [20] para pH acima de 7,6. Os autores referem a possível existência de complexos de estequiometria superior de metal para ligante. No entanto, os complexos de oxitetraciclina 1:1 e 2:1 são postulados como sendo as principais espécies moleculares que ocorrem *in vivo*.

2.3 Limeciclina

A Limeciclina é um antibiótico semissintético derivado de tetraciclina. Caracteriza-se por ser um pó amarelo muito higroscópico [21]. Comparativamente com as tetraciclina normalmente utilizadas, a Limeciclina é considerada muito mais solúvel, estável em todos os pH fisiológicos, de melhor absorção oral, de fácil permeabilidade no tecido e de eliminação mais lenta [22,23]. Após a administração, é convertida em tetraciclina no trato gastrointestinal antes de ser absorvida [24]. Devido a estas propriedades farmacológicas, este antibiótico é amplamente utilizado na medicina, mais especificamente, em tratamentos associados à acne [25].

Este produto é obtido pela reação entre Reagente C, Reagente D e Reagente E [22,26] (**Figura 2.5**).

Figura confidencial: Obtenção de Limeciclina pela reação entre Reagente C, Reagente D e Reagente E na presença de Reagente F

Figura 2.5 - Esquema reacional de obtenção de Limeciclina.

De acordo com Hermansson (1982) [28], a Limeciclina mostrou ser muito sensível à degradação em soluções aquosas ácidas e de pH neutro. Nestas condições, a limeciclina é rapidamente degradada em tetraciclina. O mesmo foi corroborado por Casy e Yasin (1984) [18]. Após tentativa de obter um espectro de NMR para a limeciclina, os autores constataram que esta molécula é um complexo altamente instável que reverte rapidamente às suas partes componentes aquando dissolução.

Com a degradação da molécula de limeciclina, também a degradação de tetraciclina se torna consequentemente possível. A tetraciclina pode degradar-se por meio de, pelo menos, quatro mecanismos: epimerização, desidratação, hidrólise e oxidação. Os dois primeiros mecanismos são as reações mais frequentes [29]. Destes, Loftin et al. (2008) [30] verificaram que a epimerização é o processo de transformação inicial dominante.

A epimerização no carbono 4 leva à obtenção de uma molécula inativa e não tóxica (4-epitetraciclina – **Figura 2.6**). A cinética desta reação segue um processo reversível de primeira ordem. A velocidade de reação de formação deste epímero é favorecida tanto a pH compreendido entre 3 e 5 [17,29,31], como também, observado por Remmers et al. (1963) [32], pelo aumento de temperatura. O mesmo foi relatado por Hussar et al. (1968) [33].

A desidratação e aromatização do anel C da tetraciclina conduz à formação de derivados anidro a pH baixo. A anidrotetraciclina (**Figura 2.6**) aparenta ser inativa *in vivo*, no entanto, o seu epímero (4-epianidrotetraciclina – **Figura 2.6**) foi associado a efeitos tóxicos após o uso de produtos de tetraciclina desatualizados [29].

A desidratação da tetraciclina em anidrotetraciclina e de 4-epitetraciclina em 4-epianidrotetraciclina, ocorre por meio de um processo de pseudo-primeira ordem a pH ácido.

A epimerização da anidrotetraciclina é a única reação cuja cinética ainda não foi relatada. No entanto, as constantes de velocidade de reação indicam que a epimerização da anidrotetraciclina é mais rápida do que a epimerização da tetraciclina [17].

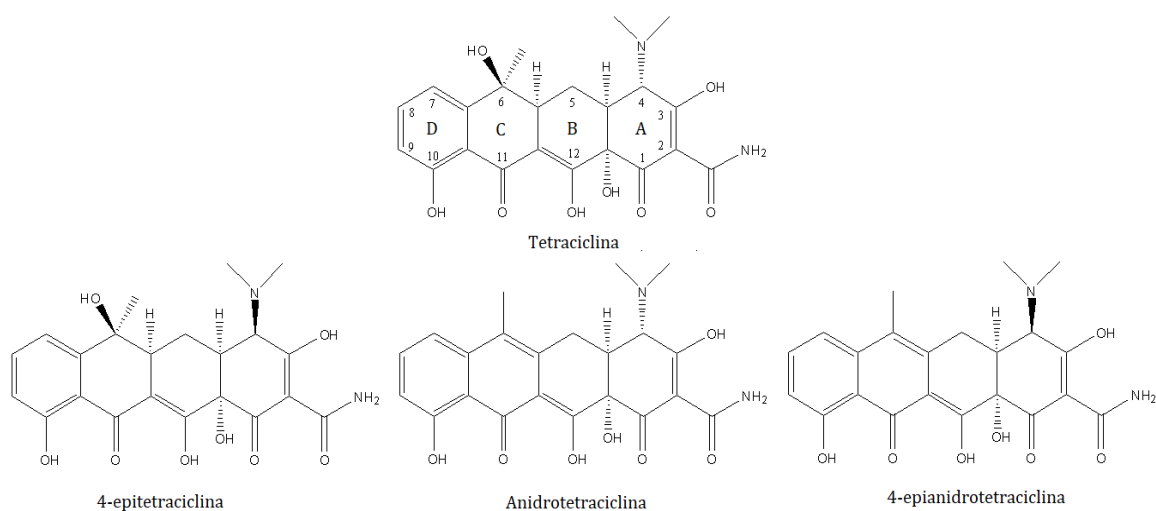


Figura 2.6 - Tetraciclina e respetivos produtos de degradação por epimerização e desidratação.

Tanto Remmers et al. (1963) [32], como Qizhen et al. (2016) [34] observaram que a taxa de hidrólise de tetraciclina aumenta significativamente com o aumento de pH e temperatura, diminuindo consequentemente, a sua atividade antibacteriana.

2.4 Cristalização / Precipitação

A cristalização é um processo amplamente utilizado na produção de compostos de alta pureza, incluindo produtos farmacêuticos, agroquímicos e produtos químicos finos [35]. Na produção industrial de compostos farmacêuticos, a cristalização é frequentemente usada para separar e purificar intermediários e é de grande importância para a purificação do produto final [36].

A cristalização trata-se de uma operação de separação, de onde é possível obter partículas sólidas (cristais) de um dos componentes de uma solução homogênea [35].

O parâmetro chave da cristalização é a sobressaturação. Só após atingir este estado é que ocorre a formação do cristal. A formação do cristal é essencialmente dividida nos seguintes passos [37]:

- Nucleação (primária e secundária);
- Crescimento.

Sobressaturação

A sobressaturação é o estado metaestável no qual o solvente contém maior concentração de soluto dissolvido do que normalmente conseguiria à temperatura considerada. Ou seja, quando a concentração de soluto é superior à concentração de saturação e portanto, excede o limite de solubilidade [38]. A **Figura 2.7** representa um diagrama de solubilidade.

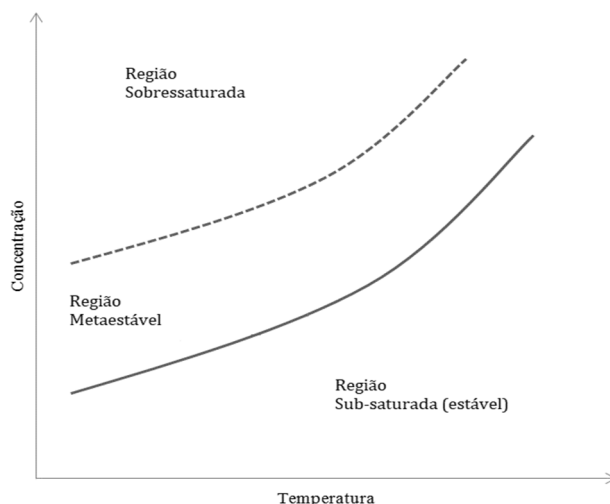


Figura 2.7 - Diagrama de solubilidade.

A partir da **Figura 2.7** é possível observar que uma solução tem a capacidade de se manter sobressaturada dentro de uma gama específica de concentração e temperatura (região metaestável). Uma solução encontra-se neste estado quando não existe possibilidade de dissolução de maior concentração de soluto, mantendo as condições termodinâmicas. Atinge, portanto, um equilíbrio sólido-líquido.

A formação espontânea da fase sólida (nucleação) ocorre quando a concentração aumenta acima do limite da zona metaestável (região sobressaturada) [39]. Ao tempo decorrido desde o momento em que a solução se encontra sobressaturada até à formação espontânea de uma nova fase, dá-se o nome de tempo de indução [38].

Nucleação

Denomina-se de nucleação à etapa de formação de partículas de tamanho diminuto de uma nova fase (núcleos), no interior de uma fase homogênea e sobressaturada. Existem dois tipos de nucleação:

- Primária (sem a presença de cristais);
- Secundária (induzida pela presença de outros cristais e/ou superfícies externas) [37].

A nucleação primária denota a formação de uma nova partícula na solução, com um tamanho suficiente para ser termodinamicamente estável nas condições prevalecentes [36]. Surge como consequência de flutuações rápidas e locais à escala molecular sob valores relativamente elevados de sobressaturação. Na solução sobressaturada, as moléculas têm de se aglutinar, contrariando a tendência de se dissolver novamente. Ao mesmo tempo, estas necessitam de se orientar de modo a formar primeiramente *clusters* e posteriormente cristais tridimensionais bem definidos [37]. Existe, no entanto, uma barreira energética que contraria a formação de núcleos. A **Figura 2.8** ilustra o diagrama de energia de ativação no processo de nucleação e demonstra a formação cristalina a partir da adição sequencial de *clusters*.

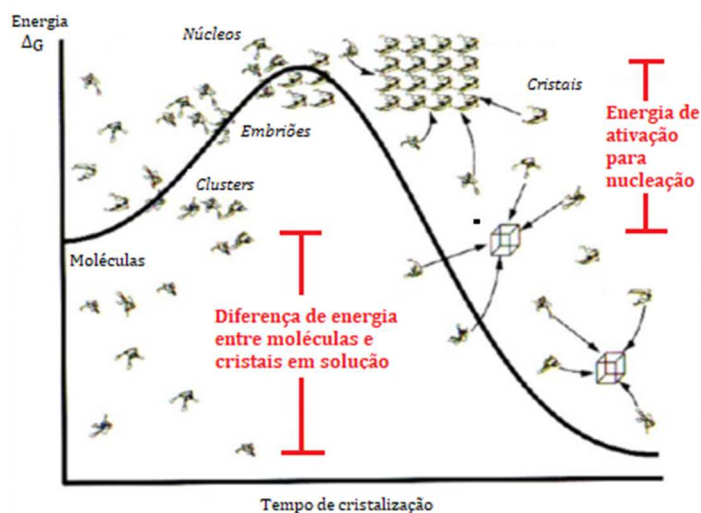


Figura 2.8 - Diagrama de energia de ativação no processo de nucleação.

A nucleação secundária, diferencia-se da primária, pois é induzida pela presença de cristais preexistentes. Este tipo de nucleação ocorre sob valores de sobressaturação baixos sendo a mais importante em cristalizadores industriais, uma vez que é mais rápido e permite obter o rendimento esperado em menor tempo [40,41].

A nucleação do cristal tem uma influência governante nas propriedades do produto e na robustez do processo, no entanto, é a etapa da cristalização menos compreendida. Isso leva a problemas significativos no projeto, operação e controle de processos industriais. Por esse motivo, processos industriais são desenvolvidos por tentativa e erro e muitas vezes carecem de robustez suficiente. Por vezes, a falta de reprodutibilidade requer retrabalho ou mesmo descarte do lote [36].

Mullin et al. (1961) [42] e Nyvlt et al. (1966) [43] estudaram a influência da agitação mecânica na etapa de nucleação. Os autores relatam que o aumento da agitação contribui para que ocorra nucleação e explicam esses resultados devido a um efeito combinado de difusão e atrito de *clusters* / embriões. Shmidt et al. (1985) [44] estabeleceram uma correlação entre a taxa de nucleação e a velocidade do agitador. Verificaram que a taxa de nucleação aumenta rapidamente com o aumento da agitação e atinge um equilíbrio. Relatam também que existe uma velocidade crítica do fluido, abaixo da qual os núcleos não se formam, sendo o seu valor dependente do grau de sobressaturação da solução.

Mersmann (1999) [45] refere que se a concentração inicial dos reagentes for alta e, portanto, a concentração inicial do produto também for alta, mas a solubilidade for muito baixa, então obtém-se elevada sobressaturação que leva a altas taxas de nucleação primária, ou seja, a formação de vários núcleos.

Crescimento

Uma vez formado o núcleo, o cristal começa a crescer. Trata-se de um processo simultâneo de difusão e adsorção na superfície do cristal. Ou seja:

- Transporte de massa da solução para a superfície do cristal por difusão, convecção, ou combinação de ambos (processo difusional).
- Incorporação do material na estrutura cristalina (processo reacional de superfície).

A velocidade de crescimento do cristal é condicionada por parâmetros operatórios como a velocidade de agitação, grau de sobressaturação e temperatura [38,46].

De acordo com Mersmann (1999) [45], o tamanho médio do cristal diminui com o aumento da supersaturação relativa. O autor refere também que, o crescimento do aglomerado é beneficiado através da difusão por agitação. Porém, o aumento da velocidade de agitação conduz ao aumento da velocidade de colisão dos cristais contra uma resistência (parede, outros cristais). Desta forma, os efeitos do atrito serão mais significativos, levando a um tamanho máximo e médio do cristal, reduzidos.

2.5 Downscale / Scale-up

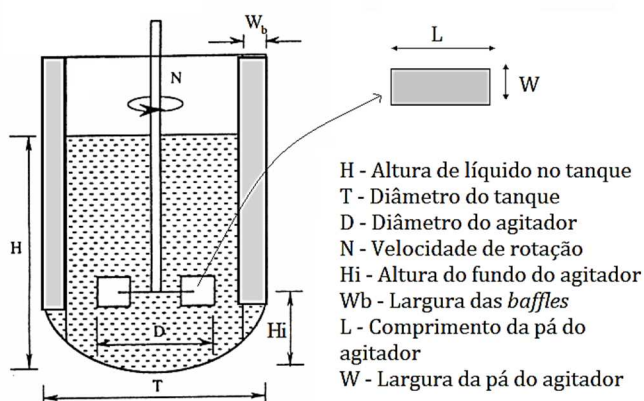
O conhecimento de métodos de alteração de escala de um processo é fundamental quando se pretende:

- transferir os resultados de um processo desenvolvido à escala laboratorial para a planta de produção (*scale-up*) [47];
- estudar e otimizar um processo industrial, reproduzindo-o em ensaios laboratoriais (*downscale*) [48].

O *downscale* e *scale-up* não são procedimentos lineares, pelo que variar proporcionalmente apenas a quantidade de reagentes, não é suficiente [49]. Para realizar a variação de escala de um processo de forma fiável, é necessário garantir a semelhança da geometria dos equipamentos, a utilização de material na mesma proporção e condições de processo descritas por números adimensionais iguais entre si, para ambas as escalas. A salvaguarda destas condições promove a conversão química do material em conjunto com transferência de massa, calor e momento. Estes são parâmetros dependentes de escala [47,50].

Similaridade geométrica

Com similaridade geométrica, todas as dimensões de comprimento no equipamento de grande escala são definidas pelas dimensões correspondentes no equipamento de escala inferior [51]. Sejam as dimensões do tanque definidas de acordo com a nomenclatura apresentada na **Figura 2.9** [52]. Para semelhança geométrica exata entre unidades (modelo 1 e protótipo 2), devem ser satisfeitas as proporções descritas na **Equação 2.1** [53].



$$\left(\frac{D}{T}\right)_1 = \left(\frac{D}{T}\right)_2; \left(\frac{H}{T}\right)_1 = \left(\frac{H}{T}\right)_2;$$

$$\left(\frac{H_i}{T}\right)_1 = \left(\frac{H_i}{T}\right)_2; \left(\frac{W_b}{T}\right)_1 = \left(\frac{W_b}{T}\right)_2;$$

$$\left(\frac{W}{D}\right)_1 = \left(\frac{W}{D}\right)_2; \left(\frac{W}{L}\right)_1 = \left(\frac{W}{L}\right)_2$$

Equação 2.1

Figura 2.9 - Tanque de agitação equipado com baffles. Nomenclatura das respetivas dimensões. Adaptado de M. Diego e B. Pablo (2019) [52].

Manter a semelhança geométrica durante a variação de escala, permite a definição de um único fator de escala, R. Este valor é igual a qualquer quociente entre as dimensões do tanque do modelo 1 e do protótipo 2 (**Equação 2.2**) [53].

$$R = \frac{T_2}{T_1} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{H_2}{H_1} = \frac{H_{i2}}{H_{i1}} = \frac{w_{b2}}{w_{b1}} = \frac{L_2}{L_1} = \frac{W_2}{W_1}$$

Equação 2.2

Condições do processo

Após mantida a equivalência geométrica dos equipamentos, é necessário determinar qual a velocidade de agitação aplicada na variação de escala.

Os dois métodos mais eficazes e frequentemente utilizados quando se pretende realizar um *scale-up* ou *downscale* num processo de precipitação, são:

- velocidade da ponta da pá do agitador constante entre as duas escalas [50,51];
- potência do agitador por unidade de volume (P/V) constante entre as duas escalas [50,51,54].

Alteração de escala com velocidade periférica do agitador constante, implica cisalhamento constante na região do agitador [50]. Ou seja, assegura uma dispersão equivalente em ambos os sistemas. Neste caso, a velocidade de agitação aplicada (N_2) é dada pela expressão representada pela **Equação 2.3** [51].

$$N_1 \pi D_1 = N_2 \pi D_2 \rightarrow N_2 = N_1 \left(\frac{D_1}{D_2} \right)$$

Equação 2.3

Em que os parâmetros N e D são indicados na **Figura 2.7**.

Qian et al. (1987) [55] observaram que o aumento de escala com velocidade de ponta constante do agitador em processos de precipitação, conduz a taxas de nucleação iguais em escalas diferentes.

No entanto, Oldshue (1983) [56] relata que ao aumentar a escala, a taxa de cisalhamento máxima na zona do agitador aumenta. Portanto, este critério não leva a uma dispersão precisa da mistura, trata-se apenas de uma aproximação, com base nas taxas de cisalhamento médias na zona do agitador.

No caso da utilização do critério no qual a potência do agitador por unidade de volume (P/V) é constante, a velocidade de agitação (N_2) é dada pela **Equação 2.4** [50,51].

$$\frac{P}{V} = \frac{N_{PO} N^3 D^5 \rho}{V} = \text{constante} \rightarrow N_2 = N_1 \left(\frac{D_1}{D_2} \right)^{2/3}$$

Equação 2.4

Em que P corresponde à potência do agitador e V ao volume de líquido no tanque. Este critério é preferivelmente aplicado quando a diferença de densidade (ρ) entre sólido e líquido é reduzida [57]. Aplica-se estritamente a condições turbulentas, onde o número de potência (N_{po}) é constante [51].

No estudo de aumento de escala de cristalizadores, PloB et al. (1986) [58] observaram que as taxas de nucleação e crescimento do cristal, em diferentes escalas, são as mesmas se a densidade da suspensão, a potência por volume e o tempo de residência forem mantidos constantes.

Rice e Baud (1990) [59] também recorreram à igualdade potência por volume como um critério de aumento de escala. Concluíram que este critério só pode ser usado para determinados locais de pontos de alimentação. Da mesma forma, Tipnis et al. (1994) [60] afirmam que o fator mais importante para o aumento de escala é a mistura da alimentação, que é influenciada pelas concentrações das espécies químicas, as taxas de fluxo de alimentação, a geometria do agitador e as localizações dos tubos de alimentação. Os autores não fornecem regras rígidas e rápidas para aumento de escala. No entanto, sugerem que o procedimento seja realizado mantendo a potência por unidade de volume constante.

Vários critérios de aumento de escala para cristalização e precipitação foram propostos na literatura. Verifica-se assim, a dificuldade de variar a escala neste tipo de processos. Uma explicação para a variedade de regras de aumento de escala é a impossibilidade de manter todos os grupos adimensionais que caracterizam o processo, constantes [61]. Apesar de se tratarem de regras teóricas de aumento de escala, na prática, onde as taxas cinéticas (reação ou precipitação) são controladas pelo grau de mistura, estes critérios simples, falham frequentemente [50]. Nesses casos, deve ser ponderada uma concordância entre diferentes grupos adimensionais, de acordo com sua influência esperada no processo. O aumento de escala, perde, assim, a sua base teórica e torna-se empírico [61].

Alternativamente, pode ser desenvolvido um modelo matemático para explicar os processos físicos e químicos subjacentes considerados importantes para aumento de escala. Os mecanismos do processo devem ser claramente compreendidos e o modelo não deve conter quaisquer parâmetros fenomenológicos ou dependentes de escala desconhecidos, visto que não é adequado para previsões quantitativas de aumento de escala [48,61,62]. Nesta situação, o primeiro passo para a realização do *scale-up* do processo, envolve a determinação de parâmetros e modelos cinéticos obtidos a partir dos dados à escala laboratorial. As experiências devem ser planejadas de forma a que os processos físicos e químicos que ocorrem no reator possam ser claramente compreendidos. Desta forma, será possível compreender quais os parâmetros que influenciam o processo [61].

Nem sempre é possível obter informações suficientes sobre um processo com recurso apenas a dados à escala laboratorial. Uma planta piloto, isto é, uma escala entre a laboratorial e a industrial, pode ajudar a dimensionar um processo químico ou físico com sucesso. Ou seja, não só auxilia na determinação da capacidade da unidade comercial, como permite a redução de erros e custos no projeto de aumento à escala industrial [61].

2.6 Desenho de experiências (DOE)

O desenho de experiências (DOE) é um método estatístico que permite estudar vários fatores de um processo em simultâneo, cada um com dois ou mais níveis, permitindo identificar a melhor combinação de níveis para cada fator, conduzindo à otimização do processo [63].

Um DOE pode ser classificado como de planeamento fatorial completo ou incompleto/fracionado. O número de experiências necessárias para um fatorial completo é definido por 2^k , onde k representa o número de fatores que se pretende analisar e 2 representa o número de níveis de cada fator. Normalmente, os dois níveis são designados por baixo e alto e designados na forma codificada por - e +, respetivamente. No que concerne aos fatores, estes geralmente são representados por letras maiúsculas, por exemplo: A, B, C. Entende-se por experiência, cada ensaio onde se aplicam as diferentes combinações possíveis de níveis dos fatores em estudo, de modo a identificar os efeitos, ou respostas, geradas no produto [64,65].

No caso de haver replicação de experiências, ou seja, a repetição do ensaio sob as mesmas condições, e não leituras provenientes da mesma experiência, então o número total de experiências será definido por $r \times 2^k$, onde r representa o número de réplicas.

Os fatoriais completos são muito importantes, pois são simples de realizar e não requerem muitas experiências para cada fator. Permitem detetar interações entre os diversos fatores e são a base para a construção de fatoriais fracionados. No caso dos fatoriais fracionados, apenas se realiza uma fração dos ensaios propostos para o fatorial completo. Este tipo de fatorial é muito útil quando se pretende estudar um grande número de fatores, com mínimo de experiências. No entanto, a sua realização pode fazer com que efeitos principais e interações entre dois fatores se encontrem confundidos, não podendo ser separados dos efeitos de outras interações de ordem superior [64].

Antes da aplicação do DOE é necessário executar uma reflexão organizada para que a sua aplicação produza resultados positivos. A **Figura 2.10** apresenta esquematicamente, de forma sumariada, as principais etapas que devem ser tidas em consideração na fase de planeamento das experiências.

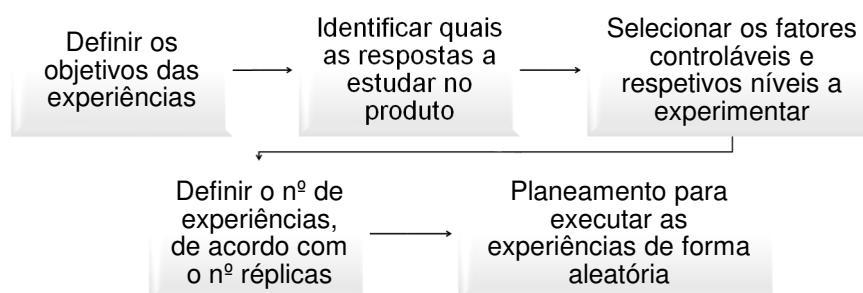


Figura 2.10 - Esquema de abordagem para aplicação de DOE.

Após a realização das experiências, realiza-se a análise de variância (ANOVA) para o tratamento estatístico dos resultados obtidos. Esta análise de variância é uma técnica estatística que permite identificar, de forma objetiva, quais os fatores e/ou interações que afetam significativamente as respostas, através da repartição da variabilidade total dos dados experimentais, pelas diversas componentes causadoras da variabilidade [63].

Após a realização da ANOVA, existe necessidade de verificar se os pressupostos matemáticos utilizados, são verdadeiros. Nomeadamente, se o modelo adotado é o correto e se os erros são Normal e Independentemente distribuídos com média zero e variância constante. O método normalmente utilizado para averiguar o cumprimento dos pressupostos, é a análise dos chamados “resíduos”, sendo estes uma estimativa do erro experimental. Os pressupostos e respetiva análise são seguidamente apresentados:

- **Normalidade:** De modo a apurar se os resíduos seguem uma distribuição Normal, é elaborado um gráfico das probabilidades da distribuição Normal. O pressuposto da Normalidade é satisfeito se a representação for aproximadamente uma reta.
- **Independência dos resíduos:** A elaboração de um gráfico dos resíduos em função do tempo, isto é, da ordem aleatória pela qual as experiências foram efetuadas, permite avaliar a existência, ou não, de correlação entre os resíduos. Caso o gráfico não tenha nenhuma tendência especial, então verifica-se a independência dos resíduos.
- **Variância constante:** Este pressuposto avalia a homogeneidade da variância através da construção de um gráfico dos resíduos em função dos valores previstos ou estimados. Se o modelo é correto e os pressupostos se verificam, então este gráfico não deve apresentar nenhuma estrutura especial.

Esta análise deve ser sempre realizada para verificar os pressupostos feitos para a análise de variância, pois caso os pressupostos não sejam validados, as conclusões retiradas do DOE não serão igualmente válidas.

Finalmente, após a identificação dos fatores significativos (isolados ou em interação), estabelece-se a melhor combinação de níveis dos fatores que irá conduzir à maximização dos objetivos pré-estabelecidos [64,66].

Diversos autores recorrem a este método estatístico com o objetivo de otimizar processos de precipitação, comprovando sua eficácia nestes casos. O DOE permite concluir quais as variáveis críticas ou condições ideais para este tipo de operação, conduzindo à sua otimização. Por exemplo:

- Zhang et al. (2013) [67], recorrem ao desenho de experiências para avaliar os efeitos dos fatores potencialmente críticos no desempenho da precipitação do etanol.

-
- No caso de Daskalakis et al. (2015) [68], determinaram quais as condições ideais para a precipitação induzida por bactérias por CaCO_3 , com o auxílio de um planeamento fatorial completo com 3 fatores.
 - Também Kateja et al. (2016) [69] relatam sucesso na otimização da precipitação baseada no pH, tanto em contínuo, como em descontínuo, com recurso a um DOE.

2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de separação química e identificação de componentes. Esta área da química é caracterizada pela identificação e quantificação dos componentes de uma amostra, através de métodos de análise, tanto qualitativos como quantitativos. Os componentes de uma amostra que se pretendem determinar são chamados de analitos [70].

Para que a separação entre analitos seja possível, a mistura é introduzida numa coluna ou superfície planar cromatográfica, composta por uma fase estacionária e uma fase móvel (a qual passa através da fase estacionária). A fase móvel permite que os analitos se desloquem através da coluna a diferentes velocidades, de acordo com a afinidade que têm com as fases móvel e estacionária, sendo este processo chamado de eluição. Os analitos com maior afinidade à fase estacionária tendem a ficar retidos na coluna durante mais tempo. Os analitos com maior afinidade para com o eluente da fase móvel são excluídos da coluna em primeiro lugar. À medida que os compostos são separados e saem da coluna, estes são detetados através de um ou mais detetores. O registo da deteção de todos os compostos em função do tempo de análise, ou volume de eluição, designa-se por cromatograma [71].

Cromatografia líquida

A grande diferença entre a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência é que na primeira, a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade. Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são utilizadas fases estacionárias com partículas menores, sendo por isso necessária a utilização de bombas de alta pressão para que a fase móvel seja eluída [72]. Estas partículas são as responsáveis pela alta eficiência, isto porque com partículas de menor diâmetro torna-se possível aumentar a área de contacto e portanto, obter maior eficiência na separação dos analitos [72,73].

Num sistema de HPLC, os solventes estão armazenados em reservatórios, sendo bombeados através da ação de uma bomba peristáltica. As análises são iniciadas com a injeção de uma amostra, que segue para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos seus componentes. Após este procedimento, o eluente com a fração separada, é recebido no detetor, onde é lido o seu sinal. A **Figura 2.11** apresenta uma ilustração do funcionamento de um sistema de HPLC [74].

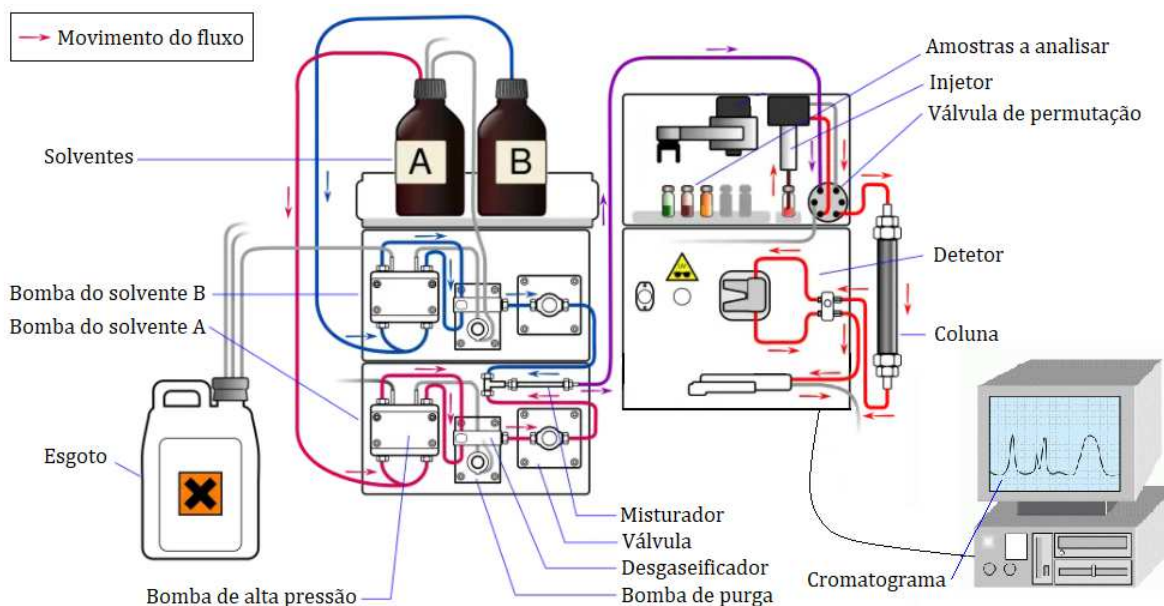


Figura 2.11 – Esquema de um sistema de HPLC.

Existem várias novas abordagens em HPLC que permitem a redução do tempo de análise sem comprometer resolução e eficiência de separação. Entre eles, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC). Este tipo de sistema tem a capacidade de acomodar pressões operacionais superiores a 1000 bar e os tamanhos de partícula da fase estacionária são tipicamente na ordem de 2 μm ou inferior, enquanto que em HPLC é caracterizado por partículas de 3-5 μm [75,76]. Tal como relatado por Gika (2016) [75], estas características conduzem a vantagens óbvias de poder de separação, pois obtém-se maior:

- Especificidade - analitos são menos propensos a coeluir com interferências;
- Sensibilidade - menor sinal-ruído de fundo;
- Rendimento analítico - um método de HPLC de 10 min por amostra pode ser reduzido para 3-4 min em UHPLC.

Sistema de solventes e injeção do HPLC

O HPLC é constituído por um sistema de gestão de solventes, no qual as fases móveis utilizadas são dispostas em reservatórios, acoplados a um sistema de degaseificação a vácuo. Este procedimento impede a entrada de bolhas de ar dentro da coluna e aumenta o desempenho do detetor. Relativamente aos modos de eluição dos solventes no sistema, estes podem ser definidos como:

- Isocrático – A composição da fase móvel permanece constante ao longo da análise cromatográfica. Pode ser realizada apenas com recurso a um único solvente ou uma mistura constante de solventes.
- Gradiente - A composição da fase móvel varia ao longo da análise ao utilizar dois solventes distintos. Recorre-se a uma eluição com gradiente quando um único solvente

não propicia uma eluição suficientemente rápida de todos os componentes. Neste caso, aumenta-se a quantidade adicionada de solvente B ao solvente A.

Após ser puxado por uma bomba de alta pressão, o fluxo de solvente (ou mistura de solventes) é controlado por uma válvula (válvula de permutação - **Figura 2.11**) que conduz a fase móvel e o conteúdo do injetor (amostra a analisar) para o interior da coluna a alta pressão. Os sistemas de injeção de amostras são automáticos devido a esta válvula, uma vez que permite que as amostras sejam sucessivamente injetadas através de um *loop*, sem ser necessário parar o fluxo de solvente [77,78].

Colunas para HPLC

As colunas cromatográficas são geralmente de aço inoxidável e estão inseridas num forno adequado com controlo de temperatura. O aquecimento da coluna cromatográfica reduz a viscosidade da fase móvel, reduzindo a pressão necessária, o que permite um fluxo mais rápido. Contribui também para o aumento da velocidade de difusão dos solutos, diminuindo assim os tempos de retenção dos picos cromatográficos dos analitos e melhora a resolução (separação) dos mesmos. Simultaneamente, o aumento da temperatura pode degradar a fase estacionária e diminuir o tempo de vida útil da coluna [78].

As colunas podem ter vários tamanhos, tipicamente entre 10 e 30 cm de comprimento, e diâmetros internos de 4 a 10 mm. O enchimento (fase estacionária) mais comum das colunas de cromatografia líquida são partículas microporosas de sílica de 3–5 µm. A maior parte dos tipos de sílica não deve ser usada acima de pH 8, pois dissolve-se em soluções básicas. Para a separação de compostos básicos, pode ser utilizada sílica com pontes de etileno ou com constituição polimérica [78]. As colunas também podem ser constituídas por partículas de alumínio ou resinas de permuta iónica [71].

Para além das colunas preenchidas com partículas microporosas de sílica, existem também as denominadas colunas monolíticas. As colunas monolíticas são compostas por uma única peça de sílica porosa que preenche integralmente o volume da coluna, não existindo os espaços vazios interparticulares, típicos das colunas empacotadas. Através da **Figura 2.12** é possível observar a diferença estrutural física dos dois tipos de preenchimento de sílica mencionados.

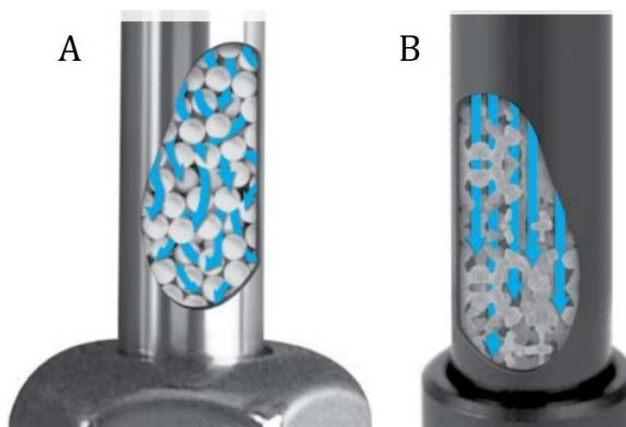


Figura 2.12 – Representação da fase estacionária de uma coluna cromatográfica. Legenda: A – Partículas individuais de sílica; B – Sílica com estrutura monolítica. Adaptado de Phenomenex [79].

São relatadas com inúmeras vantagens face às colunas tradicionais como: a redução de tempo, uso diminuído de fase móvel, oferecendo ainda uma separação mais rápida e mais eficiente [80].

Cerca de 80% do volume da estrutura monolítica é espaço vazio, pelo que o solvente flui através da coluna com relativamente pouca resistência [78]. Tal permite, de acordo com Díaz-Bao (2015) [76], que estas colunas trabalhem a elevadas taxas de fluxo (até 10 mL/min) com comprimentos de coluna convencionais, sem gerar altas pressões, mantendo uma boa separação.

Haghedooren et al. (2009) [80] adaptaram um método analítico para analisar tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina e respetivas impurezas, originalmente desenvolvido em colunas C18 com partículas de sílica convencionais, para uma coluna monolítica. Os autores observaram que ambos os tipos de coluna cromatográfica foram capazes de separar os compostos com resolução suficiente. No entanto, as colunas convencionais mostraram tempos de análise mais longos e contrapressões mais altas, enquanto que com a coluna monolítica obteve-se uma velocidade de análise aumentada em contrapressões mais baixas, mantendo ou mesmo melhorando a qualidade de separação.

Separação em HPLC

Existem diferentes modos de separação de compostos através de cromatografia líquida de alta eficiência. A principal é a cromatografia de partição. Neste tipo de cromatografia, a retenção das moléculas é determinada pela afinidade dos compostos pelas fases móvel e estacionária, dependendo das características físico-químicas dos analitos (grupos funcionais, polaridade, solvabilidade com a fase móvel) [81].

Uma vez que as propriedades das moléculas são determinadas pelo seu grupo funcional, definido através de parâmetros como a sua atividade e estrutura, entre outras características,

também a sua polaridade é dada por este grupo. Assim, o tempo de retenção de cada composto na fase estacionária é determinado pela localização do grupo funcional de cada molécula.

A separação cromatográfica com base na polaridade assenta na teoria de que compostos com polaridades semelhantes tendem a ser atraídos uns pelos outros, contrariamente aos compostos com polaridades diferentes, que são repelidos [81,82].

A cromatografia de partição é essencialmente dividida em:

- Cromatografia de fase normal – A fase estacionária da coluna é polar e a fase móvel é apolar. Nesta técnica, compostos apolares eluem mais rapidamente. Tal deve-se à fraca afinidade entre os compostos apolares e a fase estacionária. Consequentemente, compostos polares são retidos na coluna durante mais tempo, devido à elevada afinidade com a fase estacionária. Este tipo de cromatografia não é geralmente utilizado para separações em aplicações farmacêuticas, pois a maioria das moléculas são polares, conduzindo a elevados tempos de eluição [83].
- Cromatografia de fase reversa – Trata-se do modo de separação mais popular. Neste caso, a fase estacionária é apolar e hidrofóbica, enquanto que a fase móvel é um solvente polar. Os compostos polares são então eluídos em primeiro lugar e os compostos apolares saem posteriormente. As fases estacionárias mais comuns têm por base sílica modificada pela introdução de grupos organosiloxano, em que a parte orgânica pode ser de cadeias de CN (cianopropilsilil-), C8 (n-octilsilil-) e ainda C18-ODS (n-octadecilsilil-), aumentando, a hidrofobicidade da fase estacionária com o aumento da cadeia de carbono. Ou seja, colunas de empacotamento apenas compostas por sílica são extremamente polares, enquanto que as de C18-ODS são muito apolares [83].

A seguinte lista de solventes, designada por série eluotrópica, ordena alguns dos solventes mais utilizados como fases móveis neste tipo de cromatografia de acordo com a sua força de eluição, do mais polar para o mais apolar: Água; Álcoois; Acetonitrilo; Tetrahidrofurano (THF) [84].

Detetores em HPLC

Em cromatografia líquida podem ser utilizados diversos tipos de sistemas para deteção dos compostos presentes nas amostras. Os detetores mais comumente utilizados são:

- Ultravioleta-vísivel (UV-Vis);
- Fotodíodos (PDA – *photodiode array*)
- Espectrometria de massa (LC-MS).

Um detector ideal deve ser altamente sensível, reproduzível, seletivo e que possua características como a linearidade, em que a resposta aumenta proporcionalmente de acordo com a concentração de analito [78].

Os detectores UV-Vis e PDA são categorizados como detectores de absorvância. Durante a análise, a amostra passa por uma célula de vidro transparente, denominada célula de fluxo. Quando a radiação UV, emitida pela lâmpada de deutério, é irradiada na célula de fluxo, a amostra absorve uma parte dessa radiação. Essa radiação atinge, seguidamente, uma zona de difração (rede holográfica côncava) que direciona a luz não absorvida para a matriz de fotodiodos [74,78]. A **Figura 2.13** representa o funcionamento descrito deste tipo de detector.

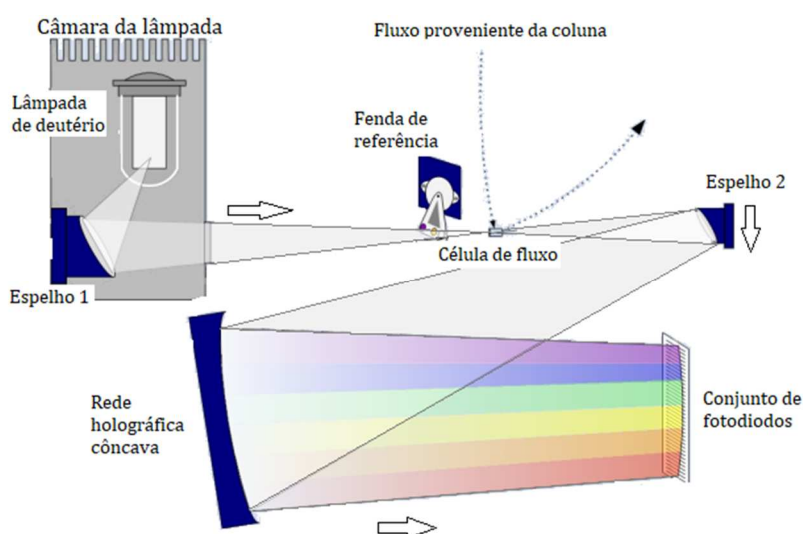


Figura 2.13 - Esquema de funcionamento de um detector UV-PDA.

Ao passarem pela célula, os compostos absorvem radiação, permitindo assim relacionar a concentração da amostra com a absorvância dada pelo sistema, através da lei de Lambert-Beer (Equação 2.5).

$$A = \varepsilon b c = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad \text{Equação 2.5}$$

Em que:

- A - Absorvância;
- ε - Absortividade molar para um determinado comprimento de onda;
- b - Distância percorrida pela luz (cm);
- c - Concentração molar da amostra (M);
- I_0 - Intensidade da luz incidente;
- I - Intensidade da luz transmitida [74].

O constante desenvolvimento técnico evoluiu para o acoplamento dos sistemas de HPLC a outras técnicas, permitindo um maior poder da informação extraída, do que os sistemas de detecção ótica mais frequentemente usados. Estas técnicas combinam o poder de separação do HPLC ao poder de identificação estrutural de técnicas como a espectrometria de massa (LC-MS).

O espectrômetro de massa é um instrumento projetado para produzir e separar íons de fase gasosa dos analitos, de acordo com seu valor em relação massa/carga (m/z) [85].

Existem vários estágios distintos na análise de LC-MS. Geralmente incluem:

- Separação dos componentes da amostra usando uma coluna de HPLC;
- As espécies de amostras separadas são então pulverizadas numa fonte de íons de pressão atmosférica, onde são convertidas em íons na fase gasosa e a maioria do eluente é bombeada para o esgoto;
- O analisador de massa é usado para diferenciar os íons de acordo com a razão massa/carga com o auxílio de campos elétricos e/ou magnéticos;
- Os íons que emergem do primeiro analisador de massa, são acelerados usando uma diferença de potencial e colidem com moléculas de gás neutras como H_2 , N_2 ou Ar , causando fragmentação do analito;
- Uma vez produzidos e separados, o detetor é usado para transformar os íons emergentes do analisador de massa, num sinal utilizável.

Toda a análise e detecção de massa são realizadas sob alto vácuo, de forma a operar de maneira previsível e eficiente [86]. O sistema de LC-MS pode ser visualizado na **Figura 2.14**.

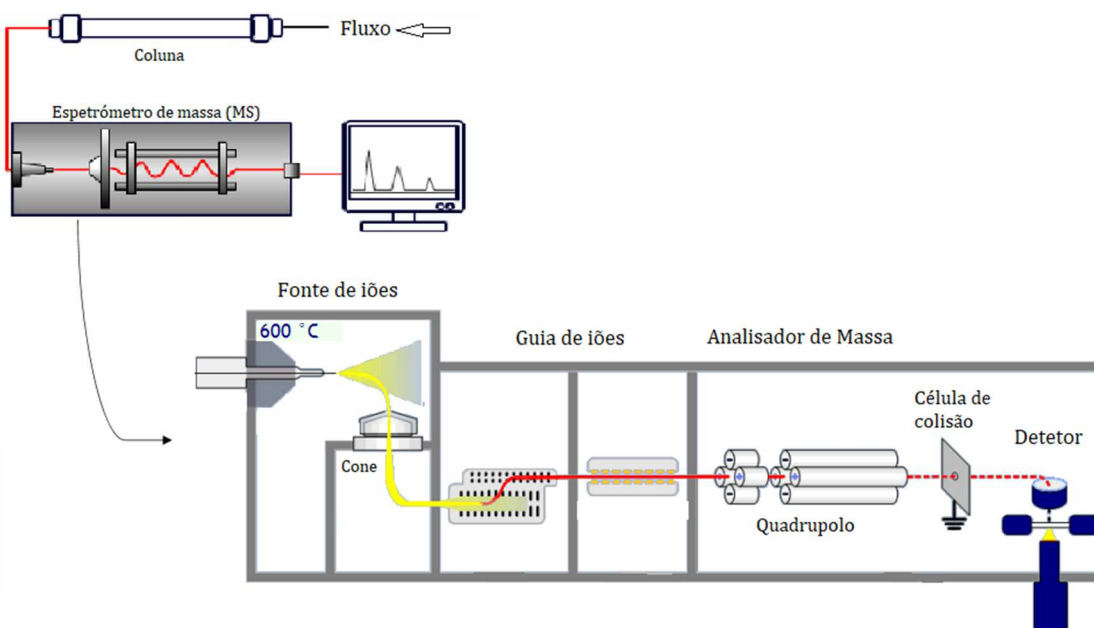


Figura 2.14 - Representação de um sistema LC-MS.

Os dados de LC/MS são muito úteis quando se pretende obter informações sobre a massa molecular, estrutura, identidade e quantidade de componentes específicos de uma amostra [78,86].

2.8 Desenvolvimento de método analítico para HPLC de fase reversa

O desenvolvimento de um método analítico desempenha um papel importante na fabricação de produtos farmacêuticos. Permitem quantificar separadamente o princípio farmacêutico ativo, impurezas da reação, intermediários e quaisquer produtos de degradação.

Para realização deste procedimento, é necessário conhecer as propriedades físico-químicas do composto a analisar, facilitando assim, a escolha das condições cromatográficas a definir [83].

Existem muitas etapas envolvidas no desenvolvimento de um método para HPLC, principalmente:

- Seleção da coluna;
- Seleção da fase móvel;
- Seleção do modo de eluição.

Seleção da coluna

Em primeiro lugar, deve ser escolhido o tipo de coluna a usar, de forma a que, de acordo com os analitos que se pretendem separar, se obtenha boa retenção e resolução. Deve-se iniciar pela escolha de uma coluna C18. No caso de não serem obtidos os resultados esperados, deve-se modificar este parâmetro, experimentando outro tipo de colunas, como as C8. Para obtenção de melhores resultados, pode-se recorrer à variação do tamanho da partícula, do comprimento e diâmetro da coluna. Geralmente, são ainda realizados ajustes na temperatura da coluna e no fluxo de fase móvel, com o objetivo de minimizar o tempo de análise [82,83].

Seleção da fase móvel

Segue-se a seleção dos constituintes da fase móvel e do seu pH. Em HPLC de fase reversa, as fases móveis usadas, consistem numa mistura de uma solução aquosa com um modificador orgânico, que deve ser completamente miscível [84].

Tendo em conta que as espécies ionizadas, são bastante influenciadas pelo pH da fase móvel, este é frequentemente usado para manipulação dos tempos de retenção, seletividade e resolução, na análise destes compostos. Assim, a fase aquosa consiste normalmente numa solução aquosa com ajuste de pH de determinado aditivo. É preferível começar com valores de pH mais baixos, tendo em conta os limites inferiores de estabilidade da coluna dados pelo fabricante. Relativamente aos modificadores orgânicos da fase móvel, as escolhas recaem, principalmente, entre o uso do acetonitrilo e ou metanol, dependendo da solubilidade do composto em estudo [83,85,87].

Cada vez mais se tem como objetivo desenvolver métodos analíticos compatíveis com espectrometria de massa (MS), de modo a identificar os compostos presentes nas amostras em estudo. Esta técnica requer o uso de fase móvel volátil, tornando a escolha dos solventes limitada [85]. A **Tabela 2.1** lista a compatibilidade de vários aditivos da fase aquosa, para o uso em LC-MS.

Tabela 2.1 - Aditivos comuns em HPLC e respetiva compatibilidade com LC-MS. Adaptado de Dolan (2012) [85].

Aditivo	Gama de pH	Compatibilidade com LC-MS
<i>Fosfato (pK1)</i>	1,1 – 3,1	Não
<i>Fosfato (pK2)</i>	6,2 – 8,2	Não
<i>Fosfato (pK3)</i>	11,3 – 13,3	Não
<i>Acetato</i>	3,8 – 5,8	Sim
<i>Citrato (pK1)</i>	2,1 – 4,1	Não
<i>Citrato (pK2)</i>	3,7 – 5,7	Não
<i>Citrato (pK3)</i>	4,4 – 6,4	Não
<i>Ácido trifluoracético 0,1%</i>	2,0	Sim
<i>Ácido fosfórico 0,1%</i>	2,0	Não
<i>Ácido fórmico 0,1%</i>	2,7	Sim
<i>Formato de amónio</i>	2,7 – 4,7	Sim
<i>Bicarbonato de amónio</i>	6,6 – 8,6	Sim
<i>Borato</i>	8,3 -10,3	Sim

Seleção do modo de eluição

A utilização de um modo de eluição com gradiente aumenta significativamente a separação de um sistema de cromatografia, comparativamente ao método isocrático. Principalmente, devido ao aumento da eficiência aparente (diminuição da largura do pico) [83].

A eluição com gradiente é obtida ao definir diferentes composições de fase aquosa e fase orgânica ao longo do tempo de análise. A composição de fase móvel inicial é mais rica na componente aquosa, mas suficientemente forte para reter e resolver os analitos mais polares, os primeiros a serem eluídos. Por conseguinte, a força do solvente começa a aumentar, de forma a que todos os compostos eluam com a melhor resolução possível. A coluna deve ser equilibrada nas condições iniciais de fase móvel, antes da injeção seguinte [88].

O aumento do fator de retenção pode ser feito aumentando o tempo de gradiente ou reduzindo a variação de modificador orgânico. Assim, no decorrer do desenvolvimento de um método analítico de gradiente devem ser estudadas as possíveis alterações de composição orgânica na fase móvel de acordo com o modo de eluição dos picos, antes de se alterar o tipo de coluna ou a fase móvel [82,87].

2.9 Validação de métodos analíticos

A validação é um procedimento para aferir a qualidade de um método interno de ensaio. Permite demonstrar que este satisfaz os requisitos para o qual foi construído e que conduz a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida [89].

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes:

- Especificidade – é a capacidade de identificar inequivocamente o analito de interesse na presença de outros compostos, como impurezas. Portanto, capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes.
- Linearidade – representa a capacidade que um método possui de, dentro de um determinado intervalo, obter resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática, proporcionais à concentração de analito na amostra.
- Limite de deteção – é definido como a concentração mínima de analito que consegue ser detetada numa amostra, e não quantificada.
- Limite de quantificação – é considerado como a menor concentração de analito presente numa amostra, capaz de ser determinada quantitativamente com uma precisão e exatidão aceitável.
- Precisão – é baseada na concordância entre os resultados obtidos quando uma amostra homogénea é repetidamente analisada no mesmo método analítico e nas mesmas condições, podendo ser considerados três níveis de precisão:
 - Precisão intermédia – expressa as variações que podem ocorrer dentro do laboratório, realizando as análises com diferentes equipamentos, em dias distintos e feitas por vários analistas.
 - Reprodutibilidade – resultado de um estudo colaborativo entre vários laboratórios, fazendo uso do mesmo procedimento analítico.
 - Repetibilidade – refere-se ao uso do mesmo método analítico durante um curto espaço de tempo, sendo as análises efetuadas sempre nas mesmas condições, com o mesmo analista e equipamento.
- Exatidão – consiste na proximidade dos resultados obtidos nos testes relativamente ao valor de referência.
- Robustez – revela a capacidade que o procedimento analítico tem para não ser afetado por pequenas variações nos seus parâmetros.
- Gama de trabalho – é considerado o intervalo entre os limites inferiores e superiores de concentração de analito na amostra, para a qual foi demonstrado um nível de precisão, exatidão e linearidade adequado [89].

3. Materiais e Métodos

Este projeto foi desenvolvido com base em três principais objetivos: a otimização do método de fabrico de dois API's, distintos entre si, e o desenvolvimento de um método analítico para estudo de um deles. Desta forma, este capítulo apresenta o equipamento, material e trabalho desenvolvido, subdividido de acordo com cada objetivo.

3.1 Otimização do processo de produção de Oxitettraciclina cálcica

A otimização deste processo de fabrico surgiu com a finalidade de se obter um produto final que cumpra a especificação em todos os parâmetros, principalmente, o teor percentual de cálcio. Para tal, foi inicialmente realizado um *downscale* do processo industrial para a escala laboratorial.

⊗ Equipamento:

O equipamento utilizado no desenvolvimento deste projeto, foi o seguinte:

- Agitador mecânico: turbina Rushton com diâmetro=5,3 cm;
- *Baffles* de metal;
- Copo de vidro de 3L;
- Bomba peristáltica: Masterflex;
- Motor para agitador mecânico: Ibx instruments;
- Peneiro de malhas 212 μm ;
- Eléctrodo de pH: Mettler Toledo;
- Placa de agitação: Heidolph MR 3001;
- Agitadores magnéticos;
- Estufa de secagem com vácuo;
- Material diverso de laboratório.

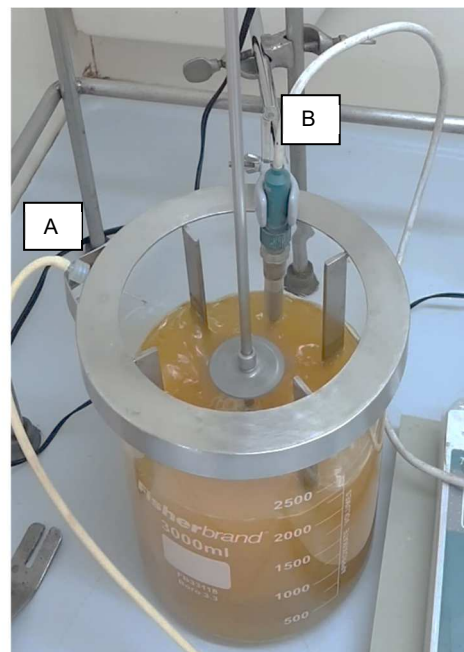


Figura 3.1 - Montagem da etapa de precipitação: copo de vidro de 3L, equipado com baffles e agitador tipo turbina Rushton.
Legenda: A- Mangueira de adição da solução de Reagente B através da bomba peristáltica. B- Eléctrodo de pH.

⊗ **Matérias-primas consumidas:**

- Reagente A:
Produto interno Cipan; Lote nº MP9044000120.
- Água purificada:
Produto interno Cipan.
- Adjuvante de filtração A:
Dicalite Management Group; Lote nº MP9008500420.
- Adjuvante de filtração B:
Dicalite Management Group; Lote nº MP9008600319.
- Solvente C (>96%):
Produto interno Cipan; Código Cipan: 90595020.
- Reagente B (98%):
Panreac; Lote nº MP9038000215.
- Ácido A:
Chem-Lab.
- Solução básica A:
Base A: LabChem.
- Adjuvante de filtração C:
Chemviron France; Lote nº MP9033000749.

⊗ **Trabalho desenvolvido:**

O trabalho desenvolvido para melhorar o processo de produção de oxitetraciclina cálcica, teve como base, variações provocadas no processo original utilizado pela Cipan, em cada síntese executada em laboratório. O procedimento interno para produção de oxitetraciclina cálcica à escala laboratorial, encontra-se descrita no documento C330RG05080 [90], assim como no **Anexo A** e, esquematicamente, na **Figura 3.2**.

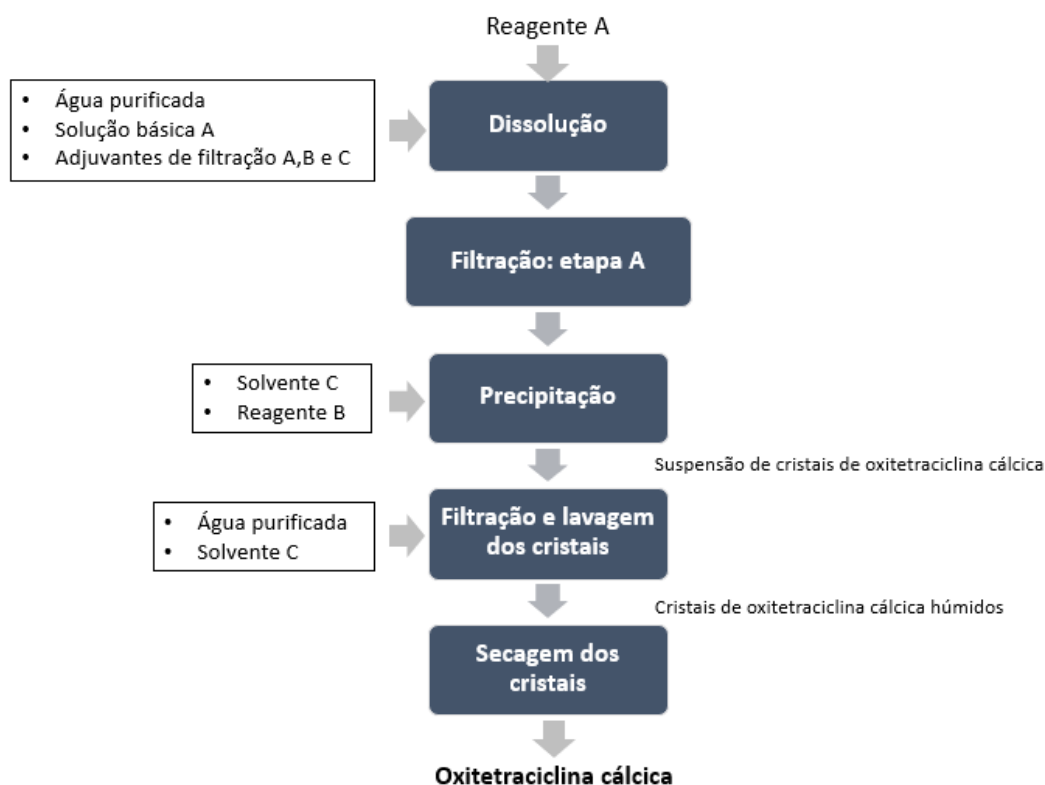


Figura 3.2 - Representação esquemática do procedimento interno Cípan para produção de oxitetraciclina cálcica.

Com o intuito de replicar ao máximo as condições industriais, foram executados os seguintes passos:

- a quantidade de matérias-primas consumidas, foi reduzida na mesma proporção em relação à matéria-prima principal, neste caso, o Reagente A.
- foram utilizados equipamentos com semelhança geométrica. Assim, tratando-se a precipitação, do passo crítico para obter oxitetraciclina cálcica, foram sempre utilizados, em cada síntese laboratorial, um agitador com turbina Rushton e *baffles* num copo de 3L, de forma a simular as condições operatórias do reator industrial (**Figura 3.1**).

Na **Figura 3.3** encontram-se, por ordem temporal de realização dos ensaios, as condições estudadas, com vista à sua alteração no procedimento original, para otimização do método de fabrico de oxitetraciclina cálcica. De salientar que se procedeu a um ajuste da quantidade de Reagente B adicionada, uma vez que este se apresenta 30% em excesso molar no processo original.

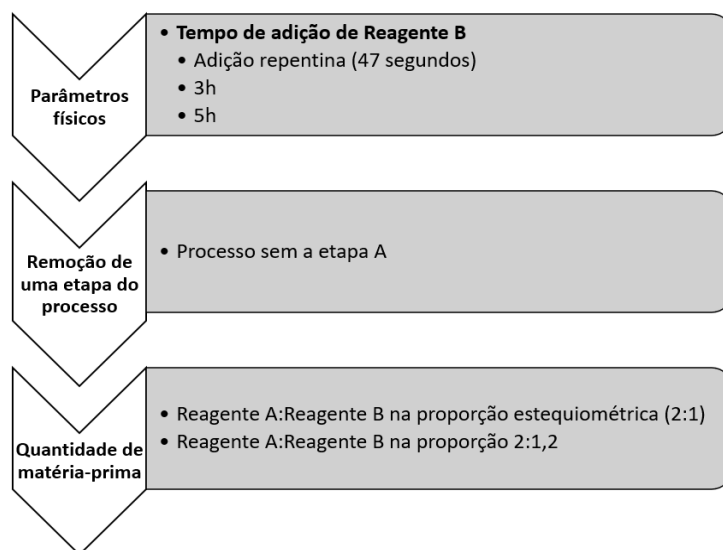


Figura 3.3 – Esquema temporal das alterações feitas ao processo padrão em cada ensaio, para aumento da qualidade de oxitetraciclina cálcica.

3.1.1 Aumento de escala

Após se conseguir atingir um procedimento laboratorial que levou a um aumento da qualidade da oxitetraciclina cálcica, o mesmo foi testado numa escala superior, de forma a verificar se as características do produto se mantinham. Desta forma, o processo laboratorial otimizado foi executado no denominado “Kilo-lab” (**Figura 3.4**). Trata-se de uma escala superior à de laboratório, mas inferior à escala piloto.

⊗ Equipamento:

- Reator de 110L, aço inoxidável, equipado com *baffles* e agitador do tipo turbina Rushton com diâmetro = 16 cm: RAP 2759 (**B- Figura 3.4**);
- Reator de 96L, aço inoxidável, equipado com *baffles* e agitador do tipo turbina Rushton: RAP2756 (**D- Figura 3.4**);
- Reator de 20L, vidro, equipado com uma hélice: RAP2751 (**Figura 3.5**);
- Filtro Nutsche com agitação mecânica: FMP2751 (**Figura 3.6**);
- Filtro FL2752 (**C- Figura 3.4**);
- Bomba peristáltica: Masterflex (**A- Figura 3.4**);
- Eléctrodo de pH: Mettler Toledo;
- Estufa de secagem com vácuo;
- Material diverso de Kilo-lab.

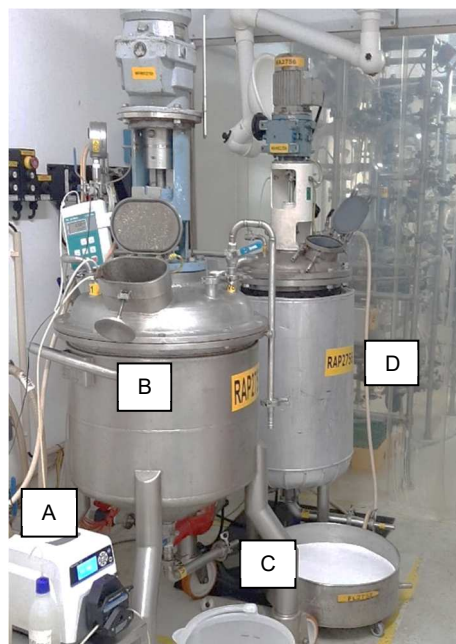


Figura 3.4 - Equipamento de Kilo-lab utilizado no processo otimizado de oxitetraciclina cálcica. Legenda: A-Bomba peristáltica; B- Reator RAP2759; C-Filtro FL2752 com tela; D-Reator RAP2756.



Figura 3.5 - Reator de 20L de vidro, equipado com uma hélice: RAP2751.



Figura 3.6 - Filtro Nutsche com agitação mecânica: FMP2751.

⊗ Procedimento realizado:

Foram realizados 2 ensaios do mesmo processo em diferentes equipamentos (Ensaio 1 e Ensaio 2). As suas execuções foram divididas entre o Kilo-lab e o laboratório. A **Tabela 3.1** indica os equipamentos utilizados em cada etapa do processo em cada ensaio. De salientar que o Ensaio 2 foi propositadamente dividido de forma a comparar a precipitação no Kilo-lab (ensaio 2.1) vs. a precipitação em laboratório (ensaio 2.2).

Tabela 3.1 - Equipamento utilizado em cada etapa do processo nos ensaios do Kilo-lab.

Etapa	Ensaio 1	Ensaio 2.1	Ensaio 2.2
1.Etapa A	Reator vidro de 20L RAP2751 (Figura 3.5)		
2. Preparação da Solução de Reagente B	Copo de 3L em laboratório	Copo de 1L em laboratório	
3	Reator de 96L RAP2756 (representado por D na Figura 3.4)	Copo inox de 12L, equipado com <i>baffles</i> e agitador	
4	Filtro Nutsche FMP2751 (Figura 3.6)	Filtro Buchner	
5.Precipitação	Reator de 110L RAP2759 (representado por B na Figura 3.4)	Reator vidro de 20L RAP2751 (Figura 3.5)	Copo de 3L em laboratório
6.	Filtro FL2752 com tela (representado por C na Figura 3.4)	Filtro Buchner 6L	Filtro de placa porosa (laboratório)
7	Estufa de Laboratório		

3.2 Desenvolvimento de método analítico para estudo da Limeciclina

Neste subcapítulo serão apresentadas as fases de testes realizadas para o desenvolvimento do novo método analítico para estudo de Limeciclina, assim como o procedimento de validação do mesmo.

⊗ Equipamento:

- UHPLC: Waters ACQUITY Arc QSM 2998, equipado com detetor UV-PDA e detetor QDA;
- Coluna Onyx monolithic C18, com dimensões 100mm x 3,0mm;
- Balança analítica: Mettler toledo AG285, gama de trabalho entre 0 e 210g;
- Medidor de pH: Mettler toledo;
- Material diverso de laboratório.

⊗ Reagentes:

- Água purificada, obtida por sistema MilliQ: Merck.
- Solvente B para HPLC: Carlo Erba.
- Aditivo A para cromatografia (≥99%): Sigma-Aldrich.
- Aditivo B (≥99,8%) para LC-MS: VWR.
- Aditivo C (≥99%) para LC-MS: VWR.
- Ácido A: Chem-Lab.

⊗ Padrões:

- Reagente C FE;
- Cloridrato de 4-epitetraciclina FE;
- Cloridrato de anidrotetraciclina FE;
- Cloridrato de 4-epianidrotetraciclina FE.

✿ **Desenvolvimento de novo método analítico:**

O método foi desenvolvido com base no método para doseamento de tetraciclina, segundo a USP (*United States Pharmacopeia*) [91]. Os parâmetros inicialmente adotados, encontram-se apresentados na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2 - Condições cromatográficas de partida para desenvolvimento do novo método de Limeciclina.

Parâmetros	Descrição		
<i>Coluna</i>	<i>Onyx monolithic C18, 100 mm x 3.0 mm</i>		
<i>Temperatura da coluna</i>	X °C		
<i>Temperatura da câmara das amostras</i>	X °C		
<i>Comprimento de onda</i>	X nm		
<i>Volume de injeção</i>	X µL		
<i>Fluxo</i>	X mL/min		
<i>Tempo de corrida</i>	X min		
	Tempo de corrida (min.)	%Fase móvel aquosa	%Fase móvel orgânica
	X	90	10
<i>Gradiente</i>	X	90	10
	X	60	40
	X	90	10
	X	90	10
	X	90	10
<i>Fase Móvel Aquosa</i>	Solvente A		
<i>Fase Móvel Orgânica</i>	Solvente B		
<i>Diluyente</i>	Solvente A		

Parâmetros da **Tabela 3.2** foram sucessivamente alterados em diferentes fases de testes, de forma a obter um método analítico compatível com LC-MS e com boa resolução entre picos.

Foi definido um solvente orgânico a utilizar durante este processo, o Solvente B, com grau de gradiente para HPLC.

Relativamente à fase móvel aquosa, e uma vez que se pretende que esta seja compatível com LC-MS, foram selecionados os seguintes aditivos [85]:

- Aditivo A;
- Aditivo B;
- Aditivo C.

Para além das fases móveis aquosas, também as diferentes soluções em que foi diluída a amostra (diluentes), foram preparadas com estes aditivos.

Para todas as análises efetuadas relativas ao desenvolvimento do novo método analítico, foi utilizada Limeciclina de um dos lotes da indústria. Esta é imediatamente injetada, de forma a limitar a sua degradação, após ser dissolvida numa solução de diluente e Solvente B, numa proporção 90:10, respetivamente. A metodologia seguida em cada fase de testes para o desenvolvimento do novo método analítico, encontra-se representada na **Tabela 3.3**

Tabela 3.3 - Condições de realização de cada experiência de desenvolvimento de método analítico para Limeciclina, de acordo com cada fase de testes.

Fase de testes	Nº da experiência	Fase móvel aquosa	Fase móvel orgânica	Diluyente	Fluxo (ml/min)	Gradiente T = tempo de corrida (min) Razão _{aquosa/ orgânica}
1ª fase: Seleção da fase móvel aquosa	1	H ₂ O + aditivo A (pH 2,1)	Solvente B	Solvente A	0,9	T=x: 90/10
	2	H ₂ O + aditivo B				T=x: 90/10
	3	H ₂ O + aditivo C				T=x: 60/40
	4	H ₂ O + aditivo A				T=x: 90/10
	5	H ₂ O + aditivo A				T=x: 90/10
2ª fase: Seleção do diluyente	6	H ₂ O + aditivo A (pH 2,1)	Solvente B	H ₂ O + aditivo A (pH 2,1)	0,9	T=x: 90/10 T=x: 90/10 T=x: 60/40 T=x: 90/10 T=x: 90/10
	7			H ₂ O + aditivo B (pH 3,1)		
	8			H ₂ O + aditivo C (pH 3,1)		
	9	H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)		H ₂ O + aditivo B (pH 3,1)		
	10			H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)		
3ª fase: Alteração da fase móvel orgânica	11	H ₂ O + aditivo A (pH 2,1)	Solvente B: FM aquosa (90:10)	H ₂ O + aditivo A (pH 2,1)	0,9	T=x: 90/10 T=x: 90/10 T=x: 60/40 T=x: 90/10 T=x: 90/10
	12			H ₂ O + aditivo B (pH 3,1)		
	13	H ₂ O + aditivo A (pH 2,5)		H ₂ O + aditivo A (pH 2,5)		
	14			H ₂ O + aditivo B (pH 3,1)		
	15	H ₂ O + Aditivo A (pH 2,3)		H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)		
	16			H ₂ O + aditivo B (pH 3,1)		
4ª fase: Alteração do fluxo	17	H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)	Solvente B: FM aquosa (90:10)	H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)	0,7	T=x: 90/10 T=x: 90/10 T=x: 60/40 T=x: 90/10 T=x: 90/10
	18		Solvente B		0,5	
	19				0,7	
	20				0,5	
5ª fase: Alteração do gradiente	21	H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)	Solvente B	H ₂ O + aditivo A (pH 2,3)	0,7	T=x: 85/15 T=x: 60/40 T=x: 85/15
	22					T=x: 82/18 T=x: 60/40 T=x: 82/18
	23					T=x: 93/7 T=x: 60/40 T=x: 93/7
	24					T=x: 89/11 T=x: 60/40 T=6,1-8: 89/11
	25					T=x: 88/12 T=x: 60/40 T=x: 88/12

Preparação de soluções:

- **Solução Solvente A**

Misturar 10 volumes de A e 990 volumes de água purificada.

- **Soluções aquosas de Aditivo A / Aditivo B / Aditivo C com diferentes pH**

Misturar água purificada com Aditivo A/ Aditivo B / Aditivo C, fazendo o respetivo acerto de pH (1,5; 2,1; 2,3; 2,5; 3,1)

- **Solução Amostra de Limeciclina**

Pesar 31 mg (+/- 10%) de amostra de Limeciclina para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 15 mL de diluente e agitar no vórtex até dissolução completa da amostra (aproximadamente 1 minuto). Iniciar a contagem do tempo entre a dissolução e injeção da amostra. Adicionar 5 mL de solvente B e completar o volume com diluente.

- **Solução Amostra Padrão de Reagente C**

Pesar 25 mg (+/- 10%) de padrão de Reagente C para um balão volumétrico de 50 mL e dissolver com diluente. Adicionar 5 mL de solvente B e completar o volume com diluente.

3.2.1 Validação do método analítico

O processo de validação incluiu a análise de várias características, nomeadamente:

- Especificidade;
- Linearidade;
- Limites de deteção e quantificação;
- Precisão;
- Exatidão.

A metodologia e fórmulas utilizadas para realização da análise dos parâmetros de validação, encontra-se seguidamente descrita.

1. Especificidade

Foi preparada uma amostra complexa (multi-componente) constituída de impurezas conhecidas do Reagente C, de modo a averiguar se o método é capaz de distinguir este composto, relativamente a outras substâncias presentes na amostra [89].

Preparação da amostra complexa

Pipetar para um balão volumétrico de 25 mL:

- 1,0 mL de solução de Reagente C;
- 2,0 mL de solução stock de 4-epitetraciclina;
- 5,0 mL de solução stock de 4-epianidrotetraciclina.

Completar com HCl 0,01M.

- **Solução de Reagente C:**

Pesar 25,0 mg de padrão de Reagente C para um balão volumétrico de 25mL e dissolver em HCl 0,01M.

- **Solução stock de 4-epitetraciclina:**

Pesar 25,0 mg de padrão de cloridrato de 4-epitetraciclina para um balão volumétrico de 100mL e dissolver em HCl 0,01M

- **Solução stock de 4-epianidrotetraciclina:**

Pesar 20,0 mg de padrão de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina para um balão volumétrico de 100mL e dissolver em HCl 0,01M

2. Linearidade

Foram preparadas três soluções-mãe, a partir de padrão de Reagente C. De seguida, foram realizadas 8 diluições de cada uma das soluções-mãe preparadas, com diferentes concentrações. Um total de 24 soluções foram preparadas para aferir a linearidade do método. Posteriormente, é realizada a análise estatística dos resultados. Os valores da média da área obtidos são graficamente dispostos em função da concentração da solução (mg/mL). Obtém-se assim, a reta de calibração linear. Para que seja verificada a linearidade, o coeficiente de correlação, r , deve tomar valores iguais ou superiores a 0,999 para o produto principal, neste caso, o Reagente C [89].

Foram adicionalmente realizados os seguintes testes estatísticos para avaliar a linearidade do método:

- Análise de resíduos e teste de *Mandel*;
- Teste de *Rikilt*;
- Teste de homogeneidade de variância;

❖ Análise de resíduos e teste de *Mandel*:

A análise de resíduos é feita através da representação gráfica da concentração em função dos resíduos. Confirma-se a linearidade do método se os resultados do gráfico se apresentarem aleatoriamente distribuídos, sem nenhuma tendência definida [92]. Os valores dos resíduos, para cada nível de concentração, são obtidos com base nos valores médios das áreas obtidas de acordo com a **Equação 3.1**.

$$\text{Resíduos} = \bar{y} - y_{\text{estimado}} = \bar{y} - (Bx + C)$$

Equação 3.1

Em que:

$\bar{y}$ – Média dos valores de área obtidos para cada concentração analisada;

x – Concentração (mg/mL);

B – Declive da reta de calibração linear;

C – Ordenada na origem da reta de calibração linear.

A análise gráfica dos resíduos pode ser considerada subjetiva para tomar uma decisão relativamente ao ajuste que melhor se adequa à função. Assim, foi complementada com o teste de *Mandel*. Este teste estatístico tem como objetivo comprovar se a função é linear ou não-linear, através do ajuste da curva de calibração a uma equação polinomial de 2º grau [72,73].

Para aplicar o teste de Mandel é necessário calcular os desvios padrão residuais, tanto para o ajuste linear como para a equação de 2º grau. Estes são designados por S_{y1} e S_{y2} e obtidos pela **Equação 3.2** e **Equação 3.3**, respetivamente.

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{y}_i - y_{1\text{estimado}})^2}{N - 2}}$$

Equação 3.2

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

Equação 3.3

Em que:

$\bar{y}$ – Média dos valores de área obtidos para cada concentração analisada;

$y_{1\text{estimado}}$ - Valor estimado pela equação linear no nível de concentração i ;

$y_{2\text{estimado}}$ - Valor estimado pela equação de 2º grau no nível de concentração i ;

N – Número de concentrações alvo analisadas.

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela **Equação 3.4** e o teste PG pela **Equação 3.5** [89].

$$DS^2 = (N - 2)S_{y1}^2 - (N - 3)S_{y2}^2$$

Equação 3.4

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

Equação 3.5

O valor do teste PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher com um nível de significância de 0,05: $F_{(0,05; f1=1; f2=N-3)}$.

- Se $PG \leq F$: a reta de calibração é linear.
- Se $PG > F$: a reta de calibração não é linear. Neste caso, a gama de trabalho deverá ser ajustada de forma a obter uma reta de calibração linear.

❖ **Teste de Rikilt:**

O teste de *Rikilt* possibilita a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para tal, é calculado o fator de resposta $FR_{(y/x)}$ para cada par ordenado da reta de calibração. Este é obtido através do quociente entre a média da área (y_i) e a sua concentração correspondente (x_i) (**Equação 3.6**).

$$FR_{(y/x)} = \frac{y_i}{x_i} \quad \text{Equação 3.6}$$

Onde i representa cada ponto da reta de calibração linear. Calcula-se também o fator de resposta médio (**Equação 3.7**).

$$\overline{FR_{(y/x)}} = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{y_i}{x_i}}{N} \quad \text{Equação 3.7}$$

Para assumir linearidade ideal, cada fator de resposta calculado, correspondente a cada ponto da reta, deverá ser igual ao fator de resposta médio. Assim, como critério de aceitação, define-se que a razão percentual entre estes valores deve estar compreendida entre 90% e 110%.

❖ **Teste de homogeneidade de variâncias:**

Este teste consiste na determinação das variâncias associadas ao primeiro ($S^2_{i=1}$) e último ponto ($S^2_{i=N}$) da gama de trabalho, através da **Equação 3.8**.

$$S^2_i = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n - 1} \quad \text{Equação 3.8}$$

Em que:

i – Corresponde a cada concentração analisada (de $i=1$ a $i=N$);

j – Corresponde a cada repetição de cada concentração analisada (de $j=1$ a $j=n$).

As variâncias são determinadas de modo a avaliar diferenças significativas nos limites da gama de trabalho. Para tal, procede-se ao cálculo do teste PG (**Equação 3.9** e **Equação 3.10**).

• Quando $S^2_N > S^2_1$:

$$PG = \frac{S^2_N}{S^2_1} \quad \text{Equação 3.9}$$

• Quando $S^2_N < S^2_1$:

$$PG = \frac{S^2_1}{S^2_N} \quad \text{Equação 3.10}$$

Compara-se o valor do teste PG com o valor tabelado da distribuição F de Fisher com um nível de significância de 0,10: $F_{(0,10; n-1; nN-1)}$.

- Se $PG \leq F$: não existem diferenças significativas entre variâncias e a gama de trabalho encontra-se bem ajustada.

-
- Se $PG > F$: existem diferenças de variâncias. Neste caso, a gama de trabalho deve ser reduzida até se obter $PG \leq F$ [89].

3. Limites de deteção e quantificação

Os limites de deteção (L.D.) e quantificação (L.Q.) são calculados através da **Equação 3.11** e **Equação 3.12**, respetivamente.

$$L. D. = \frac{3,3 S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 3.11}$$

$$L. Q. = \frac{10 S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 3.12}$$

Em que:

$S_{y/x}$ – Desvio padrão residual da curva de calibração linear (dado pela **Equação 3.2**).

b – Declive da curva de calibração linear.

4. Precisão

4.1. Repetibilidade

Foram preparadas sete amostras de Reagente C. Uma delas, a solução padrão de trabalho, injetada 6 vezes. As restantes seis amostras, soluções de repetibilidade, injetadas uma vez, cada uma.

4.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório e equipamento, mas realizado por diferentes analistas em diferentes dias. Foram igualmente preparadas sete amostras de Reagente C. Uma delas, a solução padrão de trabalho, injetada seis vezes. À semelhança das soluções de repetibilidade, as restantes seis amostras, soluções de precisão intermédia, foram também injetadas uma vez, cada uma.

De modo a avaliar a precisão do método, são determinados:

- o limite de repetibilidade (r);
- o coeficiente de variação (CV);
- Testes estatísticos T e F , de forma a comparar a precisão entre métodos realizados por cada analista.

❖ **Limite de repetibilidade (r):**

O limite de repetibilidade, r , é o valor abaixo do qual se deve situar, normalmente com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, (X_i, X_{i-1}) . Na prática, aceitam-se duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade, se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$, sendo r avaliado segundo a **Equação 3.13**.

$$r = 1,96 \sqrt{2} S_r$$

Equação 3.13

Onde:

S_r - Desvio-Padrão do conjunto dos dados obtidos.

❖ **Coeficiente de variação (CV):**

O coeficiente de variação de repetibilidade, CV, é numericamente igual ao quociente entre o desvio-padrão de repetibilidade (S_r) e a média dos valores obtidos ($\bar{x}$). Isto é, o valor de CV, expresso em percentagem, é equivalente ao valor de %RSD (**Equação 3.14**). Como critério de aceitação, o valor do coeficiente de variação deve ser inferior a 10%.

$$CV = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 3.14

❖ **Comparação estatística da precisão entre métodos:**

Para comparar os ensaios realizados por cada analista, foi realizado o teste F, que verifica a semelhança estatística entre variâncias e, seguidamente, o teste T, que verifica a semelhança estatística entre as médias dos resultados obtidos.

O teste F é utilizado para testar a hipótese nula de que as variâncias de dois conjuntos de dados são iguais. Assim, para os valores de %PC obtidos, tem-se que:

$$\text{Hipótese nula, } H_0: \sigma^2_{\%PC, \text{analista 1}} = \sigma^2_{\%PC, \text{analista 2}}$$

$$H_1: \sigma^2_{\%PC, \text{analista 1}} \neq \sigma^2_{\%PC, \text{analista 2}}$$

Calcula-se o valor de F para a razão de variâncias entre os dois métodos, 1 e 2, (**Equação 3.15**), e compara-se com o valor tabelado da distribuição F de Fisher com um nível de confiança de 95%: $F_{(\frac{\alpha}{2}, n_1-1; n_2-1)}$. Sendo “n” a dimensão de cada conjunto de valores.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}, \text{ onde } \sigma_1 > \sigma_2$$

Equação 3.15

- A hipótese nula é rejeitada se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$. Neste caso, as variâncias dos resultados obtidos pelos métodos são estatisticamente diferentes.
- Caso contrário, verifica-se que os resultados obtidos pelos dois métodos não são estatisticamente diferentes.

Após verificar que as variâncias são estatisticamente semelhantes para os dois ensaios, foi realizado o Teste T. Este teste é utilizado para testar a hipótese nula de que as médias de dois conjuntos de dados, são iguais. Assim, tem-se que:

$$\text{Hipótese nula, } H_0: \mu_{\%PC, \text{analista 1}} = \mu_{\%PC, \text{analista 2}}$$

$$H_1: \mu_{\%PC, \text{analista 1}} \neq \mu_{\%PC, \text{analista 2}}$$

Calcula-se o valor t da estatística de teste (**Equação 3.16**). Seguidamente compara-se este valor com o valor tabelado da distribuição de t-student: $t_{(\frac{\alpha}{2}, n_1 + n_2 - 2)}$.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} \quad \text{Equação 3.16}$$

- A hipótese nula é rejeitada se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$. E portanto, as médias dos resultados obtidos pelos métodos são estatisticamente diferentes.
- Caso contrário, as médias dos dois métodos não são estatisticamente diferentes.

Ambos os testes estatísticos foram executados com recurso ao Excel através da ferramenta “Análise de dados”.

5. Exatidão

De forma a avaliar a exatidão do método, foram preparadas nove soluções de Reagente C: três réplicas a três níveis de concentração para cada (80%, 100% e 120%). Seguidamente, calcula-se a taxa de recuperação face à média das áreas de uma solução padrão de trabalho do mesmo composto, injetada seis vezes. A taxa de recuperação, para cada solução preparada, é obtida pela **Equação 3.17**.

$$\% \text{Recuperação} = \frac{C_{\text{Experimental}}}{C_{\text{Teórica}}} \times 100 \quad \text{Equação 3.17}$$

Em que:

$$C_{\text{Experimental}} = \frac{\text{Massa pesada}}{\text{Volume total de solução}} \quad \text{Equação 3.18}$$

e

$$C_{\text{Teórica}} = \frac{C_{\text{Padrão de Trabalho}} \times \text{Área média}_{\text{Padrão de Trabalho}}}{\text{Área obtida}} \quad \text{Equação 3.19}$$

Como critério de aceitação, os valores da taxa de recuperação devem estar compreendidos entre 95% e 105%.

3.3 Otimização do processo de produção de Limeciclina

Após o desenvolvimento do método analítico que permite o estudo da Limeciclina, procedeu-se aos ensaios laboratoriais para otimização do seu processo de fabrico.

⊗ Equipamento:

À semelhança do sucedido para a oxitetraciclina cálcica, foi igualmente realizado um *downscale* do processo industrial da Limeciclina para a escala laboratorial. Tanto a oxitetraciclina cálcica, como a Limeciclina, são produtos obtidos no setor das TNE da Cipan, possuindo processos de fabrico muito semelhantes entre si. Desta forma, o equipamento utilizado para as sínteses laboratoriais de Limeciclina, foi o mesmo utilizado na otimização do processo de oxitetraciclina cálcica, descrito no **subcapítulo 3.1**.

⊗ Matérias-primas consumidas:

- Reagente C:
Produto interno Cipan; Lote nº MP9044101318.
- Reagente H:
Produto interno Cipan; Lote nº 301.45 Q002.
- Solvente C (>96%):
Produto interno Cipan; Código Cipan: 90595020.
- Reagente D (solução 50%):
SUZHOU YUANFANG CHEMC; Lote nº MP9520601418.
- Reagente F:
Arkema; Lote nº MP9163000120.
- Reagente E (solução 37%):
Honeywell Riedel-de-Haën; Lote nº MP9067500220.

⊗ Trabalho desenvolvido:

O procedimento interno para síntese de Limeciclina à escala laboratorial, encontra-se descrita no documento C330RG05081 [93], assim como no **Anexo B** e, esquematicamente, na **Figura 3.7**.

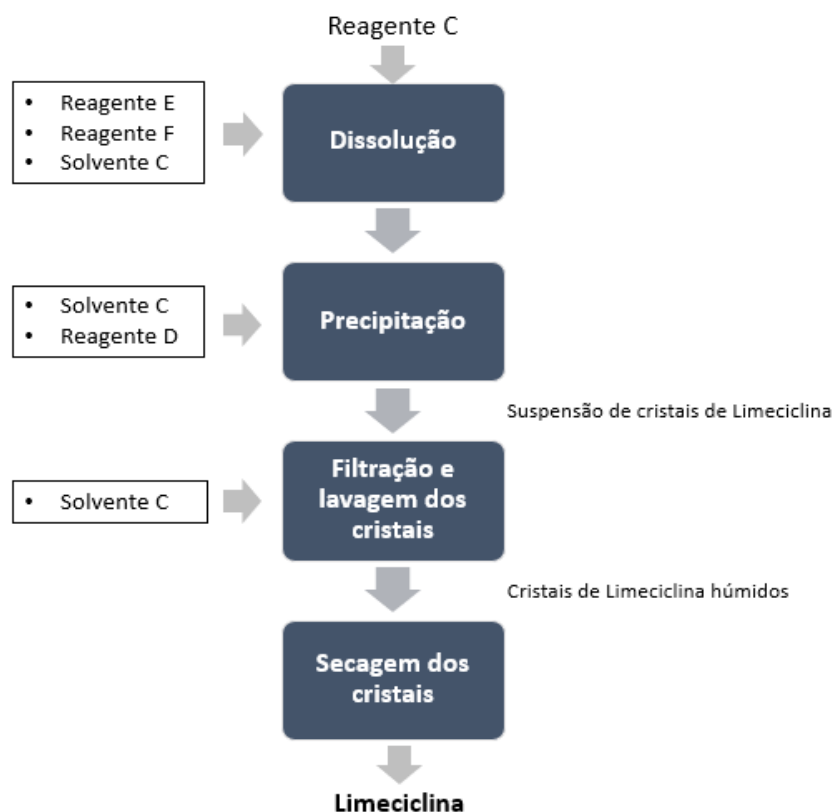


Figura 3.7 - Representação esquemática do procedimento interno Cipan para produção de Limeciclina.

Pressupõem-se que, ao variar as condições físicas do processo padrão que conduzam a um aumento do tamanho de grão de Limeciclina, diminuído assim, a área superficial específica de contacto do pó com a atmosfera, então será possível diminuir a possível absorção de água por parte deste antibiótico. Estas alterações surgem com o objetivo de aumentar a estabilidade da Limeciclina. No seguimento deste raciocínio, foram realizados 4 estudos distintos:

1. DOE com alteração dos parâmetros físicos do processo original, que conduzam ao aumento do grão

Foi realizado um desenho de experiências, variando simultaneamente, face ao procedimento interno, várias condições físicas do processo que influenciam a etapa de crescimento do cristal, durante a precipitação. O DOE foi planeado com recurso a 3 fatores com 3 réplicas, pelo que foram realizadas 24 experiências (3×2^3). Os fatores, assim como os respetivos níveis, podem ser observados na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4 - Descrição dos fatores e respectivos níveis utilizados no DOE para otimização do processo de produção de Limeciclina.

Fator	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
<i>A – Temperatura após total adição da solução de Reagente D</i>	5 – 10 °C	Temperatura ambiente
<i>B – Velocidade de agitação durante a adição da solução de Reagente D</i>	80 rpm	200 rpm
<i>C – Tempo de adição da solução de Reagente D</i>	45 minutos	1h30 minutos

No **Anexo D** encontram-se as matrizes planejamento do DOE na ordem aleatória, utilizada para definir a ordem de realização das experiências, e na ordem *standard*, utilizada para posterior análise de resultados do DOE.

No **Anexo E** consta a explicação para a construção de todas as tabelas, assim como as fórmulas utilizadas, necessárias para o tratamento de resultados.

Após a síntese dos 24 lotes de Limeciclina, obtidos em cada uma das 24 experiências do DOE, estas foram analisadas e seguidamente submetidas a condições de estabilidade acelerada. Isto é, armazenadas durante dois meses numa câmara a 40°C com 75% de humidade. Foram escolhidas estas condições, pois para além de serem críticas (caso fossem escolhidas condições mais banais, haveria o risco de não se observar diferenças no produto), são também aquelas que mais se aproximam das condições meteorológicas dos países para os quais se pretende aumentar o mercado de Limeciclina.

Posteriormente a este período, as 24 amostras foram reanalisadas de forma a identificar as diferenças nos parâmetros de especificação e principalmente, qual a combinação de níveis do DOE que levou a um produto mais estável.

2. Processo com matérias-primas de partida diferentes do processo original

Na reação de síntese de Limeciclina, devido à adição de Reagente F, forma-se Subproduto A como produto secundário. Este poderá afetar a estabilidade da Limeciclina. Assim, foi realizado um ensaio com o objetivo de eliminar a adição de Reagente F do processo, substituindo-o por Reagente H.

O procedimento para realização deste ensaio segue os seguintes princípios:

- Preparação da solução de Reagente D com Solvente C;
- Reação em Solvente C (20V/P)¹;
- Reagente H (1 eq.) + Reagente D (1 eq.) + Reagente E (1 eq.)

¹ V/P – Volume de Solvente C por massa de Reagente H.

-
- Após total adição da solução de Reagente D durante 45 minutos, deixar sob agitação durante duas horas à temperatura ambiente. Seguidamente, filtração dos cristais de Limeciclina.

3. Aumento de massa por absorção de água da atmosfera

De modo a comprovar a higroscopicidade da Limeciclina, ou seja, o aumento de massa por absorção de água da atmosfera, uma porção de pó (2,00 g) de um lote aleatório deste produto, foi colocada numa placa de Petri descoberta. Esta foi pesada no dia 0 e em diferentes intervalos de dias, durante cerca de três meses.

4. Apresentação e Discussão de Resultados

4.1 Otimização do processo de produção de Oxitetraciclina cálcica

A especificação para a oxitetraciclina cálcica, encontra-se na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 – Limites de especificação da oxitetraciclina cálcica, de acordo com a BP.

pH	Rotação específica (%an)	IAL (430n)	IAL (490nm)	Doseamento (%an)	Humidade (%)	Metanol residual (ppm)	Cálcio (%an)
6,0 - 7,5	-194 a -210	≤0,30	≤ 0,20	90 - 100,5	≤15	<3000	3,90 - 4,20

⊗ Alteração dos parâmetros físicos:

- Tempo de adição da solução de Reagente B

Uma vez que a síntese laboratorial possui uma dimensão inferior à industrial, foi necessário ajustar o tempo de adição da solução de Reagente B, diminuindo-o, aumentando o caudal. Desta forma, é promovida a adição em contínuo, tal como se observa industrialmente, em vez de uma adição pulsada.

Para além da realização do ensaio padrão com 7h, estudou-se o efeito na oxitetraciclina cálcica para uma adição repentina da solução de Reagente B, para 3h e 5h. Cada ensaio foi realizado apenas uma vez, à exceção do ensaio de 3h e 5h, que foram repetidos uma vez, cada um. No entanto, a análise de cálcio no LFQ, foi feita em replicado. Os resultados podem ser visualizados na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2 - Valores de %cálcio correspondente a cada ensaio com diferentes tempos de adição da solução de Reagente B.

	Adição repentina (47s)	Adição em 3h	Adição em 3h (repetição)	Adição em 5h	Adição em 5h (repetição)	Adição em 7h
%Ca	4,47 5,04	4,48 4,87 4,95	4,63 4,65	3,13 3,58 3,62 3,70 3,72	4,42 4,45	3,89 3,66 4,01
Média	4,76	4,77	4,64	3,55	4,44	3,85

A **Tabela 4.2** permite observar que 94% dos valores de doseamento de cálcio estão fora dos limites de especificação. Adicionalmente, verifica-se que para o mesmo lote, apresentam uma variabilidade de valores muito elevada. Desta forma, é difícil retirar conclusões, pelo que foi representada graficamente a média dos resultados obtidos para cada ensaio (**Figura 4.1**).

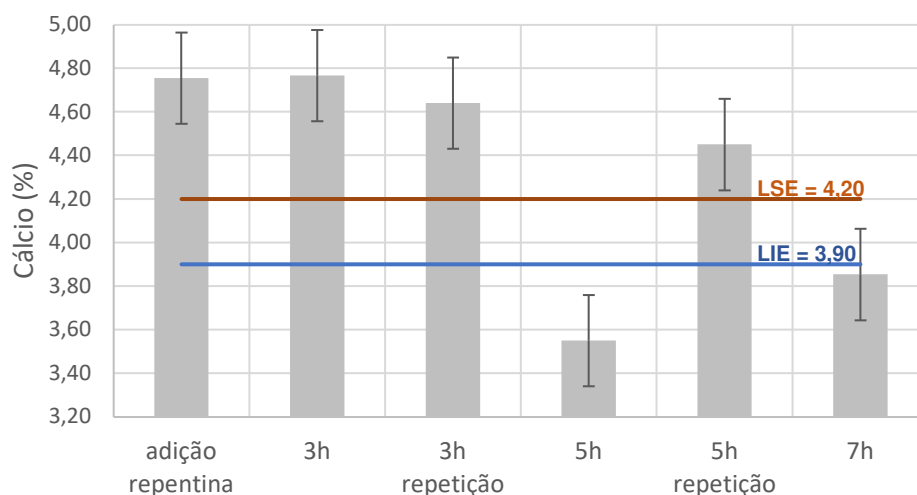


Figura 4.1 – Representação gráfica da média dos resultados de %cálcio, para cada ensaio de alteração do tempo de adição da solução de Reagente B. Legenda: LSE – Limite superior de especificação; LIE – Limite inferior de especificação.

A partir da **Figura 4.1** é possível observar uma tendência: adições mais rápidas levam a uma maior percentagem de cálcio e adições mais lentas conduzem a uma menor percentagem de cálcio no produto. Estes dados podem ser explicados assumindo a formação de uma série de diferentes espécies moleculares [12]. Ou seja, tempos de adição de Reagente B mais rápidos correspondem a caudais mais elevados, consequentemente, a proporção de Reagente B adicionada em cada instante, é superior comparativamente a tempos de adição mais lentos. Essa sobressaturação momentânea no ponto de adição de soluto adicionada na solução, faz com que se formem, de acordo com Kenneth et al., (1962) [20], complexos do tipo 1:1 de oxitetraciclina: cálcio e na proporção de 1:2, tal como representado na **Figura 4.2**. Para além de complexos formados com a oxitetraciclina, o cálcio poderá formar outros complexos, como é o caso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Os valores obtidos para o doseamento de oxitetraciclina cálcica (na **Tabela C.1** do **Anexo C**) corroboram esta hipótese, uma vez que se verificam doseamentos superiores para tempos de adição mais longos e vice-versa.

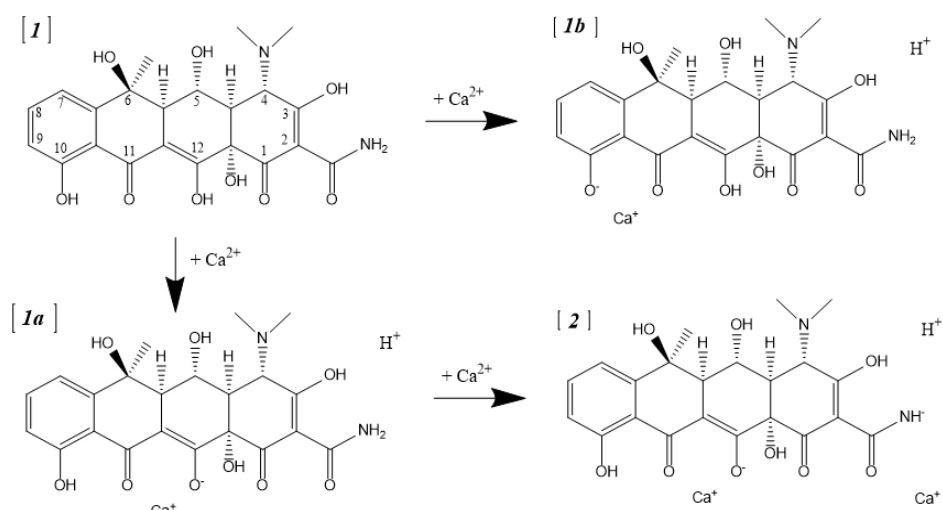


Figura 4.2 - Proposta de sequência de reação de oxitetraciclina com cálcio. Adaptado de: Kenneth et al., (1962)[20].

Verifica-se também que para a repetição do mesmo procedimento, como é o caso do ensaio com 5h e respetiva repetição, se obtêm valores muito discrepantes de %Ca na oxitetraciclina cálcica. Tal leva a crer, uma vez que foram mantidas todas as condições do processo, que existe algum fator que faz variar a quantidade de cálcio no produto. Esse fator poderá ser a existência de uma elevada quantidade de Solvente C na amostra, como consequência de uma secagem pouco eficiente (valores na **Tabela C.1** do **Anexo C**). Os resultados de cálcio são expressos em percentagem de massa, ou seja, relativamente à massa de amostra inicialmente pesada. Tratando-se o valor de cálcio, anidro, então o seu cálculo já desconta a quantidade de água na amostra. No entanto, não é descontada a quantidade de Solvente C. Desta forma, se o produto possuir uma quantidade de Solvente C significativa, essa quantidade irá contribuir para o peso da amostra, originando percentagens mais baixas de cálcio.

Um outro parâmetro onde se verificou alterações consoante cada ensaio, foi no tempo de filtração dos cristais de oxitetraciclina cálcica. Adições mais rápidas levaram a um elevado tempo de filtração e com adições lentas obtiveram-se filtrações rápidas. Esta diferença pode ser facilmente explicada pelo facto de quando as adições de Reagente B são muito rápidas, estamos perante um caso em que o grau de sobressaturação é muito elevado. Este é um parâmetro operativo que condiciona a velocidade de crescimento do cristal, que consequentemente, leva a que sejam simultaneamente formados muitos núcleos, levando a que o produto final seja formado por cristais com tamanho muito reduzido, dificultando a etapa de filtração [45].

⊗ **Remoção de uma das etapas do processo:**

- Processo sem a etapa A

Face aos resultados obtidos para a alteração do tempo de adição de Reagente B, foi realizado um ensaio com 5h de adição, sem a etapa de filtração com A, sendo este posteriormente repetido. Foi selecionado o tempo de 5h uma vez que, comparativamente com os restantes, foi o ensaio onde o tempo da etapa de filtração dos cristais de oxitetraciclina cálcica foi mais favorável, assim como os valores percentuais de cálcio. O objetivo deste ensaio, ao eliminar a etapa de purificação da matéria-prima de partida, foi constatar se existe diferença, tanto no doseamento de impurezas, como de cálcio no produto final, que justifique este passo na síntese. Para além de que, a remoção desta etapa, seria economicamente vantajosa para a indústria. Os resultados dos parâmetros mais relevantes da especificação obtidos para este ensaio, nomeadamente o doseamento de impurezas absorventes de luz (IAL), de oxitetraciclina cálcica e de cálcio, encontram-se representados pelas **Figuras 4.3, 4.4 e 4.5**, respetivamente. Os resultados do ensaio realizado com 5h, foram adicionados para termo de comparação. Os

valores destes resultados, assim como os dos restantes parâmetros da especificação, encontram-se na **Tabela C.2** do **Anexo C**.

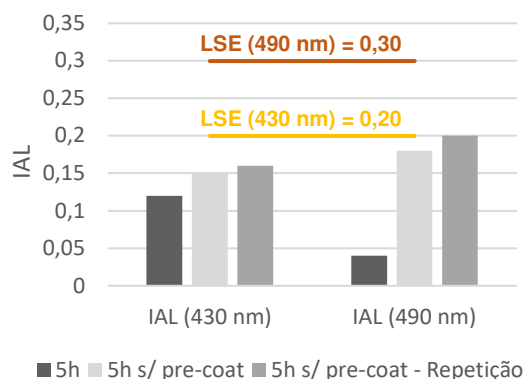


Figura 4.3 - Representação gráfica dos resultados de IAL, para cada ensaio sem A. Legenda: LSE - limites máximos da especificação de IAL lido a 490 nm e 430 nm.

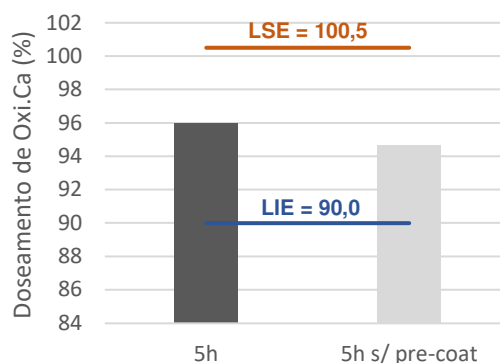


Figura 4.4 - Representação gráfica dos resultados de doseamento de oxitetraciclina cálcica, para cada ensaio sem A. Legenda: LSE e LIE - limite máximo e mínimo da especificação.

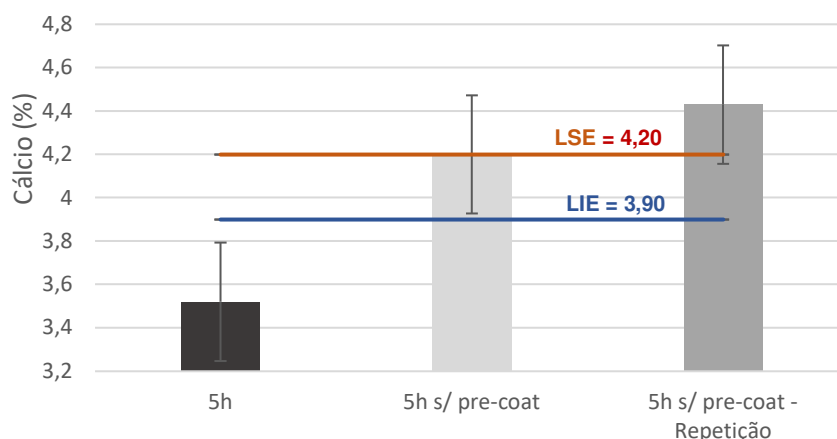


Figura 4.5 - Representação gráfica da média dos resultados de %Cálcio, para cada ensaio sem A. Legenda: LSE e LIE - limite máximo e mínimo da especificação.

Verifica-se que a remoção da etapa A aumenta as IAL (impurezas absorventes de luz) (**Figura 4.3**) e diminui o doseamento de oxitetraciclina cálcica (**Figura 4.4**). Apesar desta variação, ambos os parâmetros permanecem dentro dos limites de especificação. Constatase também que o ensaio sem a realização de A, favorece o aumento de %cálcio numa adição de Reagente B mais rápida – 5h (**Figura 4.5**).

O que possivelmente acontece, é que ocorre perda de Reagente A aquando da sua filtração e lavagem ineficiente pelo A. Desta forma, contribui para que exista Reagente B que não reagiu no produto final, aumentando assim o valor percentual de cálcio na oxitetraciclina cálcica no processo original com adição de Reagente B durante 7h.

⊗ Quantidade de matéria-prima:

- Reagente A: Reagente B na proporção 2:1

Uma vez que no método original, a quantidade de Reagente B se apresenta 30% em excesso molar, então estudou-se o processo com uma quantidade de Reagente A e Reagente B numa proporção estequiométrica. Foram realizadas três sínteses para este estudo: com 5h de adição de Reagente B, com 3h e repetição do ensaio com 3h. Na **Figura 4.6** encontra-se graficamente representada a média dos resultados de %cálcio obtidos para cada ensaio. Os valores obtidos para os restantes parâmetros da especificação, apresentam-se na **Tabela C.3** do **Anexo C**.

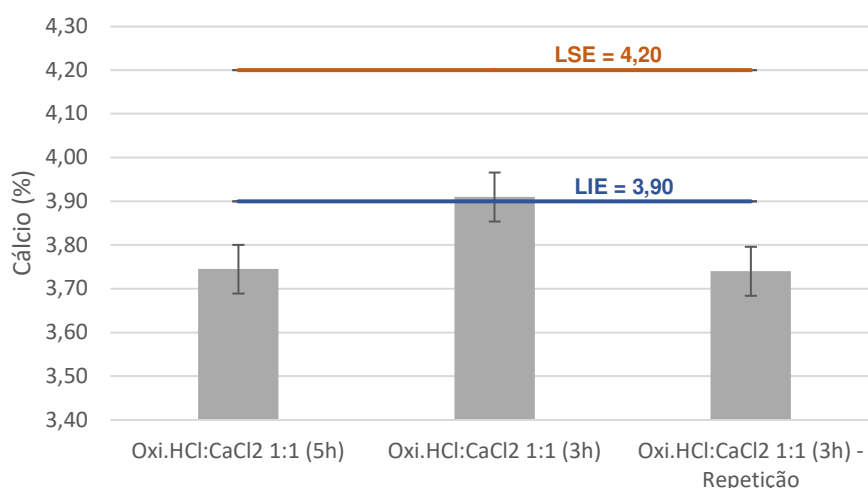


Figura 4.6 - Representação gráfica da média dos resultados de %cálcio, para cada ensaio de Reagente A: Reagente B na proporção estequiométrica 2:1. Legenda: LSE e LIE - limite máximo e mínimo da especificação.

Após a realização do ensaio com proporção estequiométrica com adição em 5h, verificou-se que ainda assim não se obtinha um valor percentual de cálcio dentro da especificação. Assim, tal como foi anteriormente observado: menores tempos de adição conduzem a valores superiores de %cálcio, então realizou-se o mesmo ensaio com 3h de adição da solução de Reagente B.

Obteve-se assim, com a adição em 3h, o primeiro lote de oxitetraciclina cálcica que se encontra dentro de todos os limites da especificação. No entanto, após a repetição deste processo, os valores obtidos de %cálcio são ligeiramente inferiores. Novamente, e uma vez que os restantes parâmetros se encontram dentro de especificação, tal pode acontecer devido à porção de Solvente C que permaneceu no produto devido a uma secagem ineficiente, afetando os valores de cálcio.

- Reagente A: Reagente B na proporção 2:1,2

Com o objetivo de aumentar ligeiramente os valores de cálcio obtidos na proporção 2:1 com 3h de adição, foi também estudado o processo com uma quantidade de Reagente A e Reagente B numa proporção de 2:1,2. Ou seja, um valor intermédio de Reagente B entre a quantidade na proporção estequiométrica e a quantidade que é utilizada no processo original. A média dos

resultados de %cálcio obtidos para cada ensaio, encontra-se graficamente representada na **Figura 4.7**.

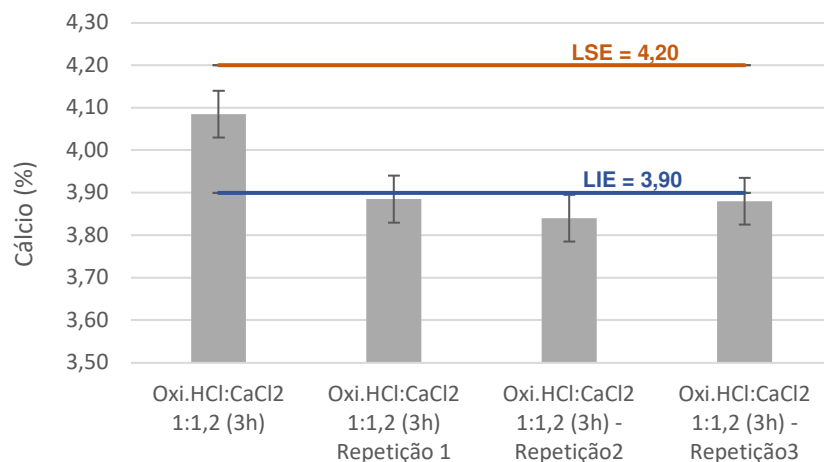


Figura 4.7 - Representação gráfica da média dos resultados de %cálcio, para cada ensaio de Reagente A:Reagente B na proporção 2:1,2. Legenda: LSE e LIE - limite máximo e mínimo da especificação..

Verifica-se, através da **Figura 4.7**, tal como planeado, um ligeiro aumento no doseamento de cálcio, comparativamente com o ensaio na proporção de 2:1. No entanto, os lotes obtidos através das três repetições deste ensaio, encontram-se com valores de cálcio abaixo do limite inferior da especificação. Mais uma vez, dado que os restantes critérios se encontram dentro da especificação (**Tabela C.4** em **Anexo C**), então a causa para este efeito, poderão ser os valores discrepantes de Solvente Cem cada lote.

4.1.1 Aumento de escala

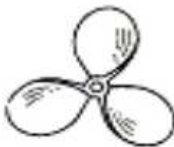
Posteriormente à otimização da síntese de oxitetraciclina cálcica em laboratório, foi realizado o aumento de escala do processo melhorado no Kilo-lab. O processo realizado foi o ensaio com proporção de 2:1,2 de Reagente A: cálcio e 3h de adição de Reagente B.

A proporção de matérias-primas foi aumentada de forma a que, tal como acontece no copo de laboratório para a etapa de precipitação, o nível de líquido se encontrasse a 2/3 da altura do reator para a mesma etapa do processo no kilo-lab.

Tal como foi referido na **Secção 3.1.1**, foram realizados 2 ensaios do mesmo processo (ensaio 1 e ensaio 2 - **Tabela 3.1**), sendo que o segundo ensaio foi propositadamente dividido de forma a comparar a precipitação no kilo-lab (ensaio 2.1) vs. a precipitação em laboratório (ensaio 2.2).

Visto que os ensaios no kilo-lab, foram realizados em equipamentos diferentes, as dimensões e condições operacionais realizadas durante a etapa de precipitação em cada ensaio, encontram-se representadas na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 – Dimensões e condições operacionais da etapa de precipitação no kilo-lab vs. laboratório.

	Laboratório (equivalente ao ensaio 2.2 do kilo-lab)	Ensaio 1 Kilo-lab	Ensaio 2.1 Kilo-lab
<i>Volume do copo/reator (L)</i>	3	110	20
<i>Tipo de agitador</i>	Turbina Rushton 	Hélice naval 	
<i>Diâmetro do agitador (cm)</i>	5,3	16,0	14,5
<i>Velocidade de agitação (rpm)</i>	200 ⁽¹⁾	96 ⁽²⁾	67 ⁽³⁾
<i>Equipado com baffles</i>	Sim		Não
<i>Caudal de adição de Reagente B (mL/min.)</i>	0,28	10,17	1,85

(1) – Utilizada de acordo com o descrito no procedimento original Cipan.

(2) – Obtida de acordo com a **Equação 2.4** descrita no **Subcapítulo 2.5**.

(3) – Intuitivamente ajustada de acordo com o movimento do fluído observado na indústria.

Ensaio 1:

O passo de filtração no filtro FL2752 com tela, foi bastante moroso, pelo que foi retirada uma porção dos cristais de oxitetraciclina cálcica e estes foram filtrados em laboratório durante a noite. A dificuldade na etapa de filtração dos cristais está diretamente relacionada com a falta de crescimento dos mesmos. Tal pode ter ocorrido devido a dois principais motivos durante a precipitação:

- Adição rápida de Reagente B: tal como visto anteriormente, para adições mais rápidas, maior a dificuldade na etapa de filtração. Uma vez que foi aumentada a escala do ensaio, a adição de Reagente B deveria ter sido ajustada às novas dimensões, em vez da utilização das 3h do ensaio laboratorial.
- Colisão do agitador no nível de líquido: o aumento de escala foi programado de modo a que o nível de líquido se encontrasse a 2/3 da altura do reator. No entanto, devido à falta de semelhança geométrica entre o reator do kilo-lab disponível para a precipitação (representado por **B** na **Figura 3.4** da **Secção 3.3.1**) e o copo utilizado em laboratório (**Figura 3.1** do **Subcapítulo 3.1**), fez com que o nível de líquido coincidisse com o último agitador do eixo no reator. Esta instabilidade na agitação do sistema, para além de levar a que a velocidade de nucleação seja muito elevada, formando simultaneamente muitos núcleos, provoca também o choque entre cristais, impossibilitando o seu crescimento. Desta forma, o produto final será constituído por cristais muito pequenos, dificultando a sua filtração.

Ensaio 2:

Devido à escassez de tempo e modo a evitar a situação ocorrida no primeiro ensaio do kilo-lab, o segundo ensaio foi dividido na etapa de precipitação:

- **Ensaio 2.1:** realizado numa proporção relativamente inferior em comparação ao ensaio 1, pelo que a precipitação, tal como consta na **Tabela 4.3**, foi realizada num reator de 20L, substituindo o reator de 110L.
- **Ensaio 2.2:** precipitação realizada no copo laboratorial de 3L, tal como qualquer síntese realizada em laboratório para otimização do processo.

A principal diferença observada entre estes ensaios foi, novamente, a etapa de filtração. O tempo de filtração no ensaio 2.1, à semelhança do ensaio 1, foi bastante extenso, pelo que foi igualmente retirada uma porção dos cristais de oxitetraciclina cálcica e estes foram filtrados em laboratório durante a noite. Relativamente ao ensaio 2.2, a filtração foi bastante rápida.

Tal como se verifica na **Tabela 4.3**, esta diferença na etapa de filtração, pode ser facilmente justificada pelas condições operacionais da precipitação em cada ensaio (ensaio 2.1 vs. laboratório):

- falta de semelhança geométrica;
- diferença nos tipos de agitador, levando a movimentos de circulação distintos no interior do reator, nomeadamente radial e axial para o agitador turbina e hélice, respetivamente [56];
- ausência de baffles no ensaio 2.1, conduzindo à formação de vórtex [47].

Estes são fatores críticos que prejudicam o crescimento dos cristais de oxitetraciclina cálcica. Adicionalmente, verificou-se também que a velocidade de agitação selecionada no ensaio 2.1, poderia ser muito elevada.

A **Tabela 4.4** apresenta os resultados dos parâmetros da especificação obtidos em cada lote de oxitetraciclina cálcica, obtidos respetivamente pelos ensaios descritos no aumento de escala.

Tabela 4.4 – Resultados dos parâmetros de especificação obtidos em cada lote nos ensaios de aumento de escala. Legenda: a vermelho, os valores que constam fora dos limites da especificação.

Ensaio	pH	Rotação Específica (°an)	IAL (430nm)	IAL (490nm)	Humidade (%)	Cálcio (% an)
<i>Ensaio 1</i>	6,9	-189	0,27	0,13	5,3	4,33
<i>Ensaio 2.1</i>	6,9	-192	0,44	0,12	5,0	4,80
<i>Ensaio 2.2</i>	7,5	-200	0,12	0,07	7,9	3,76

Verifica-se, através da **Tabela 4.4**, que os lotes obtidos nos dois ensaios onde ocorreram dificuldades na filtração (ensaio 1 e 2.1), apresentam valores de rotação específica acima do limite superior, assim como os resultados percentuais de cálcio. O valor IAL fora de especificação no ensaio 2.1 pode estar relacionado com o tempo que os cristais demoraram a filtrar. Relativamente aos valores de cálcio, tal como já referido, uma vez que o tempo de adição não foi ajustado às dimensões do ensaio, a rápida adição de Reagente B poderá conduzir à formação de complexos de cálcio com diferentes estequiometrias, contribuindo para elevados valores de %cálcio.

No que diz respeito ao ensaio 2.2 (precipitação em laboratório), verifica-se que o valor de cálcio se apresenta abaixo do limite inferior da especificação. Uma razão plausível para a obtenção deste valor é a existência de oxitetraciclina que não reagiu no produto. Uma vez que este ensaio foi dividido na etapa de precipitação, também a solução de Reagente B preparada, foi dividida. Desta forma, apesar de se ter tentado fazer uma medição criteriosa, para o ensaio 2.2, poderá ter-se utilizado uma quantidade de Reagente B inferior à necessária para a formação de oxitetraciclina cálcica. Consequentemente, poderá ter sido utilizada uma quantidade de Reagente B superior à necessária para o ensaio 2.1, contribuindo também para os elevados valores de cálcio observados neste caso.

Assim, apesar de se verificarem resultados tendencialmente mais satisfatórios quando a precipitação é realizada em laboratório, a diferença nas dimensões e condições operacionais utilizadas em cada ensaio (**Tabela 4.3**), não permite comparar de forma precisa a precipitação no kilo-lab (ensaio 2.1) vs. a precipitação em laboratório (ensaio 2.2).

4.2 Desenvolvimento de método analítico para estudo da Limeciclina

Este subcapítulo apresenta os resultados do desenvolvimento e validação do novo método analítico para o estudo de Limeciclina por HPLC.

4.2.1 Desenvolvimento do novo método analítico

O cromatograma obtido ao utilizar as condições de partida descritas na **Tabela 3.2**, encontra-se representado na **Figura 4.8**.

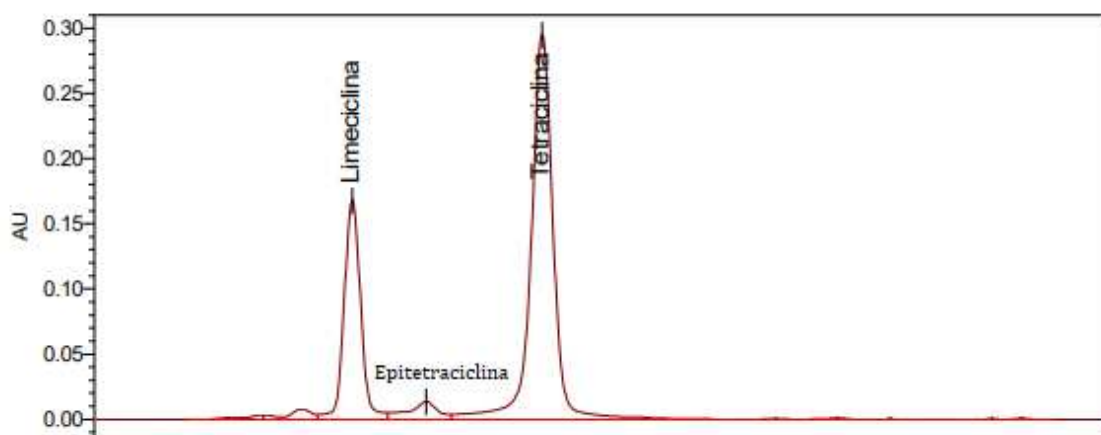


Figura 4.8 - Cromatograma obtido ao utilizar as condições cromatográficas de partida.

⊗ 1ª fase de testes: seleção da fase móvel aquosa

A fase móvel aquosa de partida é uma solução de Solvente A com pH 1,5. No entanto, esta não é compatível com LC-MS. Assim, foram testadas diferentes soluções com os diferentes ácidos referidos, ajustando o pH o mais próximo possível ao utilizado na fase móvel aquosa de partida. Foi, no entanto, utilizando Solvente A como diluente das amostras injetadas e solvente B como fase móvel orgânica. Os restantes parâmetros do método são os já descritos na **Tabela 3.2**. As fases móveis experimentadas nesta fase de testes, encontram-se na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5 - Características de cada experiência, com vista a seleção da fase móvel aquosa.

Nº da experiência	Fase móvel aquosa	pH da fase móvel aquosa
1	H ₂ O + aditivo A	2,1
2	H ₂ O + Aditivo B	3,1
3	H ₂ O + Aditivo C	3,1
4	H ₂ O + ADITIVO A	1,5
5	H ₂ O + ADITIVO A	2,3

Os cromatogramas obtidos para cada experiência, encontram-se representados pela **Figura 4.9**.

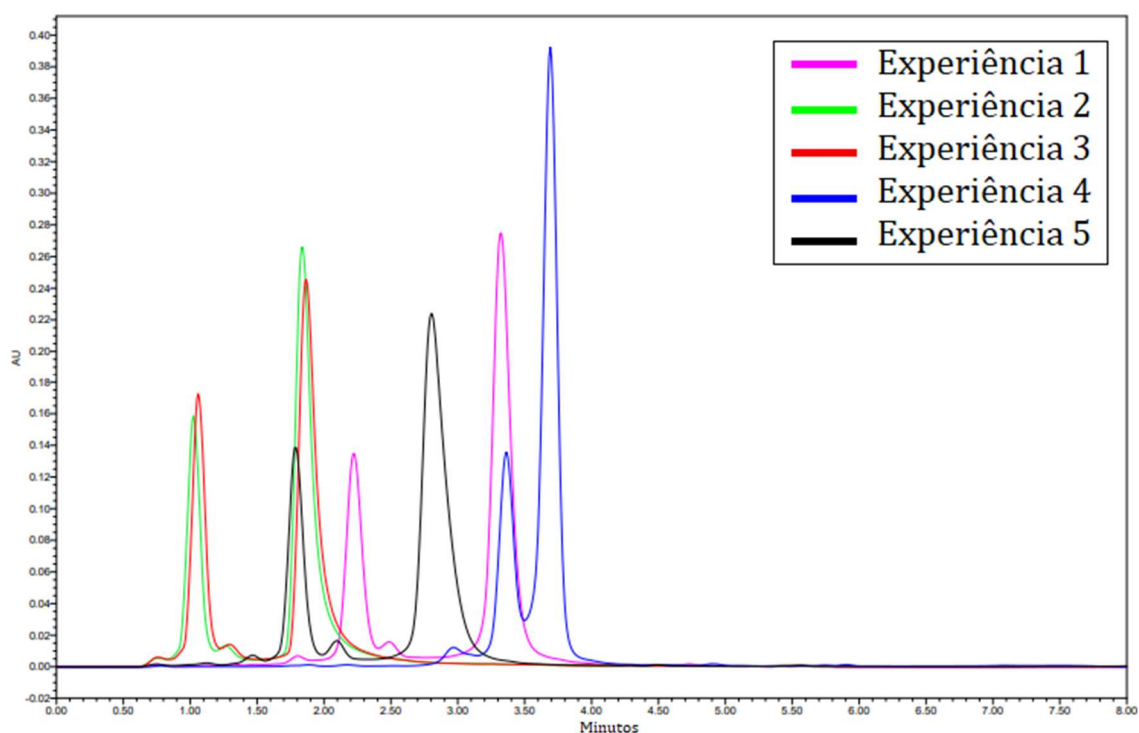


Figura 4.9 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 1ª fase de testes, para seleção da fase móvel orgânica.

Para além da observação dos cromatogramas, foram também tidos em consideração os valores obtidos de resolução entre o pico de limeciclina e o pico de epitetraciclina. O valor deste parâmetro retrata o nível de perfeição com que os dois picos referidos são separados [74]. Estes resultados, para cada experiência, apresentam-se na **Tabela 4.6**.

Tabela 4.6 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 1ª fase de testes, com vista à seleção da fase móvel orgânica.

Nº da experiência	Resolução entre picos de limeciclina e epitetraciclina
1	0,82
2	0,80
3	0,70
4	-
5	1,21

Os resultados da 1ª fase de testes revelam que pequenas alterações de pH da fase móvel aquosa têm influência na eluição dos componentes [85]. A pH 3 (experiências 2 e 3), os compostos eluem mais cedo e não é alcançada uma boa resolução. Com pH 1,5 (experiência 4), obteve-se o pior resultado, no qual não se verifica separação de componentes. Os melhores resultados (experiências 1 e 5) foram obtidos utilizando o ADITIVO A na fase móvel com pH 2, aproximadamente, pelo que estas fases móveis serão as selecionadas para prosseguir. Verifica-se ainda, relativamente às duas últimas experiências referidas, que se obtém melhor resolução entre picos e que a eluição dos mesmos ocorre mais cedo, ao recorrer à fase móvel com pH 2,3, comparando com a fase móvel com pH 2,1.

⊗ 2ª fase de testes: seleção do diluente

Na 2ª fase de testes, procedeu-se à seleção do diluente, utilizando os melhores resultados obtidos para a fase móvel aquosa. Na **Tabela 4.7** estão descritos os dados de cada experiência realizada para a 2ª fase de testes. Foi também utilizado solvente B como fase móvel orgânica para esta fase. Os restantes parâmetros do método, são os já descritos na **Tabela 3.2**.

Tabela 4.7 - Características de cada experiência, com vista à seleção do diluente.

Nº da experiência	Fase móvel aquosa	Diluente
6	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,1)	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,1)
7		H ₂ O + Aditivo B (pH=3,1)
8		H ₂ O + Aditivo C (pH=3,1)
9	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,3)	H ₂ O + Aditivo B (pH=3,1)
10		H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,3)

Os resultados cromatográficos obtidos para a 2ª fase de testes encontram-se respetivamente representados na **Figura 4.10**.

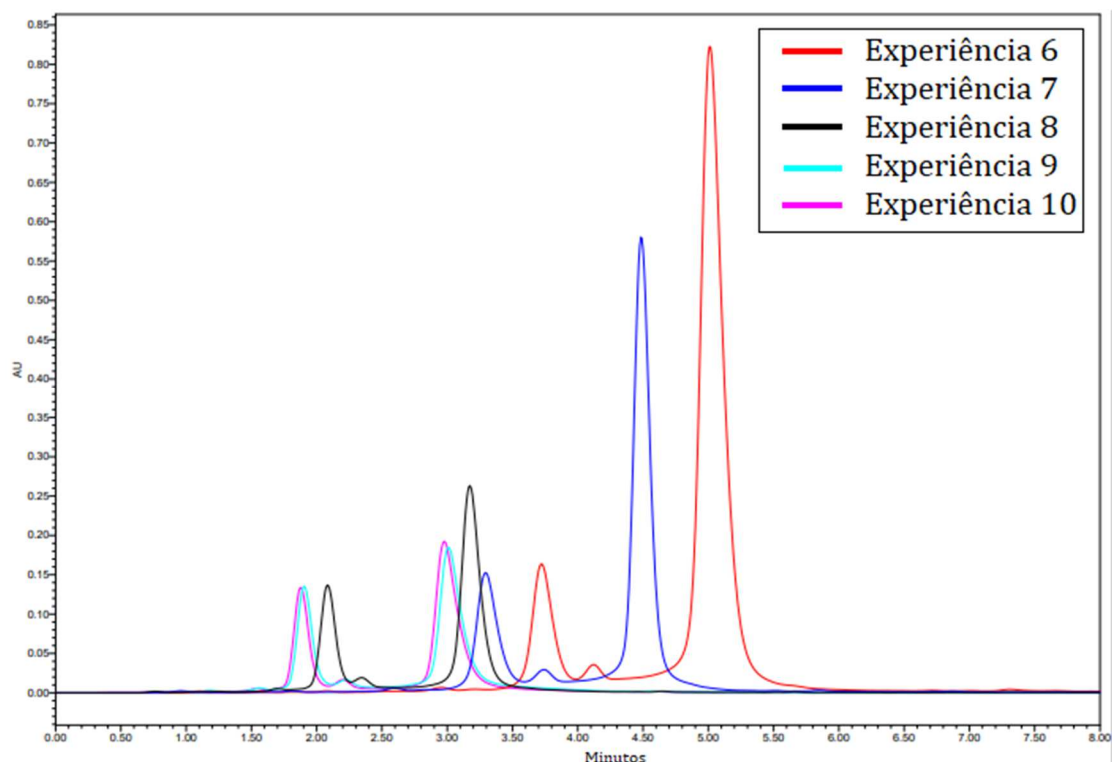


Figura 4.10 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 2ª fase de testes, com vista à seleção do diluente.

Os valores obtidos de resolução entre o pico de lincicline e o pico de epitetraciclina, para esta fase de testes, apresentam-se na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8 - Resolução entre os picos da lincicline e da epitetraciclina para a 2ª fase de testes, com vista à seleção do diluente.

Nº da experiência	Resolução entre picos de lincicline e epitetraciclina
6	1,19
7	1,28
8	0,85
9	1,19
10	1,05

Melhores resultados são obtidos quando o diluente coincide com a fase móvel aquosa (experiências 6 e 10), ou quando é utilizado Aditivo B como diluente (experiências 7 e 9). Tal está de acordo com o descrito por Sabir et al. (2016) [83]. Os autores referem que melhores separações entre picos são obtidas quando a fase móvel e o diluente são coincidentes. Caso contrário, a utilização de diferentes solventes irá afetar a eluição dos compostos através da coluna.

Obtém-se, mais concretamente, melhor resolução quando se recorre à solução de Aditivo B como diluente. Posto isto, a hipótese de utilização, como diluente, da solução de Aditivo C (experiência 8) é rejeitada.

☉ 3ª fase de testes: alteração da fase móvel orgânica

Uma vez que se verificou, na 2ª fase de testes, que existe melhor separação entre picos quando o diluente coincide com a fase móvel aquosa, ou quando este é uma solução de Aditivo B de pH 3,1, optou-se por continuar a testar estas hipóteses. No entanto, desta vez, alterando a fase móvel orgânica ao introduzir-lhe uma percentagem aquosa, nomeadamente, 10% (v/v) da respetiva fase móvel aquosa que se estiver a testar em cada experiência. Foi também introduzida uma nova fase móvel aquosa a avaliar, com ADITIVO A a pH 2,5, de forma a verificar se esta diferença de pH, levaria a diferenças cromatográficas significativas. Os critérios seguidos para efetuar cada experiência para esta fase de testes apresentam-se na **Tabela 4.9**. Os restantes parâmetros do método, são os já descritos na **Tabela 3.2**.

Tabela 4.9 - Características de cada experiência, com vista a alteração da fase móvel orgânica.

Nº da experiência	Fase móvel aquosa	Diluente	Fase móvel orgânica
11	H ₂ O + aditivo A (pH=2,1)	H ₂ O + aditivo A (pH=2,1)	Solvente B: FM aquosa (90:10)
12		H ₂ O + Aditivo B (pH=3,1)	
13	H ₂ O + aditivo A (pH=2,1)	H ₂ O + aditivo A (pH=2,5)	
14		H ₂ O + Aditivo B (pH=3,1)	
15	H ₂ O + aditivo A (pH=2,3)	H ₂ O + aditivo A (pH=2,3)	
16		H ₂ O + Aditivo B (pH=3,1)	

A **Figura 4.11** representa os cromatogramas resultantes de cada experiência da 3ª fase de testes.

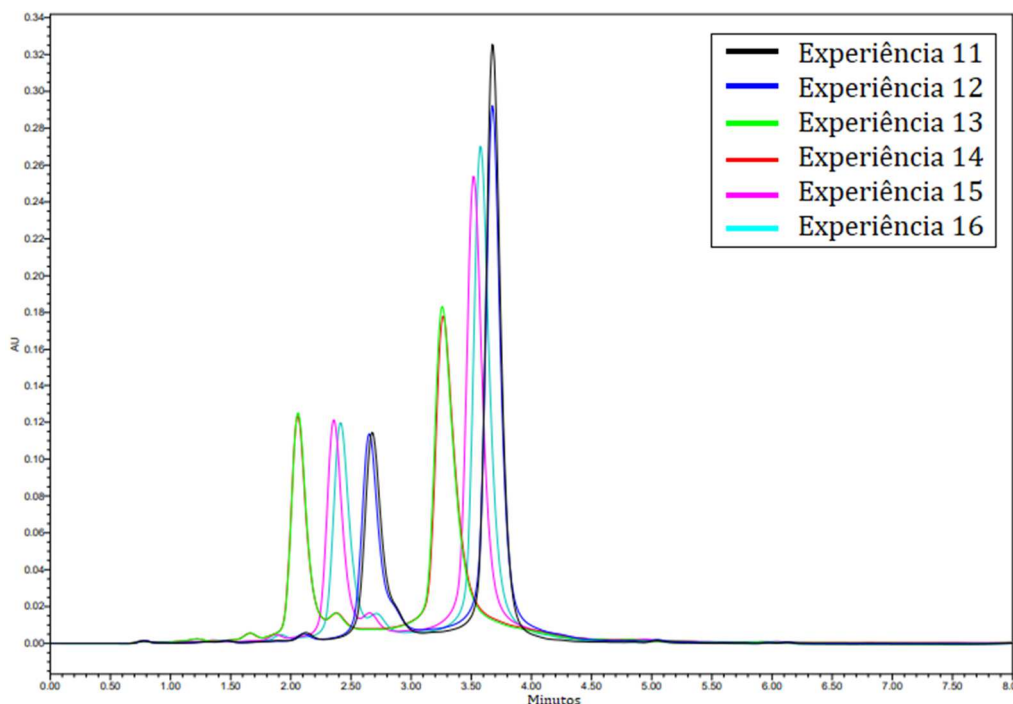


Figura 4.11 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 3ª fase de testes, com vista à alteração da fase móvel orgânica.

A resolução obtida entre o pico de limeciclina e o pico de epitetraciclina, para a 3ª fase de testes, apresentam-se na **Tabela 4.10**.

Tabela 4.10 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 3ª fase de testes, com vista à alteração da fase móvel orgânica.

Nº da experiência	Resolução entre picos de limeciclina e epitetraciclina
11	-
12	-
13	0,80
14	0,82
15	0,66
16	0,74

De forma geral, pode afirmar-se que a alteração da fase móvel orgânica de solvente B para solvente B com uma percentagem de fase móvel aquosa, não foi vantajosa, uma vez que em nenhuma das experiências foram obtidos resultados promissores. Os piores resultados foram verificados para as experiências com fase móvel aquosa de pH 2,1 (experiências 11 e 12), nas quais se verifica a junção dos picos cromatográficos da limeciclina e da epitetraciclina.

Relativamente às experiências com fase móvel aquosa com pH 2,5 (experiências 13 e 14), apesar de se obter, para esta fase de testes, as melhores resoluções, verifica-se um arrastamento considerável do pico da tetraciclina, piorando, portanto, a simetria deste pico. Assim, a hipótese de continuar a analisar estas fases móveis aquosas, com pH 2,1 e 2,5, é rejeitada.

⊗ **4ª fase de testes: alteração do fluxo**

Na 4ª fase de testes foi apenas testada a fase móvel com pH 2,3, uma vez que se verificou, na fase de testes anterior, que os resultados mais favoráveis foram obtidos com recurso a esta.

Comprovou-se também, na fase de testes com vista a seleção do diluente, que os melhores resultados são obtidos quando o diluente coincide com a fase móvel aquosa ou quando este se trata de uma solução aquosa com Aditivo B de pH 3,1. Assim, para esta fase de testes, de modo a ajustar os parâmetros das experiências realizadas, optou-se por testar apenas a hipótese em que o diluente corresponde à solução utilizada como fase móvel aquosa. Este cenário é também mais benéfico para a realização do método analítico, uma vez que se minimiza a utilização de diferentes reagentes.

Relativamente à fase móvel orgânica utilizada, apesar de não se ter obtido resultados promissores ao testar o solvente B com uma percentagem de fase móvel aquosa, esta possibilidade foi ainda assim estudada com um fluxo mais baixo, de forma a constatar se, desta forma, se obtinha maior separação entre picos. Os diferentes parâmetros seguidos para a realização de cada experiência, com vista a alteração do fluxo, encontram-se na **Tabela 4.11**. Os restantes parâmetros do método, à exceção do fluxo (critério que se pretende modificar nesta fase de testes) e o tempo de corrida (critério que é ajustado de acordo com o fluxo), são os já

descritos na **Tabela 3.2**. Visto que foram experimentados fluxos relativamente mais baixos, em comparação com o fluxo inicialmente definido, o tempo de corrida foi ampliado para 13 minutos.

Tabela 4.11 - Características de cada experiência, com vista a alteração do fluxo.

Nº da experiência	Fase móvel aquosa	Diluyente	Fase móvel orgânica	Fluxo (mL/min)
17	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,3)	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,3)	solvente B: FM aquosa (90:10)	0,7
18				0,5
19			solvente B	0,7
20				0,5

Os cromatogramas obtidos para experiências realizadas com a finalidade de alteração do fluxo, encontram-se representados na **Figura 4.12**.

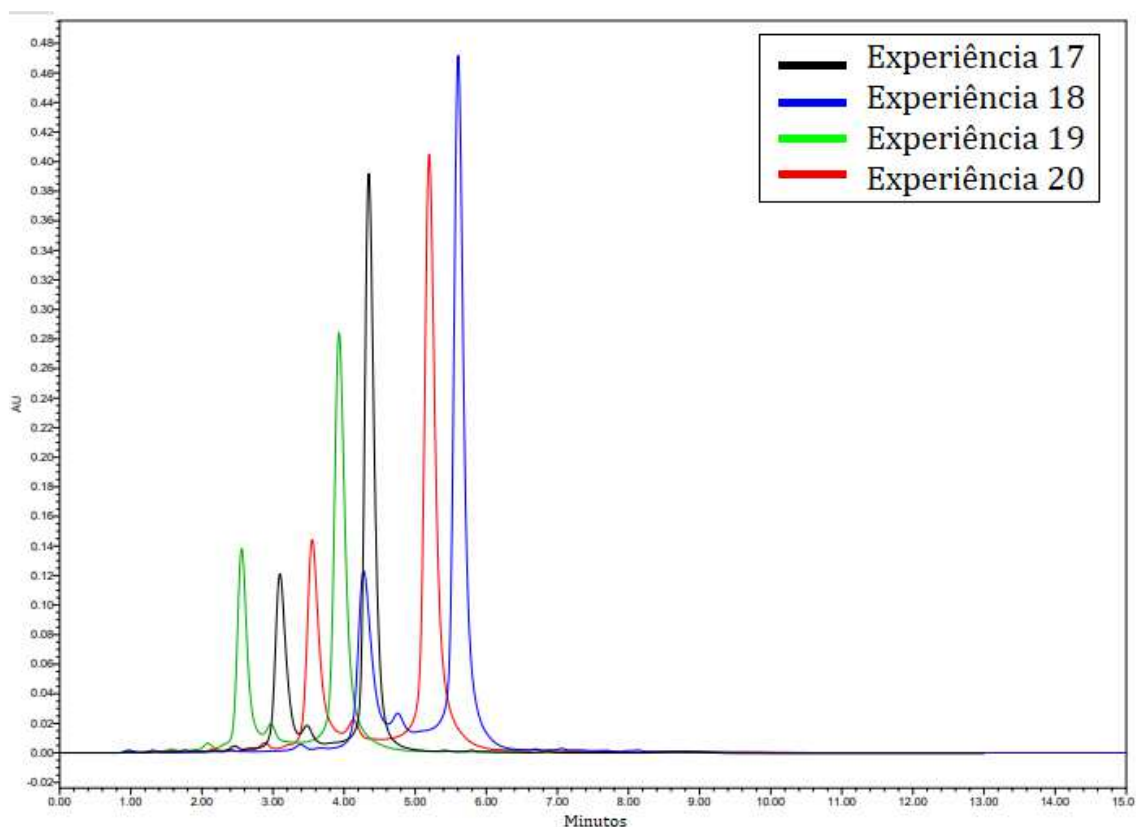


Figura 4.12 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 4ª fase de testes, com vista à alteração do fluxo.

A resolução obtida entre o pico de limeciclina e o pico de epitetraciclina, para a 4ª fase de testes, apresentam-se na **Tabela 4.12**.

Tabela 4.12 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 4ª fase de testes, com vista à alteração do fluxo.

Nº da experiência	Resolução entre picos de limeciclina e epitetraciclina
17	1,02
18	1,00
19	1,19
20	1,45

É possível observar que as experiências em que é utilizado solvente B com 10% (v/v) de fase móvel aquosa (experiências 17 e 18), continuam sem ser promissoras comparativamente às experiências nas quais é utilizado solvente B (experiências 19 e 20), mesmo com alteração do fluxo. Assim, a possibilidade de continuar a utilizar esta fase móvel orgânica, é rejeitada.

No que diz respeito aos melhores resultados desta fase de testes, apesar de se verificar melhor resolução entre o pico da limeciclina e o pico da epitetraciclina para a experiência com fluxo 0,5mL/min (experiência 20), também se observa que os picos cromatográficos saem significativamente mais tarde. Assim, o fluxo selecionado para continuar a próxima fase de testes, foi definido em 0,7 mL/min.

✿ 5ª fase de testes: alteração do gradiente

A 5ª fase de testes é baseada na combinação dos melhores resultados obtidos nas fases anteriores, alterando apenas o gradiente. Esses resultados, resumem-se nos critérios seguidos para efetuar cada experiência para esta fase de testes, apresentados na **Tabela 4.13**. Os restantes parâmetros do método, à exceção do fluxo (critério modificado na 4ª fase de testes), são os já descritos na **Tabela 3.2**.

Tabela 4.13 - Características de cada experiência, com vista a alteração do gradiente.

Nº da experiência	Fase móvel aquosa	Diluyente	Fase móvel orgânica	Fluxo (mL/min)	Gradiente (%orgânico em t = 0; t=1; t=6,1 e t=8)
21	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,3)	H ₂ O + ADITIVO A (pH=2,3)	solvente B 100%	0,7	85%
22					82%
23					93%
24					89%
25					88%

A **Figura 4.13** representa os cromatogramas obtidos para as experiências com vista a alteração do gradiente.

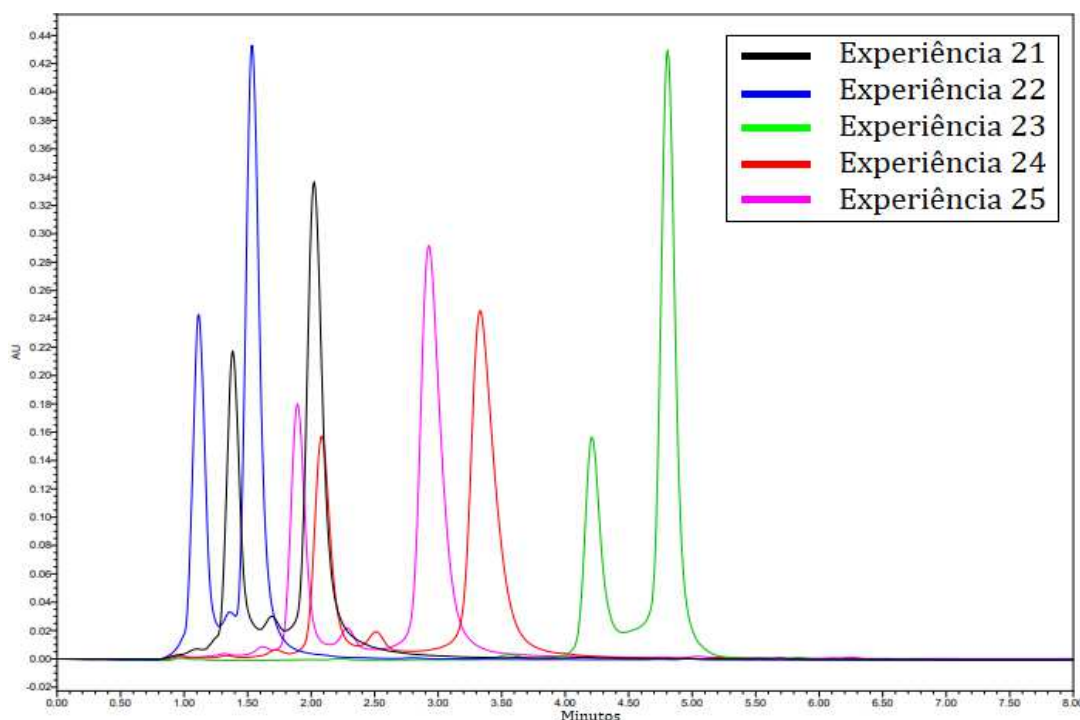


Figura 4.13 - Cromatogramas obtidos nas experiências da 5ª fase de testes, com vista a alteração do gradiente.

Os valores obtidos para a resolução obtida entre o pico de limeciclina e o pico de epitetraciclina, para a 5ª fase de testes, apresentam-se na **Tabela 4.14**.

Tabela 4.14 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para a 5ª fase de testes, com vista a alteração do gradiente.

Nº da experiência	Resolução entre picos de limeciclina e epitetraciclina
21	0,94
22	-
23	-
24	1,48
25	1,51

Verifica-se que os cromatogramas resultantes das experiências 22 e 23, revelam uma fraca eficiência de separação, sem resolução entre picos, pelo que a hipótese de escolha de qualquer um dos respetivos gradientes testados, é eliminada.

Também a possibilidade de escolha do gradiente utilizado na experiência 21 é rejeitada, uma vez que se obteve um cromatograma no qual os compostos eluem demasiado cedo. Tal impossibilita a visualização de picos que saem antes do pico da limeciclina, visto que ocorre a junção dos mesmos.

Relativamente às duas últimas experiências desta fase, verifica-se que se obtém um cromatograma com melhor resolução entre picos para a experiência 25, no qual também os compostos eluem mais cedo (comparativamente ao cromatograma da experiência 24). Apesar de à partida, os melhores resultados serem obtidos para a experiência 25, antes de se tomar uma decisão final relativa à escolha de todos os parâmetros cromatográficos para este novo

método, e uma vez que se obtêm resultados muito idênticos para ambas as experiências, foram feitas algumas repetições de cada uma, de modo a concluir qual delas tinha melhor reprodutibilidade. Os cromatogramas referentes às repetições das experiências 24 e 25, podem ser observados através da **Figura 4.14** e **Figura 4.15**, respetivamente.

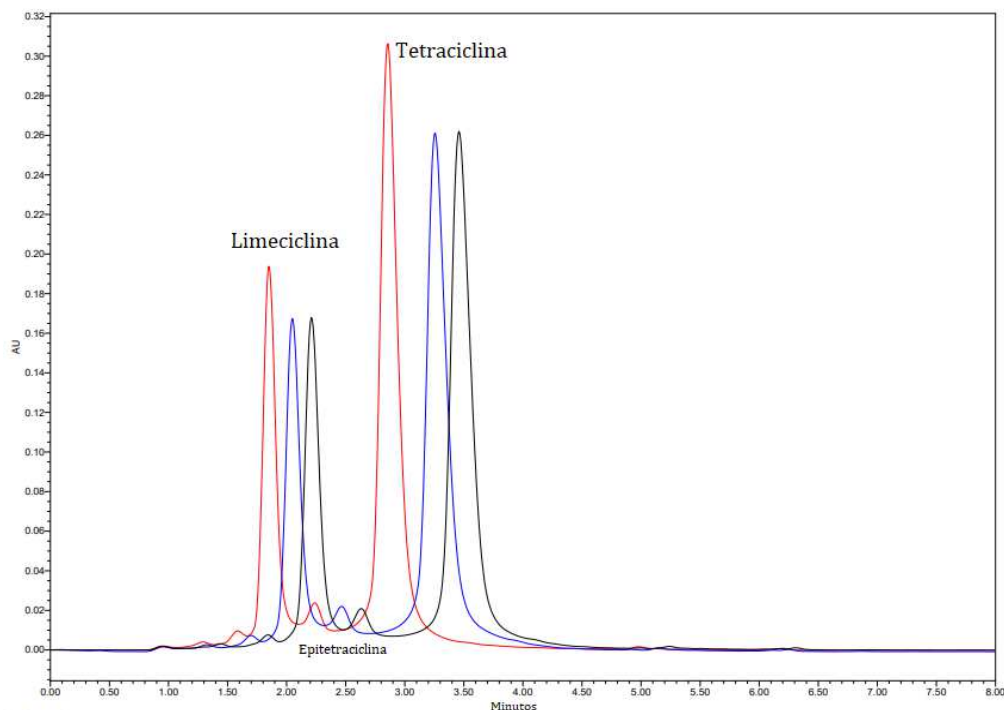


Figura 4.14 - Cromatogramas obtidos para as repetições da experiência 24.

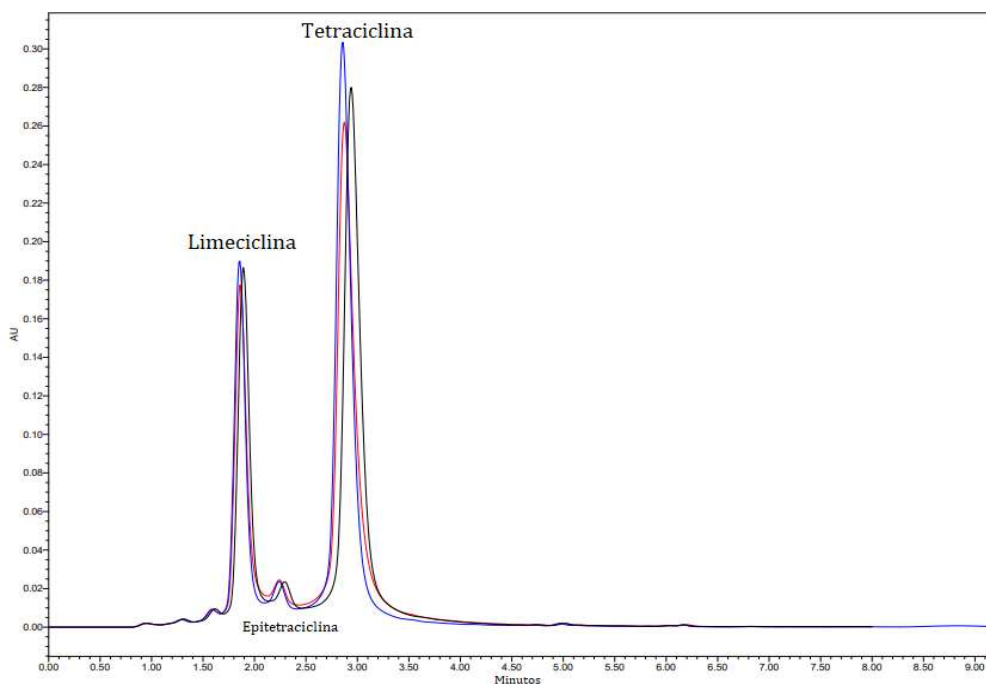


Figura 4.15 - Cromatogramas obtidos para as repetições da experiência 25.

A resolução obtida nos cromatogramas para as repetições das experiências 24 e 25, apresentam-se na **Tabela 4.15**.

Tabela 4.15 - Resolução entre os picos da limeciclina e da epitetraciclina para repetição das experiências 24 e 25.

Nº da experiência	Resolução entre picos de limeciclina e epitetraciclina
24 (repetição 1)	1,42
24 (repetição 2)	1,47
24 (repetição 3)	1,51
25 (repetição 1)	1,37
25 (repetição 2)	1,39
25 (repetição 3)	1,38

Embora se verifiquem melhores resoluções para as repetições das experiências 24, também é possível perceber que ao repetir esta experiência, os picos começaram a sair sucessivamente mais tarde. O mesmo não aconteceu com as repetições da experiência 25, nas quais não se observaram alterações nos tempos de retenção dos picos, continuando com bons valores de resolução.

Obtém-se assim, com a experiência 25, a melhor combinação de parâmetros cromatográficos. Quer isto dizer, que este será o novo método para análise de Limeciclina.

De forma a tornar os picos do cromatograma mais visíveis e definidos, o volume de injeção foi alterado, passando de 5 µL para 10 µL.

Em forma de resumo, na **Tabela 4.16** apresentam-se os parâmetros do novo método analítico desenvolvido.

Tabela 4.16 - Parâmetros do novo método analítico desenvolvido, para o estudo de Limeciclina.

Parâmetros	Descrição		
Coluna	Onyx monolithic C18, 100 mm x 3.0 mm		
Temperatura da coluna	x °C		
Temperatura da câmara das amostras	x °C		
Volume de injeção	x µL		
Comprimento de onda	x nm		
Fluxo	0,7 mL/min		
Tempo de corrida	x min		
Gradiente	Tempo de corrida (min)	% Fase Móvel aquosa	% Fase Móvel orgânica
	x	88	12
	x	88	12
	x	60	40
	x	88	12
	x	88	12
Fase Móvel Aquosa	Solução aquosa com pH ajustado a 2,3 com ADITIVO A		
Fase Móvel Orgânica	Solvente B		
Diluyente	Solução aquosa com pH ajustado a 2,3 com ADITIVO A		

Fundamental destacar que, dada a dificuldade de isolar limeciclina, até ao momento, não foi possível determinar o respetivo Fator de Resposta Relativo (RRF). Assim, o método analítico desenvolvido não é utilizado no doseamento desta molécula, mas apenas para o estudo e determinação da percentagem de pureza cromatográfica de cada pico.

Adequabilidade do sistema:

O procedimento deste método de análise, requer um padrão de Reagente C (atividade de 97,6%). A técnica para a adequabilidade deste método consiste, inicialmente, em permitir que o HPLC estabilize e seguidamente, na injeção da solução branco duas vezes, da solução padrão seis vezes e uma vez da solução amostra de Limeciclina a estudar. Os critérios detalhados na **Tabela 4.17** devem ser atendidos antes do primeiro ensaio no sistema e após qualquer alteração significativa.

Tabela 4.17 - Adequabilidade do sistema.

Solução	Número de injeções	Parâmetros para adequabilidade do sistema	Critério de aceitação
Solução amostra	1	Resolução entre o pico da limeciclina e o pico da epitetraciclina	> 1,3
		Resolução entre o pico da epitetraciclina e o pico da tetraciclina	> 1,5
Solução padrão	6	%RSD para 6 injeções replicadas para a área do pico de tetraciclina	≤ 2,0 %
		Tempo de retenção do pico de tetraciclina	2,9 ± 0,5 min.
Solução padrão e amostra	1	Fator de Simetria para o pico da tetraciclina	< 2

Perfis cromatográficos típicos:

Os cromatogramas característicos obtidos pelo método analítico desenvolvido, apresentam-se na **Figura 4.16** e **Figura 4.17** para o padrão de Reagente C e para uma amostra de Limeciclina, respetivamente.

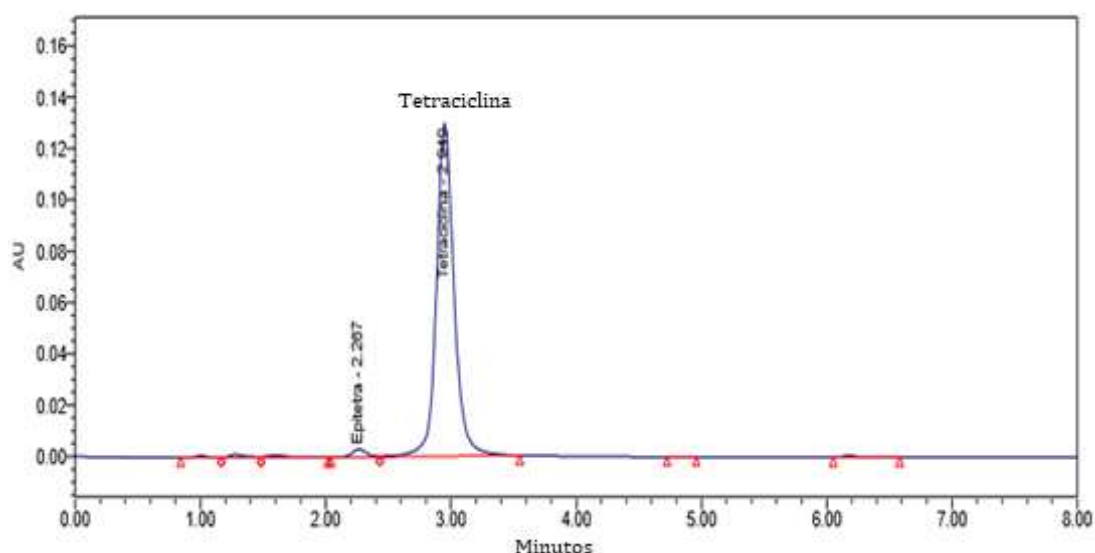


Figura 4.16 - Perfil cromatográfico típico do padrão de Reagente C.

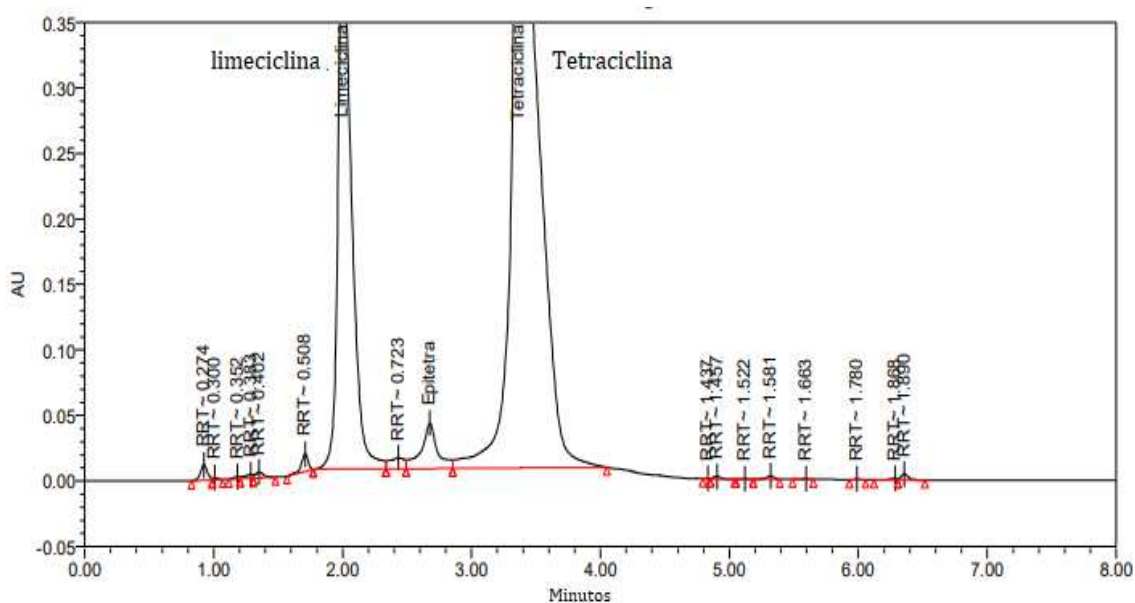


Figura 4.17 - Perfil cromatográfico típico de uma amostra de Limeciclina, 2 minutos após a sua dissolução.

4.2.2 Estudo da cinética de hidrólise da Limeciclina

A preparação de amostras de Limeciclina para análise em HPLC, principalmente em meio aquoso, contribui para a hidrólise de limeciclina em tetraciclina. Assim sendo, foi necessário realizar um estudo da cinética de degradação desta molécula em particular, para avaliar a sua

taxa de decréscimo numa amostra injetada em HPLC. Para tal, foram analisados 3 de Limeciclina da indústria.

Cada amostra foi preparada e injetada a diferentes intervalos de tempo, precisamente a cada 9 minutos, durante 65 minutos. As suas preparações e análises foram, evidentemente, realizadas utilizando o novo método analítico desenvolvido para o estudo da Limeciclina. De forma a apurar o decréscimo da limeciclina e, conseqüentemente, o aumento do conteúdo de tetraciclina ao longo do tempo. Foram elaborados gráficos da %PC em função do tempo decorrido após a dissolução da amostra. Estes gráficos podem ser observados na **Figura 4.18**.

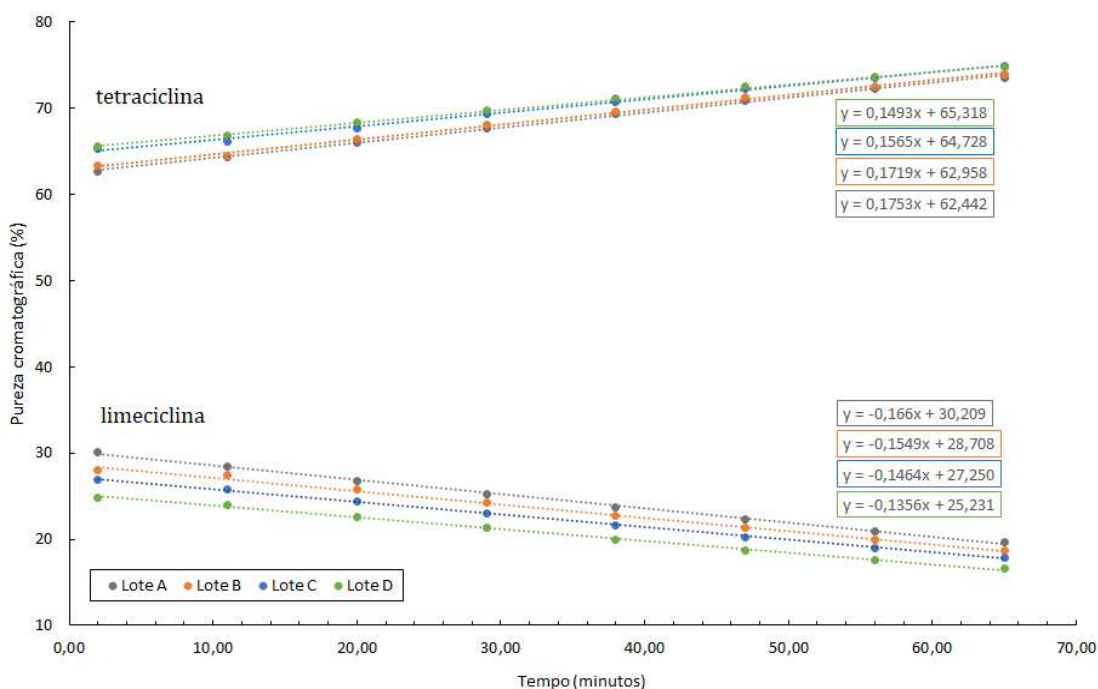


Figura 4.18 – Representação gráfica da cinética de hidrólise de Limeciclina.

Pela análise da **Figura 4.18** é possível retirar as seguintes observações:

- Para o intervalo de tempo considerado, a taxa de hidrólise de limeciclina pode ser considerada linear;
- Ao verificar o declive das retas, verifica-se que a taxa de degradação (diminuição de %PC por unidade de tempo) não é igual em todos os lotes;
- Da mesma forma, ao comparar os declives para limeciclina e tetraciclina, verifica-se que a taxa de degradação da limeciclina é relativamente inferior ao aumento de conteúdo de tetraciclina. Ou seja, não existe proporcionalidade direta entre a diminuição do teor de limeciclina e o aumento do conteúdo de tetraciclina. Isto significa que, para além da limeciclina, podem existir mais compostos no produto que se degradam e formam tetraciclina.

Assim sendo, uma vez que se verifica uma taxa de hidrólise de limeciclina significativa, surgiu a necessidade de determinar qual o momento “t” mais adequado para definir a %PC inicial desta molécula no produto (sendo ‘t’ o tempo decorrido após a dissolução da amostra). Os instantes de tempo a estudar são:

- t=0 min. (Sendo o valor de %PC de limeciclina calculado através da extrapolação da reta ao tempo inicial. Neste caso, surge a necessidade de analisar a Limeciclina em, pelo menos, 2 pontos, de forma a traçar uma reta representativa).
- t=2 min. (Sendo o valor de %PC de limeciclina lido diretamente. Considera-se 2 minutos o intervalo de tempo necessário para realizar a dissolução e injeção da amostra).

Foi inicialmente realizado o teste F de forma a avaliar se a variância entre o conjunto de valores obtidos para t=0 min. são estatisticamente iguais ao obtido para t=2 min. O teste foi realizado tanto para os dados de limeciclina, como de tetraciclina. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 4.19**.

Limeciclina			Tetraciclina		
Teste F: duas amostras para variâncias			Teste F: duas amostras para variâncias		
	t=2 min.	t=0 min.		t=2 min.	t=0 min.
Média	27,14	27,5533333	Média	64,37	64,03
Variância	4,04576	3,99378667	Variância	1,53104	1,43832
Observações	6	6	Observações	6	6
gl	5	5	gl	5	5
F	1,013014		F	1,064464	
P(F<=f) uni-caudal	0,494513		P(F<=f) uni-caudal	0,473508	
F crítico uni-caudal	5,050329		F crítico uni-caudal	5,050329	

Figura 4.19 – Resultados do teste F para a %PC em t=0 e t=2 minutos, de limeciclina e de tetraciclina, obtidos por Excel.

A hipótese nula é rejeitada se $F > F_{\text{crítico uni-caudal}}$. Tal não se verifica, nem para o teste F da limeciclina, nem para tetraciclina. Assim, conclui-se que as variâncias dos valores de %PC, tanto para limeciclina, como para tetraciclina, são estatisticamente semelhantes para os dois instantes de tempo considerados.

Seguidamente, tendo em conta que as variâncias dos valores de %PC em t=0 min. e t=2 min. são estatisticamente semelhantes, foi realizado o Teste T. Este teste é utilizado para testar a hipótese nula, em que as médias de dois conjuntos de dados, são iguais.

Na **Figura 4.20** encontram-se os resultados do Teste T para os valores de %PC de limeciclina e tetraciclina.

Limeciclina			Tetraciclina		
Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	t=0 min.	t=2 min.		t=0 min.	t=2 min.
Média	27,55333333	27,14	Média	64,03	64,37
Variância	3,993786667	4,04576	Variância	1,43832	1,53104
Observações	6	6	Observações	6	6
Variância agrupada	4,019773333		Variância agrupada	1,48468	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	10		gl	10	
Stat t	0,357075683		Stat t	-0,48330703	
P(T<=t) uni-caudal	0,364227734		P(T<=t) uni-caudal	0,319642523	
t crítico uni-caudal	1,812461123		t crítico uni-caudal	1,812461123	
P(T<=t) bi-caudal	0,728455469		P(T<=t) bi-caudal	0,639285047	
t crítico bi-caudal	2,228138852		t crítico bi-caudal	2,228138852	

Figura 4.20 - Resultados do teste T para a %PC em t=0 e t=2 minutos, de limeciclina e de tetraciclina, obtidos por Excel.

A hipótese nula é rejeitada se $\text{Stat } t > t_{\text{crítico bi-caudal}}$. Tal não se verifica, nem para o teste T da limeciclina, nem para tetraciclina. Assim, conclui-se que as médias dos valores de %PC, em t=0 min. e t=2 min. são estatisticamente semelhantes, para ambos os compostos.

Desta forma, é possível concluir que os valores de %PC para os dois instantes de tempo, são estatisticamente iguais, para ambas moléculas referidas.

Pode então afirmar-se que, para o estudo de Limeciclina, é aceitável a determinação do valor de pureza cromatográfica, em qualquer um dos instantes testados, considerando o instante t=2 min., o escolhido para a determinação da %PC. Neste caso, a escolha do instante t=2 min. é mais vantajosa, pois ao analisar em t=0 min. seria necessário analisar a Limeciclina em, pelo menos, 2 pontos, de forma a fazer extrapolação.

4.2.3 Validação do método analítico desenvolvido

Tal como anteriormente referido, dada a dificuldade de isolar limeciclina, não é possível obter um padrão para esta molécula. Assim, a validação do método analítico desenvolvido, foi realizada para a molécula de tetraciclina com recurso ao padrão de Reagente C.

1. Especificidade

Foi preparada uma amostra multi-componente constituída de impurezas conhecidas do Reagente C. O cromatograma obtido encontra-se representado na **Figura 4.21**.

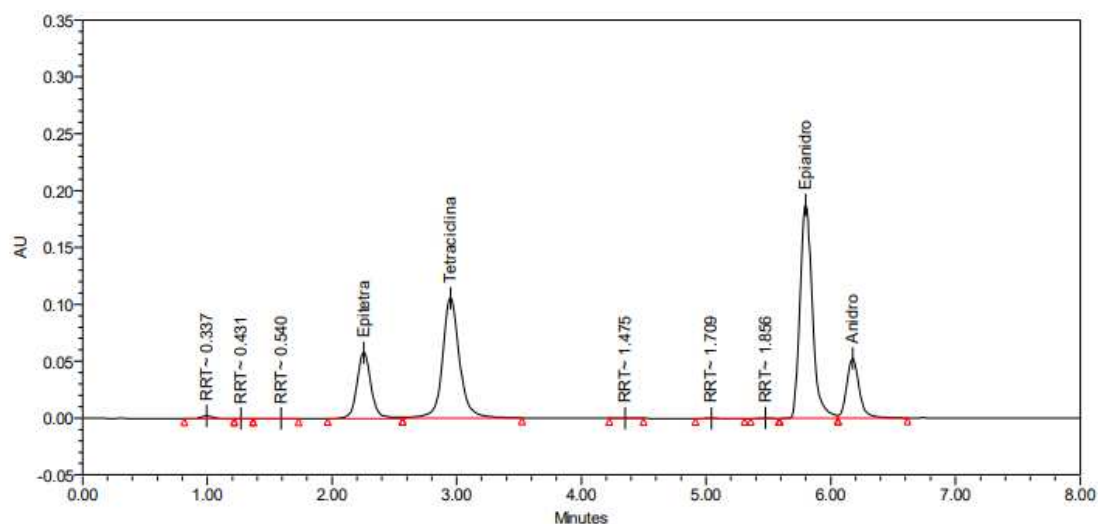


Figura 4.21 - Cromatograma de uma mistura complexa de impurezas conhecidas de Reagente C, para análise da especificidade.

Através da **Figura 4.21**, verifica-se que o método tem a capacidade de identificar e distinguir o analito de interesse numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes, comprovando a especificidade/ seletividade do mesmo.

2. Linearidade

Foram preparadas três soluções-mãe, a partir de um padrão de Reagente C, tal como detalhado na **Tabela 4.18**.

Tabela 4.18 - Soluções-mãe preparadas para a linearidade.

	Solução-mãe 1	Solução-mãe 2	Solução-mãe 3
Atividade (%)	97,60	97,60	97,60
m (mg)	37,62	37,71	37,60
V (mL)	50,00	50,00	50,00
C (mg/mL)	0,73	0,74	0,73

Seguidamente, foram realizadas 8 diluições de cada uma das soluções-mãe preparadas, com diferentes concentrações. Um total de 24 soluções foram preparadas para aferir a linearidade do método (**Tabela 4.19**).

Tabela 4.19 - Soluções diluídas preparadas para a linearidade, com as respectivas concentrações e áreas médias obtidas.

C alvo (mg/mL)	Nível (%)	V Solução- mãe (mL)	Diluição	C₁ (mg/mL)	C₂ (mg/mL)	C₃ (mg/mL)	Área média obtida (AU)
0,01	0,02	0,68	50x	0,0100	0,0100	0,0100	$2,51 \times 10^5$
0,25	0,05	1,71	50x	0,0251	0,0252	0,0251	$6,21 \times 10^5$
0,05	0,10	1,37	20x	0,0503	0,0504	0,0503	$1,28 \times 10^6$
0,15	0,30	4,10	20x	0,1505	0,1509	0,1505	$3,96 \times 10^6$
0,30	0,60	4,10	10x	0,3011	0,3018	0,3009	$7,75 \times 10^6$
0,40	0,80	5,46	10x	0,4010	0,4019	0,4007	$1,08 \times 10^7$
0,50	1,00	3,42	5x	0,5023	0,5035	0,5020	$1,33 \times 10^7$
0,60	1,20	4,10	5x	0,6022	0,6036	0,6018	$1,62 \times 10^7$

A **Figura 4.22** permite aferir a linearidade através da representação gráfica entre a área média do pico, em cada solução diluída, em função da concentração de Reagente C na solução.

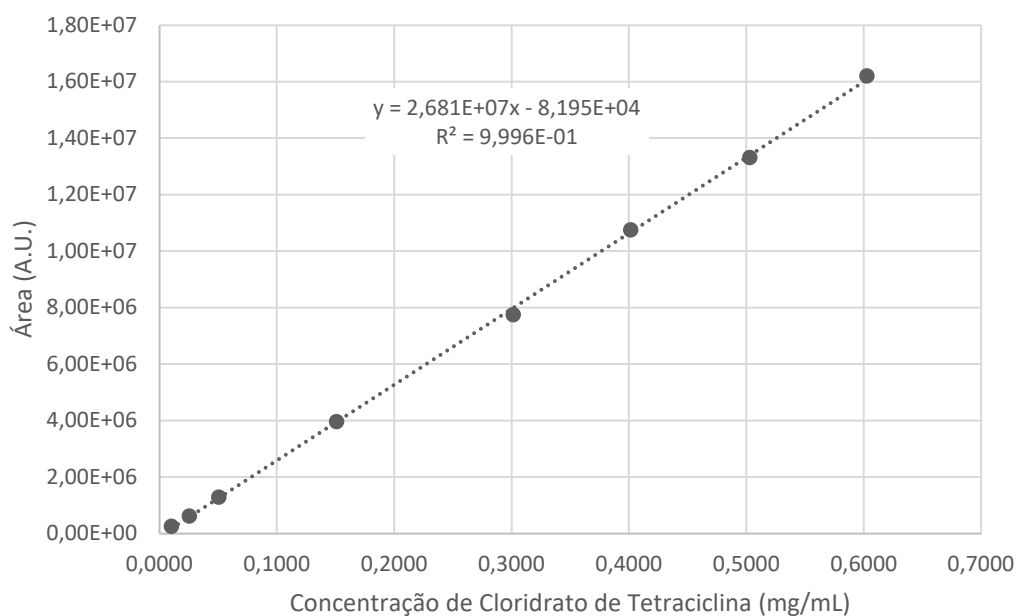


Figura 4.22 - Representação gráfica da reta de calibração de Reagente C.

A reta de calibração, representada na **Figura 4.22**, permite visualizar uma tendência linear entre os resultados obtidos. Para que seja confirmada a linearidade é necessário averiguar a qualidade do coeficiente de correlação, R. É requerido que este coeficiente seja, necessariamente, superior a 0,999. Este critério é verificado, uma vez que $R = 0,999$, reconhecendo-se assim a capacidade do método para obter resultados diretamente proporcionais à concentração de Reagente C na amostra.

❖ Análise de resíduos e teste de *Mandel*:

Seguiu-se a análise de resíduos e o teste de *Mandel*, de modo a averiguar se o modelo de ajuste linear, se adequa aos resultados obtidos. Os resíduos foram determinados através da **Equação 3.1**. A representação gráfica dos resíduos em função dos níveis de concentração estudados, pode ser visualizada na **Figura 4.23**.

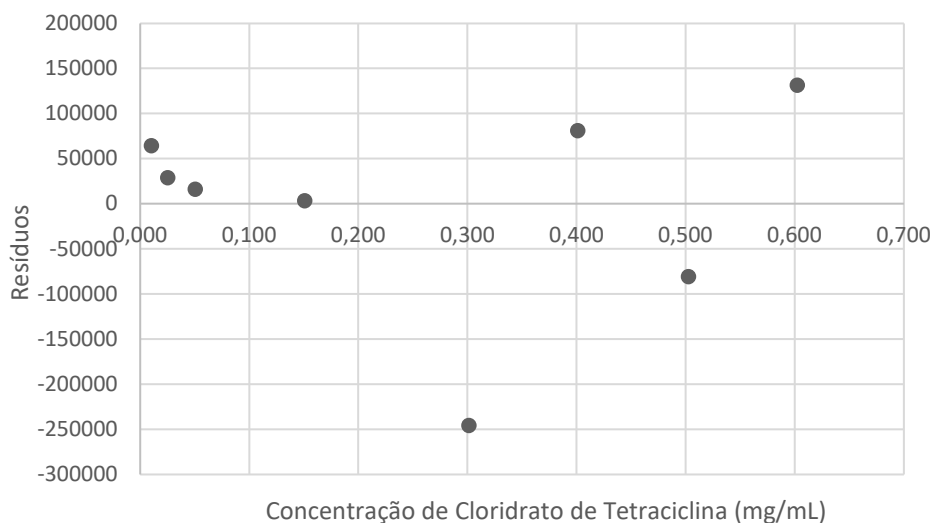


Figura 4.23 - Dispersão de resíduos para análise da linearidade de tetraciclina.

Através da observação da **Figura 4.23**, confirma-se a linearidade do método, uma vez que se verifica uma distribuição aleatória dos pontos. Contudo, apenas a análise gráfica dos resíduos pode ser considerada subjetiva para tomar uma decisão relativamente ao ajuste que melhor se adequa à função, pelo que foi complementada com o teste de *Mandel*. Os respetivos valores para os parâmetros deste teste foram obtidos através da **Equação 3.2** à **Equação 3.5** e encontram-se na **Tabela 4.20**.

Tabela 4.20 - Valores obtidos para os parâmetros do teste de *Mandel*.

Parâmetro	S_{y1}	S_{y2}	DS^2	PG	F
Valor obtido	$1,10 \times 10^5$	$9,95 \times 10^4$	$2,27 \times 10^{10}$	2,29	16,26

Uma vez que se verifica que $PG \leq F$, então a função de ajuste linear é adequada.

❖ Teste de *Rikilt*:

Os valores obtidos para cada parâmetro do teste de *Rikilt* foram determinados com recurso à **Equação 3.6** e **Equação 3.7**. Estes encontram-se na **Tabela 4.21**.

Tabela 4.21 - Resultados relativos ao teste de Rikilt.

Parâmetro	$FR_{(y/x)}$	$\overline{FR}_{(y/x)}$	$FR_{(y/x)}/\overline{FR}_{(y/x)}$
$i = 1$	$2,51 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$	103,45%
$i = 2$	$2,47 \times 10^7$		104,97%
$i = 3$	$2,55 \times 10^7$		101,68%
$i = 4$	$2,63 \times 10^7$		98,65%
$i = 5$	$2,57 \times 10^7$		100,83%
$i = 6$	$2,68 \times 10^7$		96,75%
$i = 7$	$2,65 \times 10^7$		97,92%
$i = 8$	$2,69 \times 10^7$		96,44%

Através da observação dos resultados da **Tabela 4.21**, é possível admitir linearidade à reta, uma vez que os valores estão compreendidos entre 90% e 110%.

❖ Teste de homogeneidade de variâncias:

Este teste consiste na determinação das variâncias associadas à primeira e última concentração analisada da gama de trabalho ($S^2_{i=1}$ e $S^2_{i=N=8}$). Os parâmetros do teste de homogeneidade de variâncias foram calculados com o auxílio da **Equação 3.8** à **Equação 3.10**. A **Tabela 4.22** apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4.22 - Resultados do teste de homogeneidade de variâncias.

Parâmetro	$S^2_{i=1}$	$S^2_{i=N=8}$	PG	F
Valor obtido	$1,09 \times 10^{-11}$	$9,31 \times 10^{-10}$	85,33	99,45

Uma vez que se verifica que $PG < F$, então conclui-se que as diferenças de variância não são significativas e a gama de trabalho encontra-se bem ajustada.

3. Limites de detecção e quantificação

Os valores para os limites de detecção e de quantificação do método analítico foram determinados a partir da **Equação 3.11** e da **Equação 3.12**, respetivamente. Estes encontram-se na **Tabela 4.23**. Para o cálculo destes parâmetros foi necessário o valor do desvio padrão residual ($S_{y/x}$ - representado por S_{y1} na **Tabela 4.20**) e do declive da reta de calibração (apresentado na **Figura 4.22**).

Tabela 4.23 - resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação.

Concentração obtida (mg/mL)	
Limite de Detecção	0,0135
Limite de Quantificação	0,0409

4. Precisão

4.1. Repetibilidade

Foram preparadas sete amostras de Reagente C, uma delas, a solução padrão de trabalho, injetada 6 vezes (Tabela 4.24). As restantes seis amostras, soluções de repetibilidade, injetadas uma vez, cada uma (Tabela 4.25).

Tabela 4.24 - Solução padrão de trabalho, preparada para a repetibilidade pelo analista 1, no dia A.

Atividade (%)	m (mg)	V (mL)	C (mg/mL)
97,6	25,11	50	0,490

	1ª injeção	2ª injeção	3ª injeção	4ª injeção	5ª injeção	6ª injeção	Média	Desvio-padrão	%RSD
Área (AU)	1,270 x 10 ⁷	1,274 x 10 ⁷	1,276 x 10 ⁷	1,275 x 10 ⁷	1,273 x 10 ⁷	1,272 x 10 ⁷	1,273 x 10 ⁷	2,192 x 10 ⁴	0,172
%PC	96,2	96,5	96,7	96,6	96,5	96,4	96,5	0,2	0,2

Tabela 4.25 - Soluções repetibilidade de Reagente C, preparadas para a repetibilidade pelo analista 1, no dia A.

Soluções repetibilidade	Atividade (%)	m (mg)	V (mL)	C (mg/mL)	Área (AU)	%PC
Solução 1	97,6	25,14	50	0,491	1,285 x 10 ⁷	97,4
Solução 2		25,36		0,495	1,284 x 10 ⁷	97,3
Solução 3		25,24		0,493	1,288 x 10 ⁷	97,3
Solução 4		25,85		0,505	1,317 x 10 ⁷	97,3
Solução 5		25,27		0,493	1,300 x 10 ⁷	97,3
Solução 6		25,80		0,504	1,306 x 10 ⁷	97,4
Média					1,297 x 10 ⁷	97,3
Desvio-padrão					1,323 x 10 ⁵	0,05
%RSD					1,020	0,05

4.2. Precisão intermédia

Foram igualmente preparadas, por outro analista num dia diferente, sete amostras de Reagente C, sendo uma delas, a solução padrão de trabalho, injetada seis vezes (Tabela 4.26). As restantes seis amostras, soluções de precisão intermédia, foram também injetadas uma vez, cada uma (Tabela 4.27).

Tabela 4.26 - Solução padrão de trabalho, preparada para a precisão intermédia pelo analista 2, no dia B.

Atividade (%)	m (mg)	V (mL)	C (mg/mL)
97,6	25,42	50	0,496

	1ª injeção	2ª injeção	3ª injeção	4ª injeção	5ª injeção	6ª injeção	Média	Desvio- padrão	%RSD
Área (AU)	1,303 x 10 ⁷	1,305 x 10 ⁷	1,304 x 10 ⁷	1,307 x 10 ⁷	1,305 x 10 ⁷	1,306 x 10 ⁷	1,305 x 10 ⁷	1,327 x 10 ⁴	0,102
%PC	97,0	97,2	97,1	97,3	97,2	97,2	97,2	0,1	0,1

Tabela 4.27 - Soluções de precisão intermédia de Reagente C, preparadas para precisão intermédia pelo analista 2, no dia B.

Soluções precisão intermédia	Atividade (%)	m (mg)	V (mL)	C (mg/mL)	Área (AU)	%PC
Solução 1	97,6	25,14	50	0,498	1,305 x 10 ⁷	97,2
Solução 2		25,36		0,497	1,306 x 10 ⁷	97,3
Solução 3		25,24		0,488	1,266 x 10 ⁷	97,2
Solução 4		25,85		0,500	1,315 x 10 ⁷	97,3
Solução 5		25,27		0,495	1,314 x 10 ⁷	97,1
Solução 6		25,80		0,492	1,308 x 10 ⁷	97,2
Média					1,302 x 10 ⁷	97,2
Desvio-padrão					1,853 x 10 ⁵	0,1
%RSD					1,423	0,1

❖ **Limite de repetibilidade e Coeficiente de variação:**

O limite de repetibilidade, r , e o coeficiente de variação, CV, são determinados de acordo com o descrito pela **Equação 3.13** e **Equação 3.14**, respetivamente. Os resultados obtidos para estes parâmetros encontram-se na **Tabela 4.28**.

Tabela 4.28 - Resultados do limite de repetibilidade e do coeficiente de variação, para estudo da precisão.

Nº injeção	Solução repetibilidade, analista 1		Solução precisão intermédia, analista 2	
	%PC	$ X_i - X_{i-1} $	%PC	$ X_i - X_{i-1} $
1	97,4		97,2	
2	97,3	0,1	97,3	0,1
3	97,3	0	97,2	0,1
4	97,3	0	97,3	0,1
5	97,3	0	97,1	0,2
6	97,4	0,1	97,2	0,1
Limite de repetibilidade, r	0,143		0,209	
$X_i - X_{i-1} _{\max}$	0,100		0,200	
%CV = %RSD	0,053		0,077	

Uma vez que $|X_i - X_{i-1}|_{\max} \leq r$ e $CV < 10\%$, então verifica-se que existem boas condições de repetibilidade em ambos os ensaios, realizados por cada analista.

❖ Comparação estatística entre os dois ensaios:

Para comparar os ensaios realizados por cada analista, foi realizado o teste F, que verifica a semelhança estatística entre variâncias e, seguidamente, o teste T, que verifica a semelhança estatística entre médias das %PC. Estes resultados foram obtidos através do *Excel*. A **Tabela 4.29** apresenta os resultados do Teste F para os valores da %PC em cada ensaio.

Tabela 4.29 - Resultados do teste F obtidos por Excel, para os valores de %PC em cada ensaio para análise da precisão.

	Precisão intermédia, analista 2	Repetibilidade, analista 1
Média	97,2	97,3
Variância	5,67E-03	2,67E-03
Observações	6	6
gl	5	5
F	2,12	
$P(F \leq f)$ uni-caudal	0,21	
F crítico uni-caudal	5,05	

A hipótese nula é rejeitada se $F > F_{\text{crítico uni-caudal}}$. Tal não se verifica. Assim, conclui-se que as variâncias associadas aos valores das %PC não são estatisticamente diferentes, para os ensaios de ambos analistas.

Seguidamente, tendo em conta que as variâncias das %PC para os dois ensaios são estatisticamente semelhantes, foi realizado o Teste T. Este teste é utilizado para testar a hipótese nula de que as médias de dois conjuntos de dados, são iguais. Os resultados obtidos para este teste, encontram-se na **Tabela 4.30**.

Tabela 4.30 - Resultados do teste *T* obtidos por Excel, para os valores de %PC em cada ensaio para análise da precisão.

	Precisão intermédia, analista 2	Repetibilidade, analista 1
Média	97,2	97,3
Variância	5,67E-03	2,67E-03
Observações	6	6
Variância agrupada	4,17E-03	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	3,130	
<i>P</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) uni-caudal	0,005	
<i>t</i> crítico uni-caudal	1,812	
<i>P</i> (<i>T</i> ≤ <i>t</i>) bi-caudal	0,011	
<i>t</i> crítico bi-caudal	2,228	

A hipótese nula é rejeitada se Stat *t* > *t* crítico bi-caudal. Uma vez que esta condição não se verifica, então as médias dos valores da %PC não são estatisticamente diferentes para os ensaios realizados, por cada analista.

Desta forma, é possível concluir que os valores obtidos, são estatisticamente semelhantes ao realizar o método por analistas diferentes, confirmando, portanto, a precisão do método desenvolvido.

5. Exatidão

De forma a avaliar a exatidão do método, foram preparadas nove soluções: três réplicas a três níveis de concentração para cada (80%, 100% e 120%), tal como retratado na **Tabela 4.32**. Foi adicionalmente preparada uma solução padrão de trabalho, injetada seis vezes (**Tabela 4.31**)

Tabela 4.31 - Solução padrão de trabalho, preparada para avaliar a exatidão do método

Atividade (%)	m (mg)	V (mL)	C (mg/mL)
97,6	25,11	50	0,490

	1ª injeção	2ª injeção	3ª injeção	4ª injeção	5ª injeção	6ª injeção	Média	Desvio- padrão	%RSD
Área (AU)	1,270 x 10 ⁷	1,274 x 10 ⁷	1,276 x 10 ⁷	1,275 x 10 ⁷	1,273 x 10 ⁷	1,272 x 10 ⁷	1,273 x 10 ⁷	2,192 x 10 ⁴	0,172

Seguidamente, foi determinada a taxa de recuperação face à média das áreas da solução padrão de trabalho (esta média encontra-se representada na (**Tabela 4.31**)

Tabela 4.31). Os resultados obtidos para a taxa de recuperação, encontram-se na **Tabela 4.32**. Os parâmetros desta tabela foram determinados com base na **Equação 3.17** à **Equação 3.19**.

Tabela 4.32 - Soluções de Reagente C preparadas a 3 níveis e resultados obtidos para análise da exatidão.

Nível de concentração	nº injeção	Atividade (%)	m (mg)	V (mL)	C _{experimental} (mg/mL)	C _{Teórica} (mg/mL)	Recuperação (%)
80%	1	97,6	20,55	50,00	0,401	0,405	98,9
	2		20,69		0,404	0,405	99,8
	3		20,61		0,402	0,411	97,9
100%	1		25,14		0,491	0,495	99,2
	2		25,36		0,495	0,494	100,1
	3		25,24		0,493	0,496	99,4
120%	1		30,49		0,595	0,605	98,4
	2		30,34		0,592	0,606	97,7
	3		30,77		0,601	0,608	98,9

Uma vez que os valores de percentagem de recuperação se encontram dentro do intervalo de aceitação (entre 95% e 105%), para todas as soluções preparadas, então verifica-se que existem boas condições de exatidão para o método analítico desenvolvido.

4.2.4 Análise em LC-MS

Uma vez que o novo método analítico para a Limeciclina é compatível com LC-MS, foi finalmente possível realizar a identificação dos compostos presentes através da massa estimada, dada pela massa/carga (m/z).

Para esta análise foi utilizado o módulo de QDA, um detetor de massa acoplado ao UHPLC ACQUITY. O resultado desta análise encontra-se representado na **Figura 4.24**.

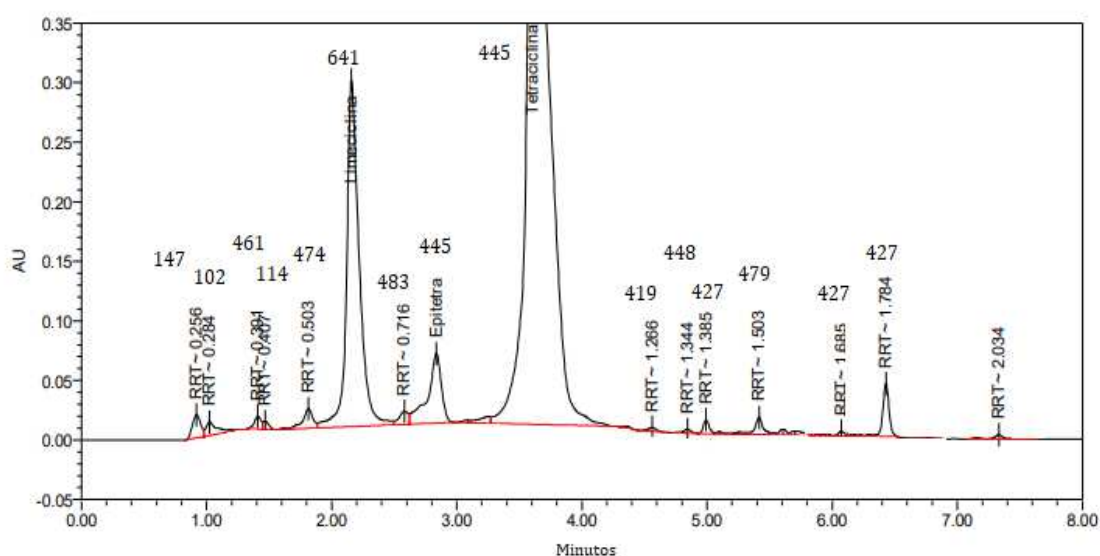


Figura 4.24 - Cromatograma de análise de Limeciclina em LC-MS.

A partir da **Figura 4.24**, foi possível associar as massas obtidas por espectrometria a massas conhecidas de compostos presentes na Limeciclina e identificar alguns picos desconhecidos. Esta análise revelou também a presença de vestígios de compostos derivados da degradação da Limeciclina. A **Tabela 4.33** resume essa identificação.

Tabela 4.33 - Identificação dos compostos de Limeciclina através de LC-MS.

RRT	Tempo de retenção (min.)	Massa molar (g/mol)	Composto
RRT~ 0.256	0,917	146	Reagente D
RRT~ 0.284	1,020	101	Reagente F
RRT~ 0.391	1,408	460	Por identificar
RRT~ 0.407	1,469	113	Por identificar
RRT~ 0.503	1,810	473	N-(aminometil)tetraciclina
Limeciclina	2,150	641 (602+39)	Limeciclina
RRT~ 0.716	2,567	483 (444+39)	Epitetraciclina
Epitetraciclina	2,822	444	Epitetraciclina
Tetraciclina	3,583	444	Tetraciclina
RRT~ 1.266	4,546	418	Por identificar
RRT~ 1.344	4,834	447	Por identificar
RRT~ 1.385	4,985	426	Epianidrotetraciclina
RRT~ 1.503	5,403	479	Clorotetraciclina
RRT~ 1.685	6,067	426	Epianidrotetraciclina
RRT~ 1.784	6,419	426	Anidrotetraciclina

4.3 Otimização do processo de produção de Limeciclina

O processo de fabrico da Limeciclina foi estudado com a finalidade de obtenção de um produto final mais estável.

⊗ DOE com alteração dos parâmetros físicos do processo original:

Como referido no **Subcapítulo 3.3**, para o estudo da otimização do processo de produção de Limeciclina, recorreu-se a um desenho fatorial completo com três fatores e três réplicas, cada um com dois níveis, ou seja, a representação genérica é 3×2^3 . Após a realização dos ensaios, foram retirados quatro tipos de respostas, ficando assim com quatro tratamentos de dados, foi aplicado um intervalo de confiança de 95%.

Visto que o DOE foi executado com a finalidade de obter uma Limeciclina mais estável e uma vez que após a síntese de produto, este foi submetido a condições de estabilidade, então foi possível obter as seguintes respostas:

- %PC de limeciclina, antes da estabilidade;
- doseamento de impurezas totais, antes da estabilidade;
- variação da %PC de limeciclina após estabilidade;
- variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Sendo o resultado de cada variação dado pelo módulo da diferença entre o valor antes de estabilidade e o valor após estabilidade.

Devido à degradação de limeciclina, tal como seria espectável, a submissão de Limeciclina a condições adversas, como as praticáveis na estabilidade, levaram à diminuição da %PC de limeciclina e ao aumento do doseamento de todas as impurezas.

Adicionalmente, foi medido o tamanho do grão em determinados lotes onde se obtiveram resultados críticos, de forma a verificar se este parâmetro tem influência nas diferenças observadas nos diversos lotes, e consequentemente, na estabilidade do produto.

De salientar que o doseamento das impurezas da Limeciclina foi obtido através do método analítico compendial da FE, realizado pelo CQ, e não pelo novo método analítico desenvolvido no ID, uma vez que as impurezas ainda se encontram em fase de estudo. Já os valores de %PC de limeciclina, foram obtidos através do novo método analítico desenvolvido.

❖ **Análise à %PC de limeciclina**

Relativamente à análise feita ao valor percentual de pureza cromatográfica de limeciclina, após a elaboração do Algoritmo de Yates (representado pela **Tabela F.2 no Anexo F: Resultados do DOE**) foi então possível contruir a ANOVA, representada pela **Tabela 4.34**. Tal como se encontra integralmente explicado no **Anexo E: Fórmulas e elaboração de tabelas para estudo do DOE**, foi determinado o valor da distribuição de Fisher, $F_{10\%,1,16}=3,05$. Neste caso, aumentou-se o nível de significância, α , de 5% para 10%, caso contrário, não se obteriam fatores significativos. Ao observar a **Tabela 4.34**, verifica-se que apenas uma interação rejeita a hipótese nula $F_0 > F_{\text{crítico}}$ (interação A, assinalada a cinzento escuro).

Tabela 4.34 - Tabela ANOVA - %PC de limeciclina.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0
A	4,91	1	4,91	3,37
B	0,30	1	0,30	0,20
AB	0,25	1	0,25	0,17
C	0,14	1	0,14	0,09
AC	2,12	1	2,12	1,46
BC	0,92	1	0,92	0,63
ABC	0,23	1	0,23	0,16
Erro	23,28	16	1,46	-
Total	32,14	23	-	-

Seguidamente, foi construída a tabela ANOVA condensada (**Tabela 4.35**), na qual consta apenas o fator significativo A. Recalculou-se o valor da distribuição de Fisher de modo a comprovar que o fator continua a rejeitar a hipótese nula: $F_{10\%,1,22}=2,95$. Uma vez verificada esta condição, foi calculado o valor da contribuição líquida do erro (ρ) e constatou-se que este possuía um valor superior a 50,0%. Assim, foi diminuído o intervalo de confiança de 90% para 75%, no entanto, verifica-se o mesmo cenário. Este valor pode ser tomado como consequência de existir uma grande variação provocada por outros fatores alheios ao desenho de experiências realizado, como é o caso do tempo. O tempo decorrido entre a análise feitas entre diferentes lotes, poderá favorecer a variabilidade da %PC de limeciclina, uma vez que ocorre espontaneamente uma reação de degradação desta molécula.

Tabela 4.35 - Tabela ANOVA condensada - %PC de limeciclina.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SSx</i>	<i>Vx</i>	<i>MSx</i>	<i>F0</i>	<i>ρx</i>
<i>A</i>	4,91	1	4,91	3,96	0,11
<i>Erro</i>	27,23	22	1,24	-	0,89
<i>Total</i>	32,14	23	-	-	1

Após a realização da ANOVA, existe necessidade de verificar se os pressupostos matemáticos utilizados, são verdadeiros. O método normalmente utilizado para averiguar o cumprimento dos pressupostos, é a análise dos resíduos (valores na **Tabela F.3** do **Anexo F**). As **Figuras F.1, F.2** e **F.3** representam, respetivamente, o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e da homogeneidade da variância. Todos os pressupostos são cumpridos, tal como se encontra mencionado no **Anexo F**.

Finalmente, foi determinado o somatório das respostas para o nível alto e baixo do fator significativo A (**Tabela 4.36**). Como o objetivo é que o produto de Limeciclina, tenha a maior %PC de limeciclina possível, então o melhor nível será o alto, visto que apresenta um valor superior (sombreado a cinzento escuro). Relativamente aos restantes fatores do DOE, B e C, dado que estes não foram considerados significativos, então foram escolhidos os seus níveis mais económicos, neste caso, o nível baixo para ambos (velocidade de agitação de 80 rpm e 45 minutos de adição da solução de Reagente D).

Tabela 4.36 - Melhores níveis - %PC de limeciclina.

A+	A-
307,14	296,29

❖ Análise ao doseamento de impurezas totais

Relativamente à análise do doseamento de impurezas totais na Limeciclina, depois do algoritmo de Yates (**Tabela F.5** no **Anexo F**) foi então construída a ANOVA (**Tabela 4.37**). Ao verificar o valor da distribuição de Fisher $F_{5\%;1;16}=4,49$ constatamos que apenas o fator A rejeita a hipótese nula (sombreado a cinzento escuro).

Tabela 4.37 – Tabela ANOVA - Doseamento de impurezas totais.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0
A	2,04	1	2,04	11,14
B	0,00	1	0,00	0,00
AB	0,04	1	0,04	0,23
C	0,11	1	0,11	0,58
AC	0,04	1	0,04	0,23
BC	0,33	1	0,33	1,78
ABC	0,00	1	0,00	0,01
Erro	2,93	16	0,18	-
Total	5,49	23	-	-

Uma vez gerada a ANOVA condensada (**Tabela 4.38**), foi então necessário averiguar se o fator A continuava a rejeitar a hipótese nula para o novo valor da distribuição de Fisher $F_{5\%;1;22}=4,30$, o que se comprova.

Tabela 4.38 - Tabela ANOVA condensada - Doseamento de impurezas totais.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0	ρ_x
A	2,04	1	2,04	13,01	0,34
Erro	3,45	22	0,16	-	0,66
Total	5,49	23	-	-	1

Calculou-se a contribuição líquida do erro, de modo a verificar se este era inferior a 50%. Este critério não é novamente cumprido, pelo que foi diminuído o intervalo de confiança para 75%. Contudo, o valor permanecia superior a 50%. Como referido anteriormente, a persistência deste valor pode dever-se ao facto de o tempo ser um fator significativo, influenciando os resultados do DOE.

Foram avaliados os pressupostos assumidos para a análise de variância, representados graficamente pelas **Figuras F.4, F.5 e F.6**. Tal como se encontra no **Anexo F**, todos os pressupostos foram satisfeitos.

Finalmente, foram determinados os somatórios das respostas de cada nível (**Tabela 4.39**). Visto que se pretende o menor doseamento de impurezas totais possível na Limeciclina, então o melhor nível será o baixo (sombreado a cinzento escuro). Novamente, para os restantes fatores é selecionado o nível mais económico, neste caso, o nível baixo para ambos.

Tabela 4.39 - Melhores níveis - Doseamento de impurezas totais.

A+	A-
43,30	36,30

❖ **Variação da %PC de limeciclina após estabilidade**

Como já referido, após a síntese dos 24 lotes de Limeciclina obtidos através das experiências do DOE, estas seguiram para condições de estabilidade, sendo, posteriormente, reanalisadas. Assim, foi possível obter o valor da diferença entre a %PC de limeciclina antes de estabilidade e %PC depois da estabilidade (**Tabela F.7 no Anexo F**). O objetivo é obter uma diferença mínima entre estes valores, sendo esta variação, um dos parâmetros que avaliará a estabilidade do produto.

Foi então construída a ANOVA (**Tabela 4.40**) após a realização do Algoritmo de Yates (**Tabela F.8 no Anexo F**). Ao verificar o valor da distribuição de Fisher: $F_{25\%;1;16}=1,43$, constatamos que as interações AC e BC rejeitam a hipótese nula (sombreado a cinzento escuro). Foi utilizado um valor nível de significância igual a 25%, pois, caso contrário, não se verificariam fatores ou interações significativas.

Tabela 4.40 - ANOVA – Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0
A	0,01	1	0,01	0,0043
B	0,07	1	0,07	0,0492
AB	0,06	1	0,06	0,0433
C	1,22	1	1,22	0,8765
AC	3,50	1	3,50	2,5219
BC	2,29	1	2,29	1,6548
ABC	0,07	1	0,07	0,0540
Erro	22,18	16	1,39	-
Total	29,39	23	-	-

Procedeu-se então à construção da ANOVA condensada (**Tabela 4.41**), incluindo somente as interações significativas (AC e BC).

Tabela 4.41 - ANOVA condensada - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0	ρx
AC	3,50	1	3,50	3,11	0,08
BC	2,29	1	2,29	2,04	0,04
Erro	23,60	21	1,12	-	0,88
Total	29,39	23	-	-	1

Foi necessário averiguar se as interações continuavam a rejeitar a hipótese nula para o novo valor da distribuição de Fisher $F_{25\%;1;21}=1,40$, o que se comprova. Contudo, quando é avaliada a contribuição líquida do erro, este valor mostra-se superior a 50%. A explicação para este cenário, foi já explicada anteriormente.

Os pressupostos assumidos para a análise de variância, foram avaliados através das representações gráficas retratadas pelas **Figuras F.7, F.8 e F.9** para o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e homogeneidade da variância, respetivamente. Novamente, foram todos cumpridos.

Foram então determinados os somatórios das respostas para a combinação de níveis de cada interação (**Tabela 4.42**). Visto que se pretende o menor valor de variação de %PC de limeciclina após o processo de estabilidade, então a melhor combinação de níveis será A+C- e B-C- (sombreado a cinzento escuro).

Tabela 4.42 – Melhores níveis – Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

A+C+	A+C-	A-C+	A-C-		B+C+	B+C-	B-C+	B-C-
46,98	39,70	42,59	44,47		43,25	44,26	46,32	39,91

❖ Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade

Neste caso, pretende-se igualmente que a diferença entre o doseamento de impurezas totais inicialmente medido e o doseamento após estabilidade, seja mínimo. Caso contrário, significa que a quantidade de impurezas no produto, aumentou.

A ANOVA encontra-se representada na **Tabela 4.43**. Ao verificar o valor da distribuição de Fisher: $F_{5\%;1;16}=4,49$, conclui-se que o fator A é o único significativo (sombreado a cinzento escuro).

Tabela 4.43 - ANOVA – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0
A	1,30	1	1,30	7,42
B	0,00	1	0,00	0,00
AB	0,00	1	0,00	0,01
C	0,00	1	0,00	0,01
AC	0,02	1	0,02	0,12
BC	0,48	1	0,48	2,76
ABC	0,01	1	0,01	0,07
Erro	2,80	16	0,18	-
Total	4,62	23	-	-

Procedeu-se então à construção da ANOVA condensada (**Tabela 4.44**), que inclui apenas o fator A significativo.

Tabela 4.44 - ANOVA condensada – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Fonte de Variação	SSx	Vx	MSx	F0	px
A	1,30	1	1,30	8,60	0,25
Erro	3,32	22	0,15	-	0,75
Total	4,62	23	-	-	1

Tendo em conta o novo valor da distribuição de Fisher $F_{5\%;1;22}=1,40$, foi necessário averiguar se as interações continuavam a rejeitar a hipótese nula, o que se comprova. Novamente, quando é avaliada a contribuição líquida do erro, este valor revela-se superior a 50%. A explicação para esta condição poderá dizer respeito ao facto de o tempo ser significativo no estudo do DOE, tal como explicado anteriormente.

Todos os pressupostos assumidos para a análise de variância, foram cumpridos. Este foram avaliados através das representações gráficas retratadas pelas **Figuras F.10, F.11 e F.12 (Anexo F)** para o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e homogeneidade da variância, respetivamente.

Por fim, foram determinados os somatórios das respostas para a combinação de níveis de cada interação (**Tabela 4.45**). Uma vez que se pretende o menor valor possível de variação do doseamento de impurezas totais na Limeciclina após esta ser submetida a condições de estabilidade, então o melhor nível será o alto (sombreado a cinzento escuro).

Tabela 4.45 – Melhores níveis – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

A+	A-
43,04	48,62

❖ Melhores níveis

Na **Tabela 4.46** estão compilados os melhores níveis obtidos para cada resposta, assim a conclusão para os melhores níveis que conduzem à otimização do processo, neste caso, que levariam à obtenção de um produto mais estável.

Relativamente à conclusão do melhor nível para o fator A, a maioria das respostas obtêm o nível alto como melhor nível, pelo que este será concedido. O fator B não é significativo para a maior parte das respostas, sendo atribuído o nível mais económico. Uma vez que o nível mais económico é o baixo, e visto que para a variação da %PC de limeciclina após estabilidade, se obteve o nível baixo, então este será o nível concedido. À semelhança do fator B, o mesmo acontece para o fator C.

Tabela 4.46 - Conclusão da escolha dos melhores níveis dos fatores que conduzem à otimização do processo de Limeciclina.

		Fator	A	B	C
Respostas	%PC limeciclina		+	+Econ.	+Econ.
	Doseamento impurezas totais		-	+Econ.	+Econ.
	Variação de %PC de limeciclina após estabilidade		+	-	-
	Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade		+	+Econ.	+Econ.
Conclusão			+	-	-

Assim sendo, decodificando os níveis e fatores, os melhores parâmetros que conduzem à otimização do processo, encontram-se na **Tabela 4.47**.

Tabela 4.47 - Descrição dos melhores níveis que conduzem à otimização do processo de Limeciclina.

Fatores	Melhores níveis
Temperatura após adição da solução de Reagente D	Temperatura ambiente
Velocidade de agitação durante a adição de solução de Reagente D	80 rpm
Tempo de adição da solução de Reagente D	45 minutos

Embora tenha sido possível chegar a uma conclusão relativamente aos melhores níveis gerais, verificou-se também que todas as análises aquando da construção da ANOVA condensada, possuíam um valor de contribuição líquida do erro superior a 50%. Desta forma, as conclusões não devem ser tomadas como válidas. Este valor significa que ficou uma grande percentagem da variação sofrida nos resultados fora de observação, ou seja, fora dos fatores considerados neste estudo.

❖ **Análise do tamanho de grão**

A análise do tamanho de grão de Limeciclina foi realizada após a submissão dos lotes a condições de estabilidade e respetiva reanálise dos parâmetros de especificação. Desta forma, foi possível averiguar quais os lotes que mais divergiam nos seus resultados após a estabilidade, comparativamente aos restantes, sendo analisado o tamanho de grão apenas para esses casos. O objetivo será verificar se este parâmetro tem influência nas diferenças observadas nos diversos lotes, e consequentemente, na estabilidade do produto.

Na **Figura 4.25** encontra-se graficamente representada, para os 24 lotes obtidos através das experiências do DOE, a variação obtida após estabilidade dos valores de %PC de limeciclina e dos valores de doseamento de impurezas totais. Adicionalmente, encontra-se assinalado:

- A **vermelho**: os lotes onde se verifica elevadas variações tanto da %PC limeciclina, como do doseamento de impurezas totais. Ou seja, onde o teor de limeciclina desceu mais, aumentando as impurezas.
- A **verde**: os lotes onde se verifica ligeiras variações nos mesmos parâmetros. Ou seja, onde o teor de limeciclina não desceu tanto, nem as impurezas subiram tão consideravelmente, portanto, os lotes que permaneceram relativamente “estáveis”.

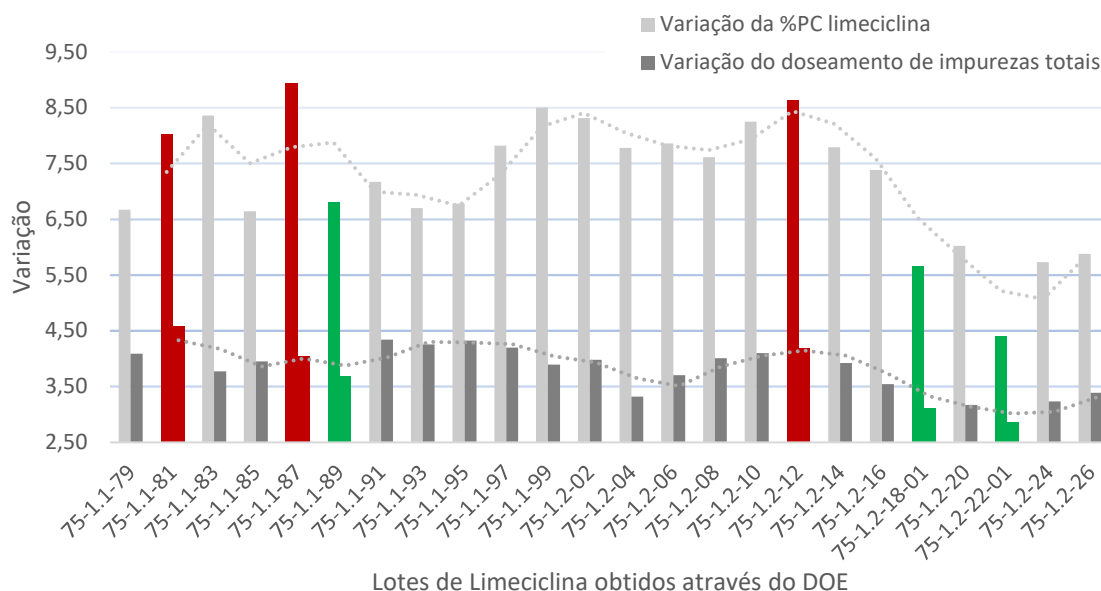


Figura 4.25 - Representação gráfica das variações de %PC de limeciclina e de doseamento de impurezas totais, após estabilidade, para os 24 lotes de Limeciclina obtidos através das experiências do DOE.

Os 6 lotes de Limeciclina assinalados com as cores vermelha e verde na **Figura 4.25**, foram os escolhidos para análise granulométrica. Foi ainda analisado o lote obtido através do ensaio padrão, e um lote da indústria utilizado para comparação.

A análise granulométrica foi realizada na FCT com recurso ao *Malvern Morphologi G3*. Este trata-se de um microscópio automatizado que, juntamente com o respetivo software, permite a caracterização de partículas. O instrumento mede o tamanho e forma de partículas de uma amostra de pó, apresentando os dados de acordo com as preferências do utilizador.

Dado que nem todos os componentes de uma amostra têm o mesmo tamanho, então existe a necessidade de representar os resultados matematicamente através de uma distribuição. Neste caso, os resultados foram obtidos por distribuição do tamanho de partículas em volume (Dv), com base na análise de 30000 partículas por cada lote. Através desta distribuição, são adquiridos 3 resultados, nomeadamente:

- Dv (90) – corresponde ao tamanho, até e incluído, do qual 90% do volume total dos componentes na amostra estão “contidos”. Por exemplo, se Dv (90) = 220nm, então significa que 90% do volume da amostra tem um tamanho igual ou inferior a 220nm.
- Dv (50) – valor abaixo do qual 50% do volume da amostra está contido.
- Dv (10) – tamanho abaixo do qual 10% do volume da amostra está contido.

Assim, os resultados obtidos para cada lote analisado de Limeciclina, encontram-se graficamente representados na **Figura 4.26**.

Os valores que permitiram a construção gráfica da **Figura 4.26**, encontram-se na **Tabela G.1** do **Anexo G: Análise do tamanho de grão**. Neste anexo é possível encontrar também, pela **Figura G.1**, a representação gráfica dos resultados da distribuição de tamanho em volume, para todos os lotes analisados.

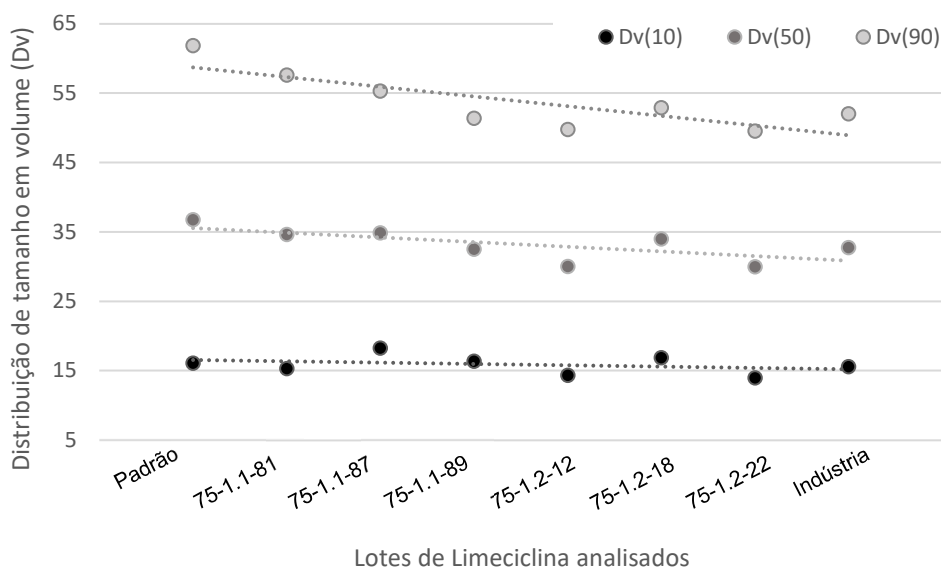


Figura 4.26 – Representação gráfica dos resultados da distribuição de tamanho em volume, para os lotes de Limeciclina analisados, obtidos através do software do Malvern Morphologi G3.

Pela observação da **Figura 4.26**, constata-se que todos os lotes de Limeciclina analisados, seguem uma distribuição de tamanho muito semelhante. Ou seja, os resultados encontram-se todos na mesma gama, não existindo praticamente variação entre experiências. Assim, é possível concluir que o tamanho de grão não influencia as diferenças que se observaram nos diferentes lotes. Esta conclusão é também corroborada, não só pelos baixos valores de %RSD para cada conjunto de valores de Dv (10), Dv (50) e Dv (90) (**Tabela G.1** em **Anexo G**), como também pela **Figura G.1** (**Anexo G**) que demonstra a homogeneidade de distribuição de tamanhos dos vários lotes.

❖ Influência no método de secagem

Ao observar a **Figura 4.25**, verifica-se uma descida das variações, tanto de %PC de limeciclina, como de doseamento de impurezas totais, a partir do lote 75-1.2-16. Coincidentemente, o método de secagem realizado no processo de produção de Limeciclina, foi alterado a partir deste lote. Os métodos de secagem executados em cada conjunto de lotes, apresentam-se na **Figura 4.27**.

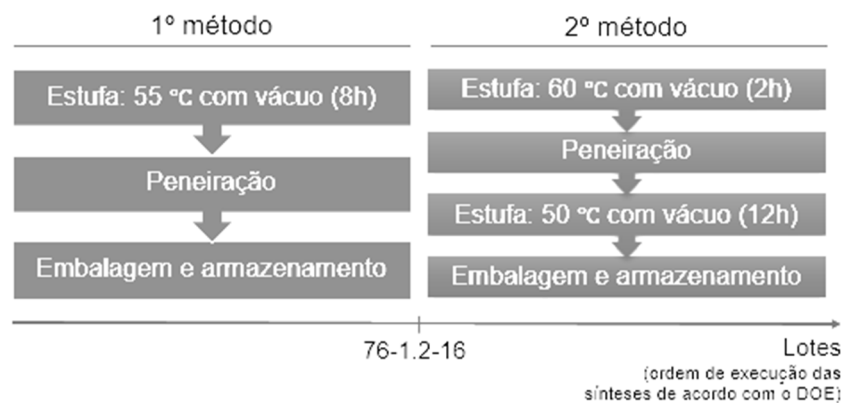


Figura 4.27 - Representação esquemática dos métodos de secagem executados na síntese dos lotes de Limeciclina.

Como seria espetável, também a humidade de Limeciclina diminuiu a partir da síntese do referido lote (**Figura 4.28**). Tal acontece porque, após a peneiração, ocorre a fragmentação de aglomerados de cristais (unidos devido à humidade). Assim, de acordo com o 1º método de secagem, cristais que se encontrassem no centro do aglomerado, continuariam húmidos. No entanto, o 2º método de secagem, promove a desidratação dos mesmos.

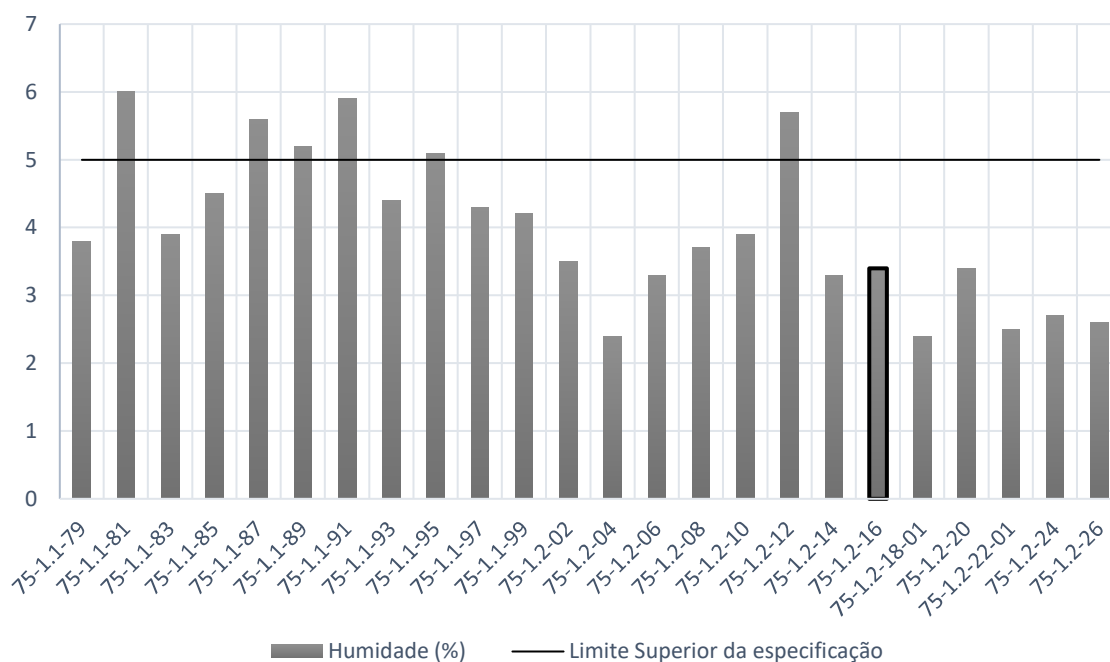


Figura 4.28 - Representação gráfica dos valores percentuais de humidade dos lotes de Limeciclina.

Desta forma, verifica-se, tal como se encontra graficamente representado pela **Figura 4.29**, que existe uma relação de proporcionalidade direta entre a humidade do produto e a sua estabilidade, uma vez que quanto maior a humidade, maior a variação (diminuição) de pureza cromatográfica de limeciclina, aumentando a formação de impurezas.

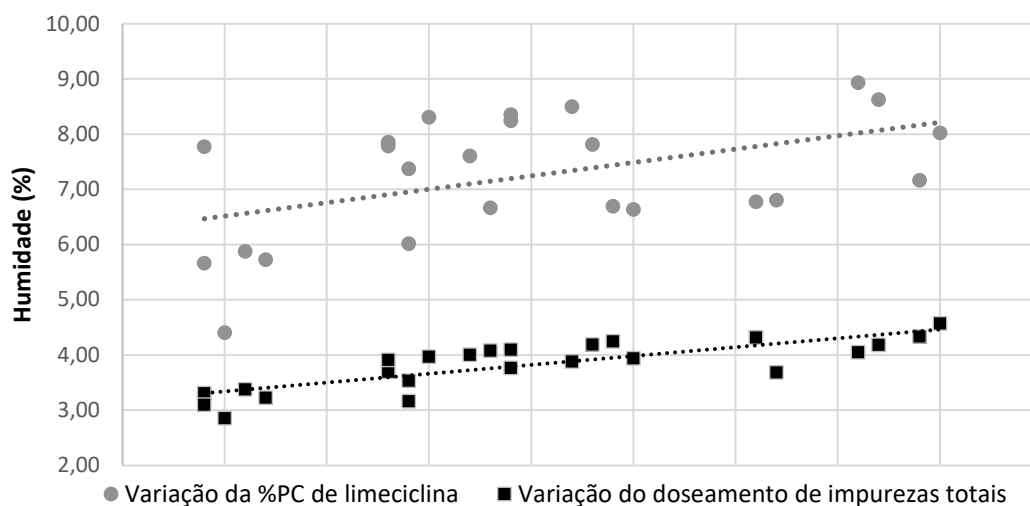


Figura 4.29 - Representação gráfica da variação de %PC de limeciclina e da variação do doseamento de impurezas totais, em função da humidade percentual dos respetivos lotes de Limeciclina.

⊗ **Processo com matérias-primas de partida diferentes do processo original:**

Na **Figura 4.30** encontra-se representado o cromatograma da Limeciclina sintetizada pelo procedimento original Cipan vs. a Limeciclina obtida através da síntese com Reagente H, ou seja, sem a adição de Reagente F.

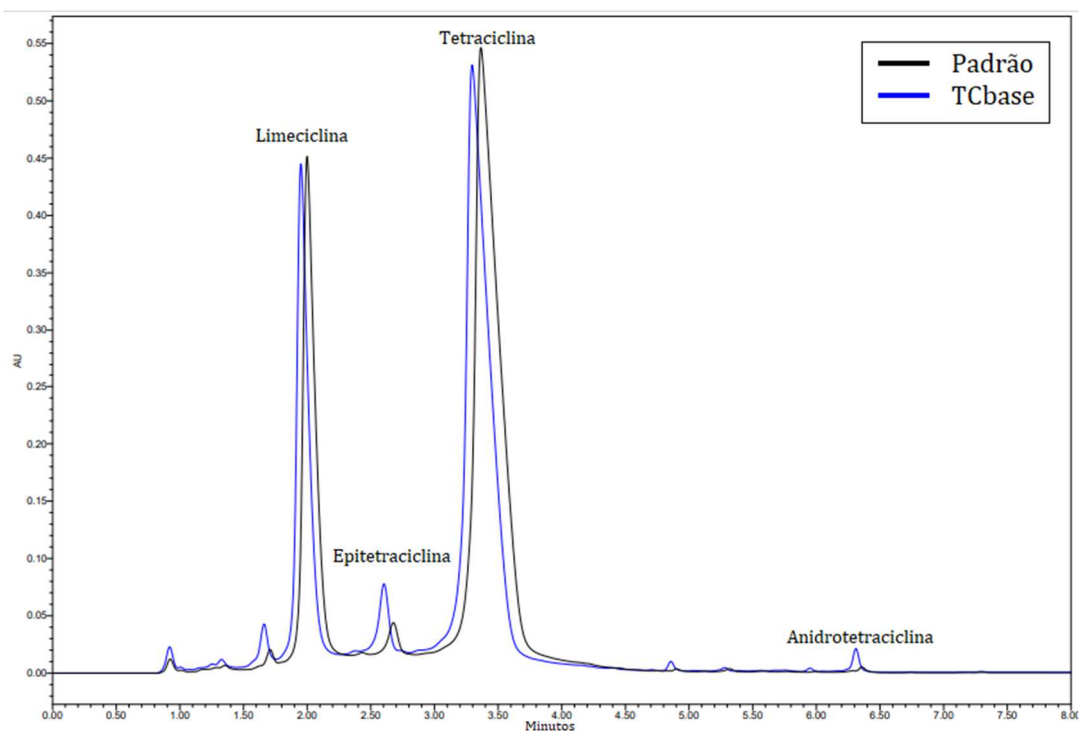


Figura 4.30 - Cromatograma de Limeciclina obtida pelo processo padrão vs. obtida a partir de Reagente H.

Verifica-se, através da **Figura 4.30**, que a Limeciclina obtida com recurso à Reagente H, comparativamente à Limeciclina produzida pelo processo padrão, possui menor quantidade de limeciclina e maior quantidade de impurezas, principalmente, epitetraciclina e anidrotetraciclina. A diferença entre lotes é de cerca de 40% e 75%, respetivamente, para cada impureza.

A diferença na impureza de epitetraciclina deve-se possivelmente à diferença de temperatura durante a etapa de precipitação: no procedimento original procede-se a um arrefecimento entre 5 e 10 °C, ao passo que no processo com Reagente H, esta etapa ocorre à temperatura ambiente. Assim, a temperaturas mais elevadas, é natural que ocorra epimerização da tetraciclina [17, 29]. No que diz respeito à diferença na impureza de anidrotetraciclina entre os dois lotes, poderá ser explicada devido à discrepância de humidade de cada pó: 5,3% no lote padrão e 6,2% no lote com Reagente H [17].

À semelhança dos lotes produzidos em cada experiência do DOE, também estes lotes de Limeciclina, padrão e com Reagente H, foram submetidos a condições de estabilidade. O cromatograma obtido para ambos os lotes após a estabilidade, encontra-se representado na **Figura 4.31**.

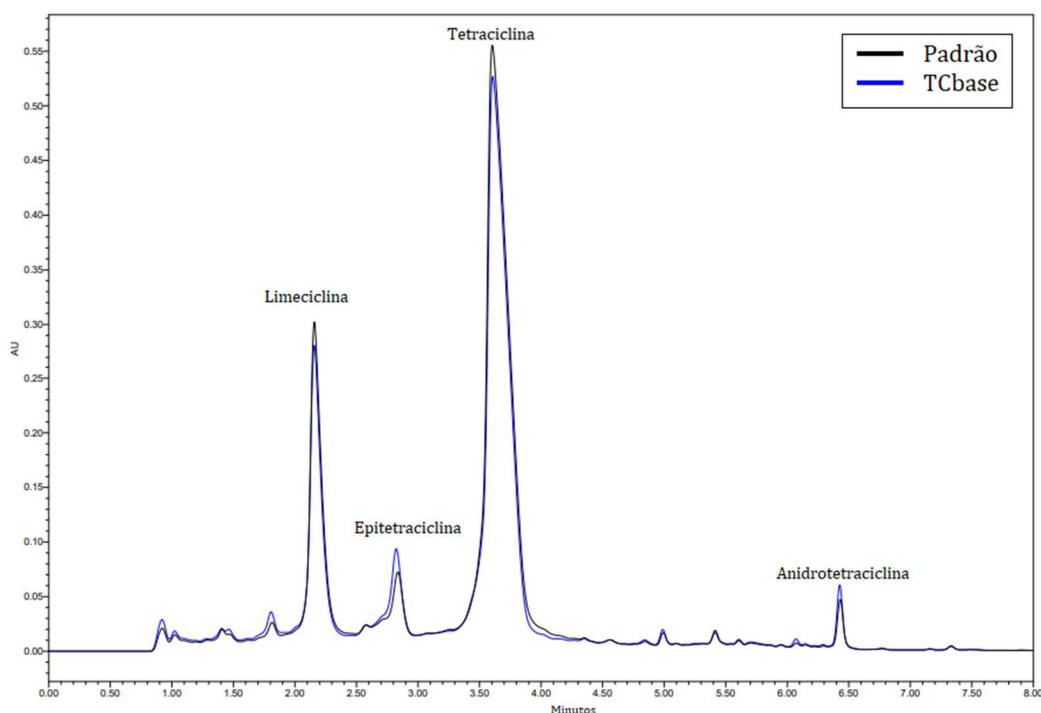


Figura 4.31 - Cromatograma de Limeciclina obtida pelo processo padrão vs. obtida a partir de Reagente H, após submetida a condições de estabilidade.

Identicamente ao observado na **Figura 4.30**, também na **Figura 4.31** se verifica menor quantidade de limeciclina e maior quantidade de impurezas no lote sintetizado com Reagente H, após submetidos a condições de estabilidade. É necessário averiguar qual a percentagem de variação de %PC de limeciclina e de %PC de impurezas em cada lote. Os resultados obtidos para estes valores, encontram-se na **Tabela 4.48**.

Tabela 4.48 - Valor percentual observado na diminuição de limeciclina e aumento de impurezas, em cada lote, após estabilidade.

Ensaio	%Diminuição de limeciclina	%Aumento de epitetraciclina	%Aumento de tetraciclina	%Aumento de anidrotetraciclina
Padrão	29%	37%	0,6%	88%
Reagente H	31%	24%	2,1%	63%

Verifica-se, através da **Tabela 4.48**, que o lote de Limeciclina obtido pelo ensaio padrão é aquele em que se obtém maior aumento de impurezas (epitetraciclina e anidrotetraciclina).

Apesar de se obterem aumentos de impurezas superiores no ensaio padrão, não é possível afirmar que o ensaio realizado com Reagente H, conduz a Limeciclina mais estável, uma vez que aumentos de 24% de epitetraciclina e 63% de anidrotetraciclina são também altamente consideráveis.

⊗ Aumento de massa por absorção de água da atmosfera:

De modo a confirmar a natureza higroscópica da Limeciclina, uma porção deste pó (2,00 g) foi deixada ao ar e pesada em diferentes intervalos de dias, durante cerca de três meses. Os resultados da variação percentual da massa de Limeciclina, face ao valor medido no dia 0, encontram-se graficamente representados na **Figura 4.32**.

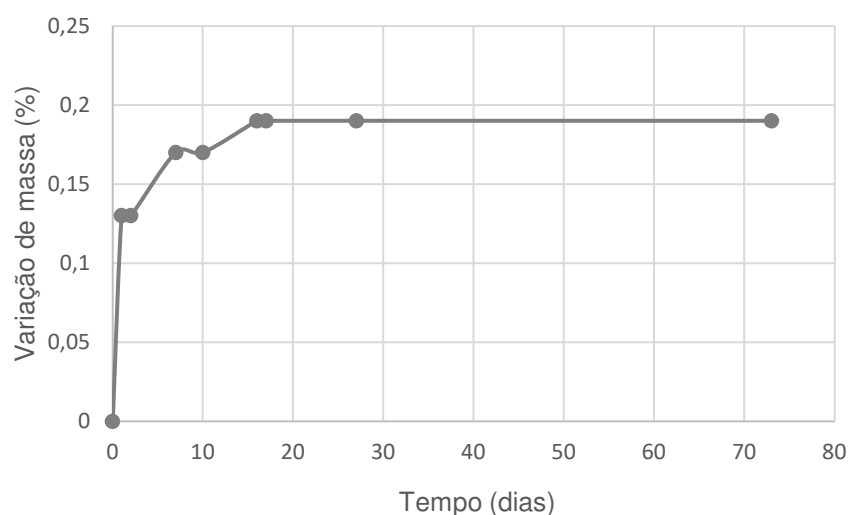


Figura 4.32 – Representação gráfica da variação de massa de Limeciclina descoberta, durante cerca de 3 meses.

Através da **Figura 4.32**, é visível um aumento de massa de Limeciclina, principalmente nos primeiros 15 dias. Após esse período, observa-se que a variação de massa se mantém constante. Apesar de realmente se constatar absorção de água da atmosfera por parte deste produto, a variação de massa não excede os 0,2%, o que leva a crer que a Limeciclina poderá não ter, ao contrário do que se acredita, natureza higroscópica.

5. Conclusões e propostas de trabalho futuro

A principal finalidade deste projeto foi a otimização da síntese de oxitetraciclina cálcica e de Limeciclina, assim como, o desenvolvimento de um novo método analítico para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que permitisse o estudo deste último produto.

No que diz respeito à oxitetraciclina cálcica e ao facto deste produto apresentar valores de cálcio frequentemente fora dos limites de especificação, verificou-se que esta situação pode ocorrer devido à rápida adição de Reagente B na indústria (7h), conduzindo à formação de diferentes complexos de cálcio e de oxitetraciclina cálcica com diferentes estequiometrias. Constatou-se também, nos ensaios laboratoriais, que o tempo de adição de Reagente B é um fator crítico na etapa de filtração dos cristais de oxitetraciclina cálcica, uma vez que rápidas adições ($\approx 3h$) levam a elevados tempos de filtração.

Foi estudada a eliminação de uma das etapas do processo: a purificação de Reagente A (através de adição de adjuvante de filtração C e filtração por etapa A). Constatou-se que a eliminação desta etapa favorece os resultados de cálcio no produto, uma vez que 40% dos valores obtidos nesta fase de testes, ficaram dentro dos limites de especificação. Devido à vantagem económica e uma vez que, à partida, não se justifica a etapa A no processo, sugere-se que futuramente se estude com maior detalhe a eliminação da mesma, de forma a removê-la por completo do processo de produção industrial.

Uma vez que o Reagente B se encontra 30% em excesso molar no processo original, foi testada a redução da concentração adicionada de duas formas:

- Obtenção de proporção estequiométrica entre cloridrato de oxitetraciclina e Reagente B (2:1);
- Quantidade intermédia de Reagente B adicionada (2:1,2).

Conclui-se que é possível diminuir a concentração de cálcio na oxitetraciclina cálcica através da redução da concentração de Reagente B adicionada durante a precipitação. No entanto, devido à variabilidade dos resultados obtidos, não é possível quantificar esse efeito, nem comprovar que o efeito a nível laboratorial será semelhante ao efeito a nível industrial em termos quantitativos. Sugere-se, portanto, uma diminuição gradual da [Reagente B] adicionada no processo industrial, de modo a observar o seu efeito.

Nos estudos em torno da oxitetraciclina cálcica, observou-se que uma secagem eficiente é fundamental para obtenção de bons resultados de cálcio, uma vez que a concentração de Solvente C que permanece no produto (quando superior a 3000 ppm) influencia estes resultados.

Foi realizado o *scale-up* do processo otimizado, de forma a verificar se os resultados obtidos em laboratório, se mantinham. Os ensaios de kilo-lab não foram reproduzíveis aos laboratoriais devido a perturbações na etapa de filtração. Concluiu-se que esta falha no aumento de escala se deve à falta de semelhança geométrica, principalmente, no reator onde ocorre precipitação.

No entanto, fatores como o tempo de adição de Reagente B e velocidade de agitação durante a precipitação, também se mostraram fatores críticos para obtenção de bons resultados no aumento de escala.

Antes de prosseguir com ensaios para a otimização do processo de produção de Limeciclina, foi fundamental o desenvolvimento de um novo método analítico para o seu estudo. Pretendia-se que este método superasse as limitações associadas ao método compendial atualmente implementado na empresa, nomeadamente:

- não ser possível visualizar o pico da limeciclina no cromatograma (uma vez que a limeciclina é totalmente hidrolisada em tetraciclina);
- recurso a um número elevado de solventes;
- elevado tempo de análise (60 minutos) e de preparação das amostras (16 a 24 horas).

O objetivo inicialmente estipulado foi cumprido:

- o estudo de Limeciclina, através da visualização de picos cromatográficos bem definidos e com boa resolução entre estes (superior a 1,5);
- recurso a uma quantidade de solventes reduzida (apenas Aditivo A, água e Solvente B), assim como o tempo de preparação (2 minutos) e tempo de corrida.

Além disso, é um método compatível com espetrometria de massa (LC-MS), o que permitiu a identificação de cerca de 73% dos compostos presentes na Limeciclina através da massa estimada, dada pela massa/carga.

Verificou-se que, devido à rápida hidrólise de limeciclina, o momento adequado para determinação do valor de pureza cromatográfica, seria o instante $t=2$ min (tempo mínimo entre a preparação e injeção da amostra).

O método analítico desenvolvido demonstrou-se, nas condições em que é praticado, que tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida, uma vez que foi provada a sua especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

Até ao momento, não foi possível determinar o Fator de Resposta Relativo (RRF) de limeciclina, pelo que o método analítico desenvolvido permite apenas o estudo e determinação da %PC de cada pico. Assim, propõe-se uma investigação com o objetivo de isolar limeciclina e determinar o respetivo RRF, permitindo não só o doseamento desta molécula através do método analítico desenvolvido, como a respetiva validação do mesmo para limeciclina.

A otimização do processo de produção de Limeciclina foi realizada com o intuito de obtenção de um produto mais estável. Considerava-se a hipótese de que a instabilidade da Limeciclina se devia não só à absorção de água da atmosfera, como também à sua percentagem significativa de humidade. No entanto, foram alcançadas as seguintes conclusões:

- Com o objetivo de aumentar o tamanho de grão de Limeciclina, foram realizadas alterações da temperatura, velocidade de agitação e tempo de adição de Reagente D

durante a precipitação. Verificou-se que a alteração destes parâmetros não influencia a estabilidade do produto.

- Não se observaram alterações no tamanho de grão de Limeciclina, pelo que este fator não é influenciado pelas condições alteradas durante a precipitação. Consequentemente, este parâmetro físico do cristal não é responsável pela instabilidade do API.
- A estabilidade de Limeciclina é afetada pelo método de secagem. Valores mais baixos de humidade no produto levaram a variações mais reduzidas de %PC de limeciclina e de doseamento de impurezas totais, após estabilidade.
- O ensaio com Reagente H, do qual se obtém um produto sem cariz higroscópico, não se mostrou mais estável comparativamente com o ensaio padrão. Assim, não é a produção de sais com cariz higroscópico, que faz com que a Limeciclina não seja estável.
- A Limeciclina não provou ser higroscópica. Apesar de realmente se constatar absorção de água da atmosfera por parte deste produto, a variação de massa não excede os 0,2%. Assim, a instabilidade da Limeciclina não se encontra relacionada com absorção de água atmosférica.

Para os estudos realizados, a estabilidade da Limeciclina mostrou ser afetada apenas pela percentagem de humidade na sua constituição: quanto menor a humidade, maior a sua estabilidade.

Desta forma, sugere-se que estudos futuros incidam na alteração do método ou do modo de secagem deste produto no processo industrial. Propõe-se ainda a identificação de impurezas desconhecidas na Limeciclina que provaram ser significativas na sua estabilidade.

Referências Bibliográficas

- [1] Cipan, "Cipan. Suanfarma - About us," *Our Company*, 2020. <https://cipan.suanfarma.com/> (consultado a: 26 Set. 2020).
- [2] Cipan, "Cipan - PRODUCTS & SERVICES," *PRODUCTS*, 2020. <https://cipan.suanfarma.com/products-services/> (consultado a: 28 Nov. 2020).
- [3] J. L. Whitby and H. J. Black, "Comparison of Lymecycline with Tetracycline Hydrochloride," *BMJ*, vol. 2, no. 5423, pp. 1491–1495, Dec. 1964.
- [4] British Pharmacopoeia Commission Secretariat, "Lymecycline Capsules – BP 2016," *MHRA*, 2016. https://www.pharmacopoeia.com/monographs/gallery/Lymecycline_Capsules_BP2016.pdf (consultado a: 16 Nov. 2020).
- [5] J. Calvo and L. Martínez-Martínez, "Mecanismos de acción de los antimicrobianos," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 27, no. 1, pp. 44–52, 2009.
- [6] S. Faure, "Les tétracyclines," *Actual. Pharm.*, vol. 479, no. 1, pp. 41–44.
- [7] F. Nguyen, A. L. Starosta, S. Arenz, D. Sohmen, A. Dönhöfer, and D. N. Wilson, "Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms," *Biol. Chem.*, vol. 395, no. 5, pp. 559–575, 2014.
- [8] I. Chopra and M. Roberts, "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 233–260, 2001.
- [9] S. F. Askari Rizvi, "Tetracycline: Classification, Structure Activity Relationship and Mechanism of Action as a Theranostic Agent for Infectious Lesions-A Mini Review," *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 5787–5796, 2018.
- [10] D. Fuoco, "Classification framework and chemical biology of Tetracycline-structure-based drugs," *Antibiotics*, vol. 1, pp. 2–13, 2012.
- [11] I. Janser, "Tetracycline Amide Antibiotics," in *Bioactive Carboxylic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*, 1st ed., J. Dinges, Ed. Wiley-VCH, 2016, pp. 117–132.
- [12] L. Lambs, G. Berthon, B. Decock-Le Révérend, and H. Kozłowski, "Metal Ion-Tetracycline Interactions in Biological Fluids. 9. Circular Dichroism Spectra of Calcium and Magnesium Complexes with Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline, and Chlortetracycline and Discussion of Their Binding Modes," *Inorg. Chem.*, vol. 27, no. 17, pp. 3001–3012, 1988.
- [13] Cipan, "EUROPEAN DRUG MASTER FILE IN CTD (3.2.S) FORMAT FOR OXITETRACYCLINE CALCIUM BULK," 2008, p. 105.
- [14] H. Chen, J. Peng, L. Yu, H. Chen, M. Sun, and Z. Sun, "Calcium Ions Turn on the Fluorescence of Oxytetracycline for Sensitive and Selective Detection," *J. Fluoresc.*, vol. 30, no. 3, pp. 463–470, 2020.
- [15] L. J. Hughes, J. J. Stezowski, and R. E. Hughes, "Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives. 7. Evidence for the Coexistence of the Zwitterionic and Nonionized forms of the Free Base in Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 101, no. 26, pp. 7655–7657, 1979.
- [16] J. J. Stezowski, "Chemical-Structural Properties of Tetracycline Derivatives. 1. Molecular Structure and Conformation of the Free Base Derivatives," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 98, no. 19, pp. 6012–6018, 1976.
- [17] T. D. Sokoloski, L. A. Mitscher, P. H. Yuen, J. V. Juvarkar, and B. Hoener, "Rate and proposed mechanism of anhydrotetracycline epimerization in acid solution," *J. Pharm. Sci.*, vol. 66, no. 8, pp. 1159–1165, 1977.
- [18] A. F. Casy and A. Yasin, "Application of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy to the analysis and structural investigation of tetracycline antibiotics and their common impurities," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 2, no. 1, pp. 19–36, 1984.
- [19] E. C. Newman and C. W. Frank, "Circular dichroism spectra of tetracycline complexes with Mg^{+2} and Ca^{+2} ," *J. Pharm. Sci.*, vol. 65, no. 12, pp. 1728–1732, 1976.

-
- [20] K. H. . Ibsen and M. R. Urist, "Complexes of Calcium and Magnesium with Oxytetracycline.," *Exp. Biol. Med.*, vol. 109, no. 4, pp. 797–801, Apr. 1962.
- [21] J. W. Lightbown, A. H. Thomas, and I. L. Berryman, "The second international reference preparation of lymecycline.," *Bull. World Health Organ.*, vol. 48, no. 1, pp. 81–84, 1973.
- [22] A. Pines, K. Plucinski, J. S. B. Greenfield, and R. C. Mitchell, "Controlled Comparison of Lymecycline with Tetracycline Hydrochloride in Exacerbations of Chronic Bronchitis," *Br. Med. J.*, vol. 2, no. 5423, pp. 1495–1498, 1964.
- [23] W. J. Cunliffe, E. Grosshans, S. Belaïch, J. Meynadier, M. Alirezai, and L. Thomas, "A comparison of the efficacy and safety of lymecycline and minocycline in patients with moderately severe Solvente B e vulgaris," *Eur. J. Dermatology*, vol. 8, no. 3, pp. 161–166, 1998.
- [24] G. Sjölin-Forsberg and J. Hermansson, "Comparative bioavailability of tetracycline and lymecycline.," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 18, no. 4, pp. 529–533, 1984.
- [25] D. Thiboutot, "New treatments and therapeutic strategies for Solvente B e," *Arch. Fam. Med.*, vol. 9, no. 2, pp. 179–187, 2000.
- [26] C. Bernardelli, G. Bucher, F. Lauria, W. Logemann, G. Tosolini, and G. Vita, "Über die Einhorn-Reaktion mit Aminosäuren, III," *Justus Liebigs Ann. Chem.*, vol. 706, no. 1, pp. 243–249, 1967.
- [27] Cipan, "EUROPEAN DRUG MASTER FILE FOR LYMECYCLINE NON STERILE BULK," 2003, p. 103.
- [28] J. Hermansson, "Rapid determination of tetracycline and lymecycline in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 232, no. 2, pp. 385–393, 1982.
- [29] R. F. Miller, T. D. Sokoloski, L. A. Mitscher, A. C. Bonacci, and B. -A Hoener, "Use of circular dichroism in analysis of mixtures of tetracycline and 4-epitetracycline and its application to assay of commercial products," *J. Pharm. Sci.*, vol. 62, no. 7, pp. 1143–1147, 1973.
- [30] K. A. Loftin, C. D. Adams, M. T. Meyer, and R. Surampalli, "Effects of Ionic Strength, Temperature, and pH on Degradation of Selected Antibiotics," *J. Environ. Qual.*, vol. 37, no. 2, pp. 378–386, 2008.
- [31] J. R. D. McCormick *et al.*, "Studies of the Reversible Epimerization Occurring in the Tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof of Structure of Some 4-epi-Tetracyclines," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 79, no. 11, pp. 2849–2858, 1957.
- [32] E. G. Remmers, G. M. Sieger, and A. P. Doerschuk, "Some observations on the kinetics of the C-4 epimerization of tetracycline," *J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 8, pp. 752–756, 1963.
- [33] D. A. HUSSAR, P. J. NIEBERGALL, E. T. SUGITA, and J. T. DOLUISIO, "Aspects of the epimerization of certain tetracycline derivatives," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 20, no. 7, pp. 539–546, 1968.
- [34] Q. Yi, Y. Gao, H. Zhang, H. Zhang, Y. Zhang, and M. Yang, "Establishment of a pretreatment method for tetracycline production wastewater using enhanced hydrolysis," *Chem. Eng. J.*, vol. 300, no. 1, pp. 139–145, 2016.
- [35] R. R. E. Steendam, L. Keshavarz, M. A. R. Blijlevens, B. de Souza, D. M. Croker, and P. J. Frawley, "Effects of Scale-Up on the Mechanism and Kinetics of Crystal Nucleation," *Cryst. Growth Des.*, vol. 18, no. 9, pp. 5547–5555, 2018.
- [36] J. Liu and Å. C. Rasmuson, "Influence of agitation and fluid shear on primary nucleation in solution," *Cryst. Growth Des.*, vol. 13, no. 10, 2013.
- [37] J. W. Mullin, *Crystallization*, 4th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
- [38] H.-H. Tung, E. L. Paul, M. Midler, and J. A. McCauley, *Crystallization of Organic Compounds*, 1st ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [39] R. Buchfink, "Effects of impurities on an industrial crystallization process of ammonium sulfate: Thesis for Doctor Degree," Universität Halle-Wittenberg, 2011.
- [40] A. Ranodolph, *Theory of Particulate Processes*, 2nd ed. Academic Press, 1988.
- [41] J. Ulrich, *The Crystallization Technology Handbook*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001.
-

-
- [42] J. W. Mullin and K. D. Raven, "Nucleation in agitated solutions," *Nature*, vol. 190, no. 4772, 1961.
- [43] J. Nývlt, J. Skřivánek, J. Gottfried, and J. Křičková, "Über Kristallisation XIX. Einfluss der Durchmischung auf die Breite der metastabilen Zone," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 31, no. 5, 1966.
- [44] L. Shmidt and J. Shmidt, "Mechanism of crystallization in agitated solutions," *Chem. Eng. Commun.*, vol. 36, no. 1–6, 1985.
- [45] A. Mersmann, "Crystallization and precipitation," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 38, no. 4–6, 1999.
- [46] A. Myerson, *Handbook of Industrial Crystallization*, 2nd ed. Butterworth-Heinemann, 2001.
- [47] S. Moran and M. Zlokarnik, "Scale-Up in Chemical Engineering," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1st ed., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017, pp. 1–33.
- [48] M. R. N. Bentolila, "Scale Up Methodology for the Fine Chemical Industry - The Influence of the Mixing in the Process," *Visimix - Softw. Chem. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–17, 2015, [Online]. Disponível em: https://visimix.com/wp-content/uploads/2015/11/Moshe_article.pdf.
- [49] S. M. Sofia, "PRINCÍPIOS PARA UM SCALE UP DE SUCESSO," *Propeq*, 2020. <https://propeq.com/post/principios-para-um-scale-up/> (consultado a: 27 Set. 2020).
- [50] R. Zauner and A. G. Jones, "Scale-up of continuous and semibatch precipitation processes," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 39, no. 7, pp. 2392–2403, 2000.
- [51] David S. Dickey, "Don't Get Mixed Up By Scale-Up," *Mix. Inc.*, vol. 2, no. 1, pp. 2–6, 2005, [Online]. Disponível em: <https://www.chemicalprocessing.com/articles/2005/dont-get-mixed-up-by-scale-up/>.
- [52] D. Mesa and P. R. Brito-Parada, "Scale-up in froth flotation: A state-of-the-art review," *Separation and Purification Technology*, vol. 210, pp. 950–962, 2019.
- [53] H. C. H. Brodkey, Robert S., *Transport Phenomena: A Unified Approach*, 2nd ed. McGraw-Hill College, 1988.
- [54] Megawati, B. Triwibowo, Karwono, W. Sammadikun, and R. Musfiroh, "Scale-Up of Solid-Liquid Mixing Based on Constant Power/Volume and Equal Blend Time Using VisiMix Simulation," *MATEC Web Conf.*, vol. 187, no. 04002, pp. 1–5, 2018.
- [55] R. Y. Qian, Z. D. Chen, H. G. Ni, Z. Z. Fan, and F. D. Cai, "Crystallization kinetics of potassium chloride from brine and scale-up criterion," *AIChE J.*, vol. 33, no. 10, pp. 1690–1697, 1987.
- [56] J. Y. Oldshue, *Fluid mixing technology.*, 1st ed. New York: Chemical Engineering McGraw-Hill, 1983.
- [57] D. M. Levins and J. R. Glastonbury, "Application of Kolmogoroff's theory to particle—liquid mass transfer in agitated vessels," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 27, no. 3, pp. 537–543, 1972.
- [58] R. Ploss, T. Tengler, and A. Mersmann, "Scale-up of MSMR-crystallizers," *Ger. Chem. Eng.*, vol. 9, no. 1, pp. 42–48, 1986.
- [59] R. W. Rice and R. E. Baud, "The role of micromixing in the scale-up of geometrically similar batch reactors," *AIChE J.*, vol. 36, no. 2, pp. 293–298, Feb. 1990.
- [60] F. S. K. Tipnis, W. R. Penney, J. B., "An Experimental Investigation to Determine a Scale-up Method for Fast Competitive Parallel Reactions in Agitated Vessels," *AIChE Symp. Ser. (American Inst. Chem. Eng.)*, vol. 90, no. 299, pp. 78–91, 1994.
- [61] R. Zauner, "SCALE-UP OF PRECIPITATION PROCESSES: Thesis for the Degree of Doctor," University of London, 1994.
- [62] F. Piccinno, R. Hischer, S. Seeger, and C. Som, "From laboratory to industrial scale: a scale-up framework for chemical processes in life cycle assessment studies," *J. Clean. Prod.*, vol. 135, pp. 1085–1097, Nov. 2016.
- [63] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 9th ed. New York: John Wiley & Sons, 2017.
-

-
- [64] J. Requeijo and Z. Pereira, *Qualidade: Planeamento e Controlo Estatístico de Processos*, 2ª edição. Lisboa: FFCT - Fundação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [65] B. Dejaegher and Y. Vander Heyden, "Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 56, no. 2, pp. 141–158, 2011.
- [66] A. Freddi and M. Salmon, "Design of Experiment," in *Design Principles and Methodologies: From Conceptualization to First Prototyping with Examples and Case Studies*, 1st ed., Springer, 2019, pp. 127–158.
- [67] L. Zhang, B. Yan, X. Gong, L. X. Yu, and H. Qu, "Application of quality by design to the process development of botanical drug products: A case study," *AAPS PharmSciTech*, vol. 14, no. 1, 2013.
- [68] M. I. Daskalakis *et al.*, "Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 99, 2015.
- [69] N. Kateja, H. Agarwal, A. Saraswat, M. Bhat, and A. S. Rathore, "Continuous precipitation of process related impurities from clarified cell culture supernatant using a novel coiled flow inversion reactor (CFIR)," *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 10, 2016.
- [70] D. Harvey, "Optimizing Chromatographic Separations," in *Modern analytical chemistry*, 1st ed., McGraw-Hill, 1999, pp. 556–562.
- [71] D. A. Skoog and D. M. West, *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th ed. CENGAGE LEARNING, INC, 2013.
- [72] J. Sherma, D. John, and F. H. Larkin, "UPLC: Ultra-performance liquid chromatography," *J. AOAC Int.*, vol. 88, no. 3, 2005.
- [73] M. E. Swartz, "Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction," *LC-GC North America*, vol. 23, no. 5 SUPPL. 2005.
- [74] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. New Jersey: WILEY, 2009.
- [75] H. Gika, G. Kaklamanos, P. Manesiotis, and G. Theodoridis, "Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography," in *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, 2016, pp. 93–99.
- [76] M. Díaz-Bao, R. Barreiro, J. Miranda, A. Cepeda, and P. Regal, "Recent Advances and Uses of Monolithic Columns for the Analysis of Residues and Contaminants in Food," *Chromatography*, vol. 2, no. 1, 2015.
- [77] M. T. Gilbert, "Equipment," in *High Performance Liquid Chromatography*, 1st ed., Butterworth-Heinemann, Ed. Elsevier, 1987, pp. 12–52.
- [78] D. C. Harris, *Análise química quantitativa*. 2008.
- [79] Phenomenex, "FINISH FIRST WITH MONOLITHIC SILICA HPLC COLUMNS." [Online]. Disponível em: <https://www.brexbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/zhonyx.pdf>.
- [80] E. Haghedooren, L. Peeters, S. Dragovic, J. Hoogmartens, and E. Adams, "Silica-based monolithic columns versus conventional particle-packed columns for liquid chromatographic analysis of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline," *Talanta*, vol. 78, no. 3, 2009.
- [81] P. D. M. J.C. Areselnault, "Beginners Guide To Liquid Chromatography," *Waters*, no. June, 2009.
- [82] J. L. Glajch and J. J. Kirkland, "Method development in high-performance liquid chromatography using retention mapping and experimental design techniques," *Journal of Chromatography A*, vol. 485, no. C. 1989.
- [83] A. M. Sabir, M. Moloy, and P. S. Bhasin, "HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION: A REVIEW," *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 4, no. 4, 2016.
- [84] CHROMacademy, "Reversed Phase Chromatography." [Online]. Disponível em: <https://www.chromacademy.com/channels/hplc/technique/reversed-phase-chromatography/>.
- [85] J. Dolan, "A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection," *Www.Ace-Hplc.Com*, 2012.
-

-
- [86] CHROMacademy, "Mass Spectrometry. Fundamental LC-MS: Introduction." [Online]. Disponível em: <https://www.chromacademy.com/channels/lc-ms/principles/lc-ms-introduction/>.
- [87] H. Pham-Tuan, L. Kaskavelis, C. A. Daykin, and H. G. Janssen, "Method development in high-performance liquid chromatography for high-throughput profiling and metabonomic studies of biofluid samples," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 789, no. 2, 2003.
- [88] CHROMacademy, "The Theory of HPLC - Gradient HPLC." [Online]. Disponível em: <https://www.chromacademy.com/channels/hplc/technique/gradient-hplc/>.
- [89] RELACRE, "Guia Relacre nº13 - Validação de Métodos de ensaio em Análise Química," *Edição 1*, p. 50, Feb. 2000.
- [90] Cipan, *Produção de oxalato à escala laboratorial - [C330RG05080]*. Portugal, 2017, p. 5.
- [91] Cipan, "C230IT02125_Determinação do Doseamento e Impurezas Orgânicas em amostras de Tetraciclina e Reagente C, segundo a USP," 2020, pp. 2–12.
- [92] International organization for Standardization, "ISO 8466-1:1990 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function," 1990, p. 8, [Online]. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/15664.html>.
- [93] Cipan, "C330RG05081_3_Preparação de Limeciclina á Escala Laboratorial," 2018, pp. 1–5.

Anexos

Anexo A: Técnica de preparação de oxitetraciclina cálcica à escala laboratorial (procedimento interno Cipan)

O **Anexo A** compreende o procedimento de produção de oxitetraciclina cálcica à escala laboratorial. Trata-se de informação confidencial, pelo que foi removida.

Anexo B: Técnica de preparação de Limeciclina à escala laboratorial (procedimento interno Cipan)

O **Anexo B** apresenta o procedimento de produção de Limeciclina à escala laboratorial. Trata-se de informação confidencial, pelo que foi removida.

Anexo C: Resultados dos parâmetros da especificação referentes à otimização de oxitetraciclina cálcica

O **Anexo C** contém todos os resultados obtidos relativos aos parâmetros de especificação da oxitetraciclina cálcica, em cada ensaio de otimização do seu processo de produção.

⊗ Alteração dos parâmetros físicos:

- Tempo de adição da solução de Reagente B

A **Tabela C.1** apresenta os resultados obtidos em cada parâmetro de especificação da oxitetraciclina cálcica, para os ensaios com alteração do tempo de adição de Reagente B.

Tabela C.1 - Resultados obtidos nos parâmetros da especificação, para os ensaios com alteração do tempo de adição de Reagente B. Legenda: a vermelho, os valores que constam fora dos limites da especificação.

Alteração	pH	Rotação Específica (%an)	IAL (430nm)	IAL (490nm)	Doseamento (%an)	Humidade (%)	Metanol residual (ppm)	Cálcio (% an)
Padrão (7h)	7,5	-195	0,05	0,11	96,5	12,1	-	3,89
								4,01
								3,66
Adição repentina (47 seg.)	6,9	-182	0,12	0,10	92,0	10,3	-	4,47
								5,04
								4,48
Adição de 3h	6,8	-186	0,12	0,10	93,7	10,2	-	4,87
								4,95
								4,63
Adição em 3h - Repetição	6,5	-195	0,36	0,12	-	3,9	249	4,65
								3,13
								3,72
Adição de 5h	7,2	-180	0,12	0,04	96,0	6,5	-	3,70
								3,58
								3,62
Adição em 5h - Repetição	7,5	-191	0,13	0,08	-	8,3	10446	4,45
								4,42

⊗ Remoção de uma das etapas do processo:

- Processo sem a etapa A

Na **Tabela C.2** encontram-se os resultados obtidos nos parâmetros de especificação da oxitetraciclina cálcica, para os ensaios sem a etapa de filtração através de A.

Tabela C.2 - Resultados obtidos nos parâmetros da especificação, para os ensaios sem a realização da etapa A. Legenda: a vermelho, os valores que constam fora dos limites da especificação.

Alteração	pH	Rotação Específica (%an)	IAL (430nm)	IAL (490nm)	Doseamento (%an)	Humidade (%)	Metanol residual (ppm)	Cálcio (% an)
5h sem A	6,7	-198	0,15	0,18	96,0	11,4	0	4,23
								4,18
								4,18
5h sem A - Repetição	7,7	-194	0,16	0,20	94,7	5,7	7974	4,42
								4,44

✿ **Quantidade de matéria-prima:**

- Reagente A: Reagente B na proporção 2:1

A **Tabela C.3** apresenta os resultados obtidos nos parâmetros de especificação da oxitetraciclina cálcica, para os ensaios com Reagente A: Reagente B na proporção estequiométrica 2:1.

Tabela C.3 - Resultados obtidos nos parâmetros da especificação, para os ensaios com Reagente A: Reagente B na proporção estequiométrica 2:1. Legenda: a vermelho, os valores que constam fora dos limites da especificação.

Alteração	pH	Rotação Específica (%an)	IAL (430nm)	IAL (490nm)	Humidade (%)	Metanol residual (ppm)	Cálcio (% an)
Reagente A: Reagente B 2:1 (5h)	6,5	-195	0,17	0,06	5,6	331	3,77
							3,72
Reagente A: Reagente B 2:1 (3h)	7,4	-194	0,14	0,05	4,0	2243	3,91
Reagente A: Reagente B 2:1 (3h) Repetição	7,0	-198	0,15	0,05	6,1	8861	3,75
							3,73

- Reagente A: Reagente B na proporção 2:1,2

A **Tabela C.4** apresenta os resultados obtidos em cada parâmetro de especificação da oxitetraciclina cálcica, para os ensaios com Reagente A: Reagente B na proporção estequiométrica 2:1,2.

Tabela C.4 - Resultados obtidos nos parâmetros da especificação, para os ensaios com Reagente A: Reagente B na proporção de 2:1,2. Legenda: a vermelho, os valores que constam fora dos limites da especificação.

Alteração	pH	Rotação Específica (°an)	IAL (430nm)	IAL (490nm)	Humidade (%)	Metanol residual (ppm)	Cálcio (% an)
Reagente A: Reagente B 2:1,2 (3h)	7,3	-200	0,14	0,04	7,1	6715	4,06
							4,11
Reagente A: Reagente B 2:1,2 (3h) Repetição 1	7,4	-194	0,12	0,04	7,4	2812	3,88
							3,89
Reagente A: Reagente B 2:1,2 (3h) Repetição 2	7,4	-199	0,13	0,04	7,5	13673	3,84
Reagente A: Reagente B 2:1,2 (3h) Repetição 3	7,4	-199	0,12	0,04	6,5	17526	3,88

Anexo D: Planeamento do Desenho de experiências

O **Anexo D** contém as matrizes planeamento das experiências realizadas com o objetivo de otimizar o processo de produção de Limeciclina.

A **Tabela D.1** representa a matriz planeamento na ordem *standard* das experiências realizadas para otimização do processo produtivo de Limeciclina.

Tabela D.1 - Matriz planeamento na ordem *standard*.

Ordem Padrão	A	B	C
(1)	-	-	-
a	+	-	-
b	-	+	-
ab	+	+	-
c	-	-	+
ac	+	-	+
bc	-	+	+
abc	+	+	+

A matriz planeamento na ordem aleatória permite definir a ordem pela qual as 8 experiências x 3 réplicas, foram realizadas. Esta matriz é representada pela **Tabela D.2**.

Tabela D.2 - Matriz planeamento na ordem aleatória.

Nº da experiência	A	B	C
5	-	-	+
3	-	+	-
6	+	-	+
4	+	+	-
8	+	+	+
2	+	-	-
7	-	+	+
1	-	-	-

Anexo E: Fórmulas e elaboração de tabelas para estudo do DOE

O **Anexo E** apresenta todos os passos realizados para análise do DOE realizado. Inclui fórmulas de todos os parâmetros calculados, assim como o esclarecimento do preenchimento das tabelas.

Na **Tabela E.1** é possível encontrar um exemplo de um DOE. Considerando “a” tratamentos de um fator que requerem uma comparação, e em cada um deles, “n” observações correspondentes a cada réplica, então existirão $N = n \times a$ experiências. O valor y_{ij} corresponde ao valor da variável Y que pertence ao tratamento i para a observação j.

Tabela E.1 – Comparação de vários tratamentos de um DOE.

Nº do tratamento (i = 1, 2, ..., a)	Observações (j = 1, 2, ..., n)	Soma	Média
1	$y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}$	Y_1	$\bar{Y}_1$
2	$y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}$	Y_2	$\bar{Y}_2$
...	...	...	...
a	$y_{a1}, y_{a2}, \dots, y_{an}$	Y_a	$\bar{Y}_a$

O objetivo é estimar os valores esperados de cada tratamento e compará-los de forma a apurar se os seus efeitos, τ_i , são ou não significativamente diferentes de zero. Para testar se existem diferenças entre os diversos tratamentos, a hipótese nula e alternativa serão representadas, respetivamente, por:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0$$

Para prosseguir com a análise do desenho de experiências, é necessário o cálculo dos efeitos e das somas dos quadrados (SS) para cada tratamento. A determinação destes parâmetros pode ser mais facilmente obtida através da utilização do Algoritmo de Yates (**Tabela E.2**).

Tabela E.2 - Exemplo do Algoritmo de Yates, para fatoriais com dois níveis e 3 fatores ($2^{k=3}$).

Ordem Padrão	Resposta	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Efeito	SS
(1)	10	10+20 = 30	30+70	T ⁽¹⁾	$\bar{T}$ ⁽²⁾	FC
a	20	30+40 = 70	110+150	...		SS _a
b	30	50+60 = 110	10+10	...		SS _b
ab	40	70+80 = 150	10+10	...		SS _{ab}
c	50	20-10 = 10	70-30	...		SS _c
ac	60	40-30 = 10	150-110	...		SS _{ac}
bc	70	60-50 = 10	10-10	...		SS _{bc}
abc	80	80-70 = 10	10-10	...		SS _{abc}

(1) – Corresponde ao somatório das N observações

(2) – Corresponde à média global das N observações

Para aplicar o Algoritmo de Yates, começa-se por escrever a ordem *standard* correspondente ao caso em estudo e as respostas obtidas para as combinações correspondentes. No caso de terem sido realizadas réplicas, ou seja, existir mais do que uma observação para cada tratamento, então a resposta será o somatório, ou a média, das observações em cada tratamento.

Considerando um fatorial 2^k , serão geradas k colunas. Cada coluna é gerada da anterior da seguinte forma: os primeiros 2^{k-1} números da coluna 1 são somas de pares sucessivos da coluna das respostas; os 2^{k-1} números seguintes, são diferenças entre pares sucessivos da coluna respostas (o número de topo é subtraído do número inferior). O mesmo se aplica às colunas subsequentes até à coluna k .

Relativamente à coluna dos efeitos: o primeiro valor é calculado de acordo com a **Equação E.1**; os restantes valores, são determinados pela **Equação E.2**.

$$\bar{T} = \frac{\text{Valores da Coluna 3}}{n \times 2^k}$$

Equação E.1

$$\text{Efeito} = \frac{\text{Valores da Coluna 3}}{n \times 2^{k-1}}$$

Equação E.2

As Somas dos Quadrados (SS), obtêm-se de acordo com a **Equação E.3**. De salientar que o primeiro valor desta coluna corresponde ao Fator de Correção (FC), utilizado na Análise de Variância.

$$SS = \frac{(\text{Valores da Coluna 3})^2}{n \times 2^k}$$

Equação E.3

Alternativamente, a resposta pode ser a média das observações, em vez do somatório, e nesse caso não é necessário multiplicar os divisores pelo número de réplicas, n .

Após o total preenchimento da tabela do Algoritmo de Yates, procede-se à Análise de Variância (ANOVA). O preenchimento da tabela ANOVA (**Tabela E.3**) inicia-se na coluna de Fonte de Variação, na qual constam os fatores em estudo, respetivas interações, erro e total.

Seguidamente, encontra-se a coluna da Soma dos Quadrados (SS), cuja qual é preenchida com os mesmos valores de SS obtidos no Algoritmo de Yates. Os dois últimos valores desta coluna, SS_{Total} e SS_{Erro} , são respetivamente calculados pelas **Equações E.4 e E.5**.

Tabela E.3 - Exemplo de uma tabela ANOVA e respetivo método de cálculo de cada coluna.

Fonte de Variação	SSx	ν_x	MSx	F_0
A	SS _a	ν_a	SS _a / ν_a	MS _a / MS _{Erro}
B	SS _b	ν_b	SS _b / ν_b	MS _b / MS _{Erro}
AB	SS _{ab}	ν_{ab}	SS _{ab} / ν_{ab}	MS _{ab} / MS _{Erro}
C	SS _c	ν_c	SS _c / ν_c	MS _c / MS _{Erro}
AC	SS _{ac}	ν_{ac}	SS _{ac} / ν_{ac}	MS _{ac} / MS _{Erro}
BC	SS _{bc}	ν_{bc}	SS _{bc} / ν_{bc}	MS _{bc} / MS _{Erro}
ABC	SS _{abc}	ν_{abc}	SS _{abc} / ν_{abc}	MS _{abc} / MS _{Erro}
Erro	SS _{Erro}	ν_{Erro}	SS _{Erro} / ν_{Erro}	-
Total	SS _{Total}	ν_{Total}	-	-

$$SS_{\text{Total}} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (y_{ij})^2 - FC$$

Equação E.4

Onde $\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (y_{ij})^2$ corresponde ao somatório de todas as observações ao quadrado.

$$SS_{\text{Erro}} = SS_{\text{Total}} - \sum SS_x$$

Equação E.5

A terceira coluna da tabela ANOVA representa os graus de liberdade. Estes valores são obtidos subtraindo um ao número de níveis que o fator possui. Ou seja, um fator com dois níveis (alto, +, e baixo, -), apresenta 1 grau de liberdade, ν . O valor de ν_{Total} e ν_{Erro} são calculados através das **Equações E.6** e **E.7**, respetivamente:

$$\nu_{\text{Total}} = n \times a - 1 = N - 1$$

Equação E.6

$$\nu_{\text{Erro}} = \nu_{\text{Total}} - \sum \nu_x$$

Equação E.7

Os valores das restantes colunas, são determinados tal como se encontra representado na **Tabela E.3**.

Uma boa estatística para testar a Hipótese nula é dada pelos valores de F_0 , que seguem uma distribuição de Fisher com (a-1) e (N-a) graus de liberdade. Após o cálculo dos valores de F_0 , comparam-se os valores obtidos com o valor da distribuição F correspondente a um determinado nível de significância α , dado por $F_{\alpha; (a-1); (N-a)}$. Caso $F_0 > F_{\alpha; (a-1); (N-a)}$, então a hipótese nula é

rejeitada e, portanto, existem diferenças significativas entre os diversos tratamentos. Ou seja, um fator e/ou interação no qual se verifique que $F_0 > F_{\alpha;(a-1); (N-a)}$, trata-se de um fator e/ou interação significativo.

Após determinados os fatores que rejeitam a hipótese nula, é construída uma nova tabela apenas com os fatores e interações significativos, sendo necessário recalculas as várias colunas, da mesma forma como foram calculadas na tabela ANOVA. Quando todos os fatores nela presentes, rejeitarem a hipótese nula, então obtém-se a tabela ANOVA condensada. A **Tabela E.4** representa um exemplo de uma ANOVA condensada, na qual os fatores e interações significativos são A, B e BC.

Tabela E.4 - Exemplo de ANOVA condensada e respetivo método de cálculo de cada coluna.

Fonte de Variação	SS _x	<i>v_x</i>	MS _x	F ₀	ρ_x
A	SS _a	<i>v_a</i>	SS _a / <i>v_a</i>	MS _a / MS _{Erro}	
B	SS _b	<i>v_b</i>	SS _b / <i>v_b</i>	MS _b / MS _{Erro}	
BC	SS _{bc}	<i>v_{bc}</i>	SS _{bc} / <i>v_{bc}</i>	MS _{bc} / MS _{Erro}	
Erro	SS _{Erro}	<i>v_{Erro}</i>	SS _{Erro} / <i>v_{Erro}</i>	-	$1 - \sum \rho_x$
Total	SS _{Total}	<i>v_{Total}</i>	-	-	1

Finalmente, é necessário determinar os valores correspondentes à contribuição líquida (ρ), de modo a avaliar se a Análise de Variância foi bem concebida. Estes, à exceção de ρ_{Erro} (calculado de acordo com o apresentado na **Tabela E.4**), são obtidos através da **Equação E.8**. Caso se verifique que $\rho_{\text{Erro}} < 0,5$, então conclui-se que a ANOVA foi bem construída.

$$\rho_x = \frac{SS_x - v_x \times MS_{\text{Erro}}}{SS_{\text{Total}}}$$

Equação E.8

Tal como referido na **Subcapítulo 2.6**, a análise de resíduos deve ser sempre efetuada para verificar a validade dos pressupostos feitos na Análise de Variância. Desta forma, é fundamental o cálculo dos resíduos, e_{ij} , que se obtém de acordo com a **Equação E.9**.

$$e_{ij} = y_{ij} - \widehat{y}_{ij}$$

Equação E.9

Onde y_{ij} representa o valor de cada observação e $\widehat{y}_{ij}$ representa o valor esperado, obtido pela **Equação E.10**. Uma vez que no exemplo utilizado até agora, existem 8 tipos de combinações dos diferentes níveis, ou seja, 8 tratamentos, então existirão 8 valores esperados, correspondentes a cada combinação. A influência da combinação dos diferentes níveis é fornecida por x_A , x_B e x_C , representado estes, o valor +1 ou -1. Visto que os fatores significativos

no exemplo aplicado são A, B e BC, então são os efeitos referentes a fatores que são incluídos na fórmula.

$$\widehat{y}_{ij} = \bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} x_A + \frac{\text{Efeito B}}{2} x_B + \frac{\text{Efeito BC}}{2} x_{BC}$$

Equação E.10

Para o exemplo dado, os 8 valores esperados seriam calculados de acordo com o apresentado na **Tabela E.5**.

Tabela E.5 - Fórmula de cálculo do valor esperado para o exemplo utilizado.

Valor esperado, $\widehat{y}_{ij}$	Ordem Padrão	A	B	C	BC
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (+1)$	(1)	-	-	-	+
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (+1)$	a	+	-	-	+
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (-1)$	b	-	+	-	-
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (-1)$	ab	+	+	-	-
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (-1)$	c	-	-	+	-
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (-1)$	ac	+	-	+	-
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (-1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (+1)$	bc	-	+	+	+
$\bar{T} + \frac{\text{Efeito A}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito B}}{2} \times (+1) + \frac{\text{Efeito BC}}{2} \times (+1)$	abc	+	+	+	+

Para a verificação do pressuposto da normalidade é necessário construir um gráfico dos resíduos em função da sua probabilidade da distribuição normal. Para tal, os valores dos resíduos têm de ser organizados no sentido crescente e calcular a sua probabilidade, como mostra o esquema da **Tabela E.6**.

Tabela E.6 - Esquema de organização dos valores dos resíduos e cálculo da respetiva probabilidade.

Resíduos e_{ij} (ordem das experiências)	Resíduos e_{ij} (ordem crescente)	i	$p = \frac{i - 0,5}{N}$
Valores aleatórios	1º valor mais baixo	1	$\frac{1 - 0,5}{N}$
	2º valor mais baixo	2	$\frac{2 - 0,5}{N}$
	...	...	...
	Valor mais elevado	N	$\frac{N - 0,5}{N}$

Ainda relativamente aos resíduos, é essencial avaliar a existência de *outliers*. Estes são calculados apenas para o menor e maior valor de resíduo, através da **Equação E.11**, representando, respetivamente, o valor mínimo e máximo esperado da normalidade. Este parâmetro tem o objetivo de averiguar a possível existência de valores muito discrepantes, pelo que idealmente, estes devem pertencer ao intervalo [-3,3].

$$Outlier = \frac{e_{ij}}{\sqrt{MS_{\text{Erro}}}}$$

Equação E.11

Tal como já mencionado, para além da construção do gráfico dos resíduos em função da sua probabilidade da distribuição normal, são também elaborados os gráficos dos resíduos em função da ordem pela qual as experiências foram feitas e dos resíduos em função dos valores previstos.

Concluindo, para a melhoria do processo, determina-se também quais os melhores níveis dos fatores que foram estudados. Para tal, analisam-se as respostas para os níveis alto e baixo dos fatores significativos e para as combinações dos níveis nas interações significativas, como se segue:

Fator A:

ΣA^+ = soma de todas as respostas das experiências onde A está no nível alto.

ΣA^- = soma de todas as respostas das experiências onde A está no nível baixo.

Fator B:

ΣB^+ = soma de todas as respostas das experiências onde B está no nível alto.

ΣB^- = soma de todas as respostas das experiências onde B está no nível baixo.

Interação BC:

ΣB^+C^+ = soma de todas as respostas das experiências onde B e C estão ambos no nível alto.

ΣB^-C^+ = soma de todas as respostas das experiências onde B está no nível baixo e C no nível alto.

ΣB^+C^- = soma de todas as respostas das experiências onde B está no nível alto e C no nível baixo.

ΣB^-C^- = soma de todas as respostas das experiências onde B e C estão ambos no nível baixo.

Anexo F: Resultados do DOE

O **Anexo F** inclui todos os resultados obtidos nas experiências realizadas no estudo de otimização do processo de produção de Limeciclina.

⊗ %PC de limeciclina

Na **Tabela F.1** encontram-se as respostas obtidas de %PC de limeciclina, em cada experiência do DOE e respetiva réplica.

Tabela F.1 - Valores de cada observação do DOE, relativos à %PC de limeciclina.

Ordem Padrão	Respostas				
	Y1	Y2	Y3	SOMA	MÉDIA
1	24,21	26,26	23,20	73,67	24,56
2	25,82	25,92	24,06	75,80	25,27
3	25,21	25,62	25,88	76,71	25,57
4	25,01	27,48	23,95	76,44	25,48
5	24,22	23,85	25,13	73,20	24,40
6	26,67	26,21	24,83	77,71	25,90
7	24,72	24,50	23,49	72,71	24,24
8	26,74	26,70	23,75	77,19	25,73

A **Tabela F.2** corresponde ao Algoritmo de Yates relativo às respostas obtidas de %PC de limeciclina.

Tabela F.2 - Algoritmo de Yates, relativo à %PC de limeciclina.

Ordem Padrão	Resposta	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Efeito	SSx
(1)	73,67	149,47	302,62	603,43	25,14	15171,99
a	75,80	153,15	300,81	10,85	0,90	4,91
b	76,71	150,91	1,86	2,67	0,22	0,30
ab	76,44	149,90	8,99	-2,43	-0,20	0,25
c	73,20	2,13	3,68	-1,81	-0,15	0,14
ac	77,71	-0,27	-1,01	7,13	0,59	2,12
bc	72,71	4,51	-2,40	-4,69	-0,39	0,92
abc	77,19	4,48	-0,03	2,37	0,20	0,23

Os valores esperados e resíduos determinados, relativos às respostas obtidas de %PC de limeciclina, podem ser visualizados na **Tabela F.3**.

Tabela F.3 - Valores esperados e resíduos - %PC de limeciclina.

Ordem Padrão	Valor esperado, $\hat{y}_{ij}$	Resíduos 1, e_{1j}	Resíduos 2, e_{2j}	Resíduos 3, e_{3j}
1	24,69	-0,48	1,57	-1,49
2	25,60	0,22	0,32	-1,54
3	24,69	0,52	0,93	1,19
4	25,60	-0,59	1,89	-1,65
5	24,69	-0,47	-0,84	0,44
6	25,60	1,08	0,61	-0,77
7	24,69	0,03	-0,19	-1,20
8	25,60	1,15	1,11	-1,85

Verificação dos pressupostos matemáticos:

As **Figuras F.1, F.2 e F.3** representam, respectivamente, o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e da homogeneidade da variância.

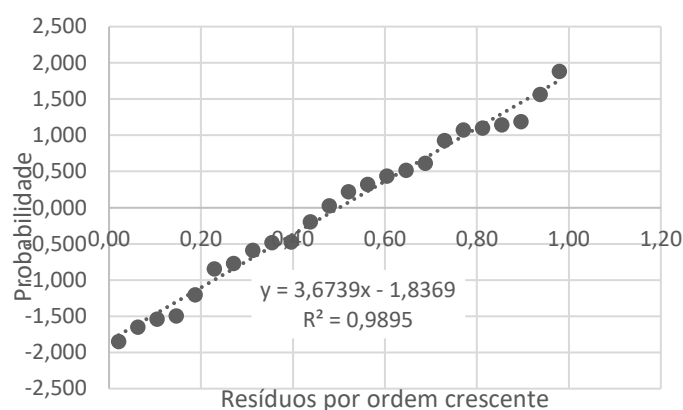


Figura F.1 - Probabilidades da distribuição normal - %PC de limeciclina.

Pela **Figura F.1** verifica-se que os valores aparentam formar uma regressão linear. Adicionalmente, foi avaliada a existência de *outliers*, analisando o menor e maior valor de resíduos: - 1,845 e 1,885, respectivamente. Os valores obtidos foram -1,66 e 1,69, uma vez que pertencem ao intervalo $[-3,3]$, não se verifica existência de *outliers*, pelo que o pressuposto da normalidade é cumprido.

Da mesma forma, foi analisado o pressuposto da independência de resíduos (**Figura F.2**) e da homogeneidade de variância (**Figura F.3**).

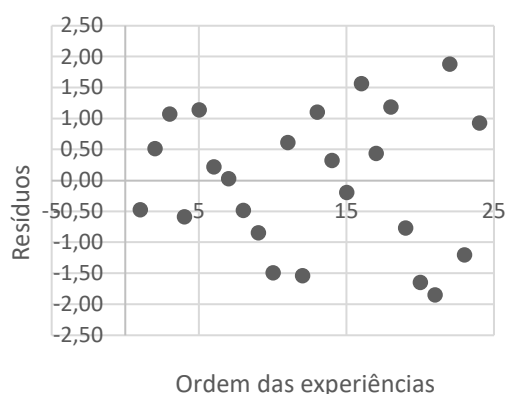


Figura F.2 – Representação gráfica dos resíduos em função da ordem de realização - %PC de limeciclina.

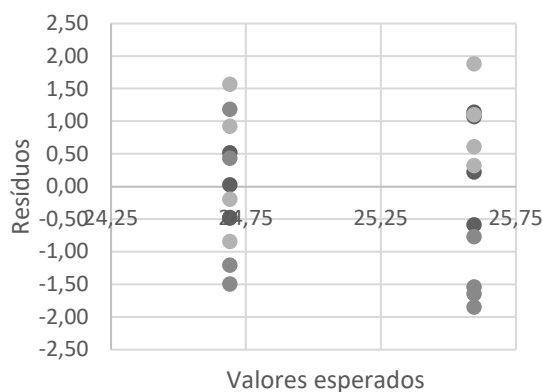


Figura F.3 – Representação gráfica dos resíduos em função dos valores previstos - %PC de limeciclina.

É possível afirmar que o pressuposto de independência de resíduos foi obedecido, uma vez que, na **Figura F.2** os pontos estão dispostos de forma aleatória, não apresentando qualquer tendência.

Analisando a **Figura F.3** conclui-se que também o pressuposto da homogeneidade de variância é cumprido, visto que os valores residuais se encontram dispersos de forma desigual entre os dois valores esperados.

⊗ Doseamento de impurezas totais

Na **Tabela F.4** encontram-se as respostas obtidas de doseamento de impurezas totais na Limeciclina, em cada experiência do DOE e respectiva réplica.

Tabela F.4 - Valores de cada observação do DOE, relativos ao doseamento de impurezas totais.

Ordem Padrão	Respostas				
	Y1	Y2	Y3	SOMA	MÉDIA
1	2,80	3,00	3,40	9,20	3,07
2	3,30	3,60	4,10	11,00	3,67
3	2,80	2,70	2,80	8,30	2,77
4	2,90	3,30	4,30	10,50	3,50
5	3,00	2,80	3,40	9,20	3,07
6	3,20	3,50	3,70	10,40	3,47
7	3,00	2,80	3,80	9,60	3,20
8	3,30	3,80	4,30	11,40	3,80

A **Tabela F.5** corresponde ao Algoritmo de Yates relativo às respostas obtidas de doseamento de impurezas totais na Limeciclina.

Tabela F.5 - Algoritmo de Yates - Doseamento de impurezas totais.

Ordem Padrão	Resposta	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Efeito	SSx
(1)	9,20	20,20	39,00	79,60	3,32	264,01
a	11,00	18,80	40,60	7,00	0,58	2,042
b	8,30	19,60	4,00	0,00	0,00	0,000
ab	10,50	21,00	3,00	1,00	0,08	0,042
c	9,20	1,80	-1,40	1,60	0,13	0,107
ac	10,40	2,20	1,40	-1,00	-0,08	0,042
bc	9,60	1,20	0,40	2,80	0,23	0,327
abc	11,40	1,80	0,60	0,20	0,02	0,002

Os valores esperados e resíduos determinados, relativos às respostas obtidas de doseamento de impurezas totais na Limeciclina, podem ser visualizados na **Tabela F.6**.

Tabela F.6 - Valores esperados e resíduos - Doseamento de impurezas totais.

Ordem Padrão	Valor esperado, $\hat{y}_{ij}$	Resíduos 1, e_{1j}	Resíduos 2, e_{2j}	Resíduos 3, e_{3j}
1	3,03	-0,225	-0,025	0,375
2	3,61	-0,308	-0,008	0,492
3	3,03	-0,225	-0,325	-0,225
4	3,61	-0,708	-0,308	0,692
5	3,03	-0,025	-0,225	0,375
6	3,61	-0,408	-0,108	0,092
7	3,03	-0,025	-0,225	0,775
8	3,61	-0,308	0,192	0,692

Verificação dos pressupostos matemáticos:

As **Figuras F.4, F.5 e F.6** representam, respectivamente, o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e da homogeneidade da variância.

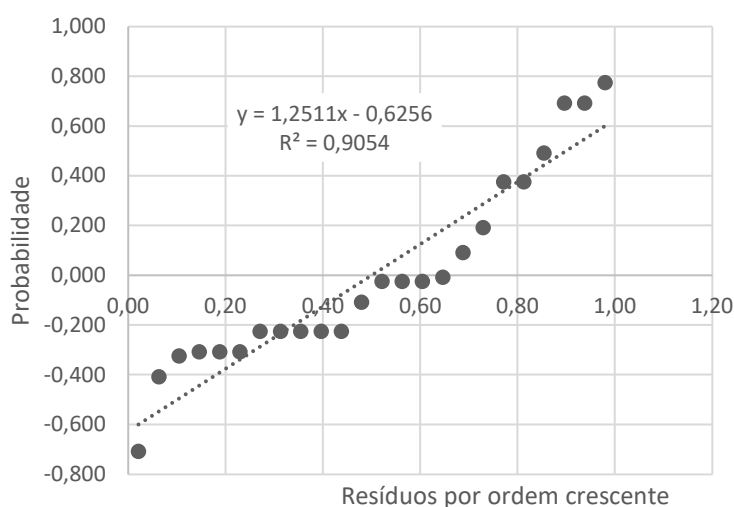


Figura F.4 - Probabilidade da distribuição normal - Doseamento de impurezas totais.

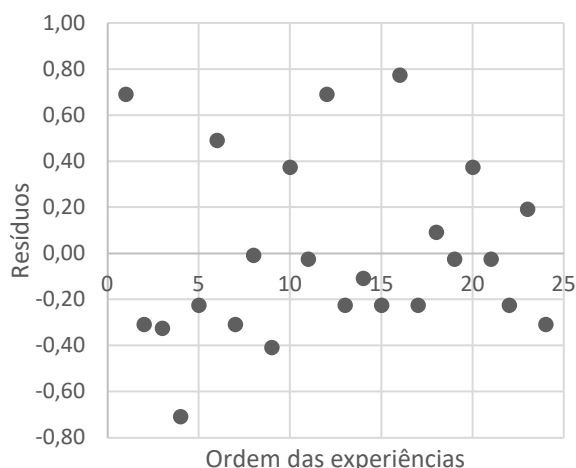


Figura F.5 - Representação gráfica dos resíduos em função da ordem de realização das experiências – Doseamento de impurezas totais.

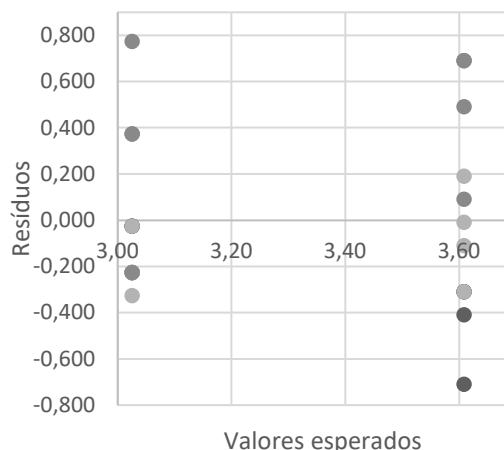


Figura F.6 Representação gráfica dos resíduos em função dos valores esperados - Doseamento de impurezas totais.

Verifica-se que todos os pressupostos são cumpridos, visto que: a **Figura F.4** segue aproximadamente uma regressão linear; a **Figura F.5** não segue nenhuma tendência especial, estando os pontos aleatoriamente distribuídos em torno do eixo das abcissas e a **Figura F.6** apresenta os valores dos resíduos dispersos de forma desigual entre os dois valores esperados.

A inexistência de *outliers*, foi também um parâmetro que validou o pressuposto da normalidade, uma vez que os respectivos valores para o menor e maior valor de resíduos, -1,79 e 1,96, se encontram dentro do intervalo [-3,3].

✿ Variação da %PC de limeciclina após estabilidade

Na **Tabela F.7** encontram-se os resultados da diferença entre os valores de %PC de limeciclina, antes e após estabilidade, em cada experiência do DOE e respetiva réplica.

Tabela F.7 - Valores de cada observação do DOE, relativos à variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

Ordem Padrão	Respostas				
	Y1	Y2	Y3	SOMA	MÉDIA
1	6,70	8,25	5,88	20,83	6,94
2	6,81	7,86	4,41	19,08	6,36
3	8,03	7,82	7,79	23,64	7,88
4	6,64	8,31	5,67	20,62	6,87
5	6,67	6,78	8,63	22,08	7,36
6	8,36	8,50	7,38	24,24	8,08
7	7,17	7,61	5,73	20,51	6,84
8	8,94	7,78	6,02	22,74	7,58

A **Tabela F.8** corresponde ao Algoritmo de Yates relativo às respostas obtidas de variação de %PC de limeciclina após estabilidade.

Tabela F.8 - Algoritmo de Yates - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

Ordem Padrão	Resposta	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Efeito	SSx
(1)	20,83	39,91	84,17	173,74	7,24	1257,73
a	19,08	44,26	89,57	-0,38	-0,03	0,01
b	23,64	46,32	-4,77	1,28	0,11	0,07
ab	20,62	43,25	4,39	-1,20	-0,10	0,06
c	22,08	-1,75	4,35	5,40	0,45	1,22
ac	24,24	-3,02	-3,07	9,16	0,76	3,50
bc	20,51	2,16	-1,27	-7,42	-0,62	2,29
abc	22,74	2,23	0,07	1,34	0,11	0,07

Os valores esperados e resíduos determinados, relativos às respostas obtidas de variação de %PC de limeciclina após estabilidade, podem ser visualizados na **Tabela F.9**.

Tabela F.9 - Valores esperados e resíduos - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

Ordem Padrão	Valor esperado, $\widehat{y}_{ij}$	Resíduos 1, e_{1j}	Resíduos 2, e_{2j}	Resíduos 3, e_{3j}
1	7,31	-0,61	0,94	-1,43
2	6,55	0,26	1,31	-2,14
3	7,93	0,10	-0,11	-0,14
4	7,17	-0,53	1,14	-1,50
5	7,17	-0,50	-0,39	1,46
6	7,93	0,43	0,57	-0,55
7	6,55	0,62	1,06	-0,82
8	7,31	1,63	0,47	-1,29

Verificação dos pressupostos matemáticos:

As **Figuras F.7, F.8 e F.9** representam, respectivamente, o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e da homogeneidade da variância.

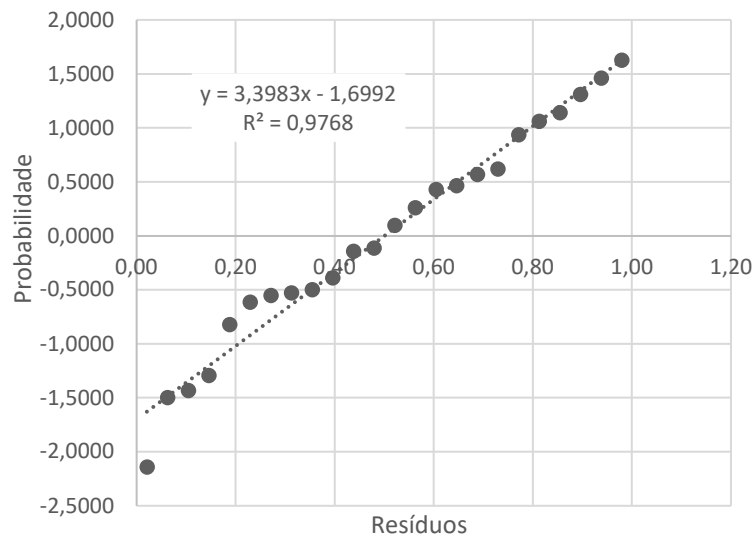


Figura F.7 - Probabilidades da distribuição normal - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

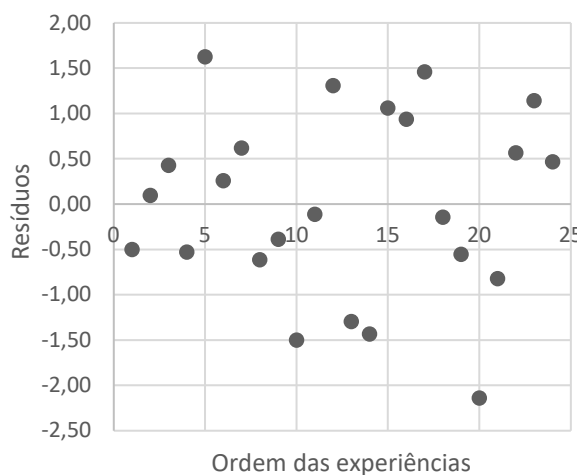


Figura F.8 - Representação gráfica dos resíduos em função da ordem das experiências - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

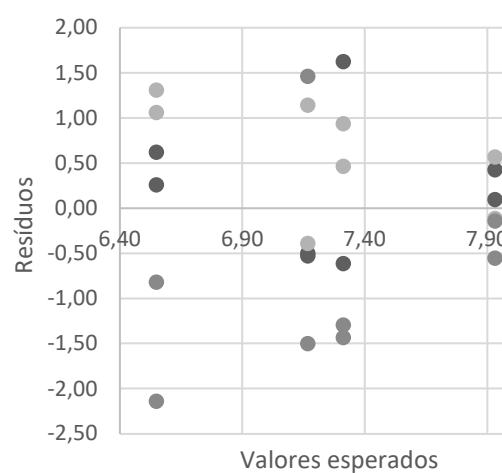


Figura F.9 - Representação gráfica dos resíduos em função dos valores esperados - Variação da %PC de limeciclina após estabilidade.

Através da observação das figuras, verifica-se que todos os pressupostos são cumpridos, visto que: a **Figura F.7** segue aproximadamente uma regressão linear; a **Figura F.8** não segue nenhuma tendência especial e a **Figura F.9** apresenta os valores dos resíduos dispersos de forma heterogênea entre os valores esperados.

A inexistência de *outliers*, foi também um parâmetro que validou o pressuposto da normalidade, uma vez que os respectivos valores para o menor e maior valor de resíduos, -2,02 e 1,54, se encontram dentro do intervalo [-3,3].

⊗ **Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.**

Na **Tabela F.10** encontram-se os resultados da diferença entre os valores de doseamento de impurezas totais na Limeciclina, antes e após estabilidade, em cada experiência do DOE e respectiva réplica.

Tabela F.10 - Valores de cada observação do DOE, relativos à variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Ordem Padrão	Respostas				
	Y1	Y2	Y3	SOMA	MÉDIA
1	4,26	4,10	3,39	11,74	3,91
2	3,69	3,71	2,86	10,26	3,42
3	4,58	4,20	3,92	12,70	4,23
4	3,95	3,98	3,11	11,03	3,68
5	4,09	4,32	4,19	12,60	4,20
6	3,77	3,89	3,54	11,20	3,73
7	4,34	4,01	3,23	11,58	3,86
8	4,06	3,32	3,17	10,54	3,51

A **Tabela F.11** corresponde ao Algoritmo de Yates relativo às respostas obtidas de variação de doseamento de impurezas totais na Limeciclina após estabilidade.

Tabela F.11 – Algoritmo de Yates – Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Ordem Padrão	Resposta	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Efeito	SSx
(1)	11,74	22,00	45,73	91,65	3,82	350,02
a	10,26	23,73	45,92	-5,58	-0,47	1,30
b	12,70	23,80	-3,14	0,05	0,00	0,00
ab	11,03	22,12	-2,44	0,17	0,01	0,00
c	12,60	-1,48	1,73	0,19	0,02	0,00
ac	11,20	-1,66	-1,68	0,70	0,06	0,02
bc	11,58	-1,40	-0,18	-3,41	-0,28	0,48
abc	10,54	-1,05	0,35	0,53	0,04	0,01

Os valores esperados e resíduos determinados, relativos às respostas obtidas de variação de doseamento de impurezas totais na Limeciclina após estabilidade, podem ser visualizados na **Tabela F.12**.

Tabela F.12 - Valores esperados e resíduos - Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Ordem Padrão	Valor esperado, $\widehat{y}_{1j}$	Resíduos 1, e_{1j}	Resíduos 2, e_{2j}	Resíduos 3, e_{3j}
1	4,05	0,20	0,05	-0,67
2	3,59	0,11	0,12	-0,72
3	4,05	0,53	0,14	-0,13
4	3,59	0,36	0,39	-0,48
5	4,05	0,04	0,27	0,14
6	3,59	0,18	0,30	-0,05
7	4,05	0,29	-0,04	-0,82
8	3,59	0,47	-0,27	-0,42

Verificação dos pressupostos matemáticos:

As Figuras F.10, F.11 e F.12 representam, respetivamente, o pressuposto da normalidade, da independência de resíduos e da homogeneidade da variância.

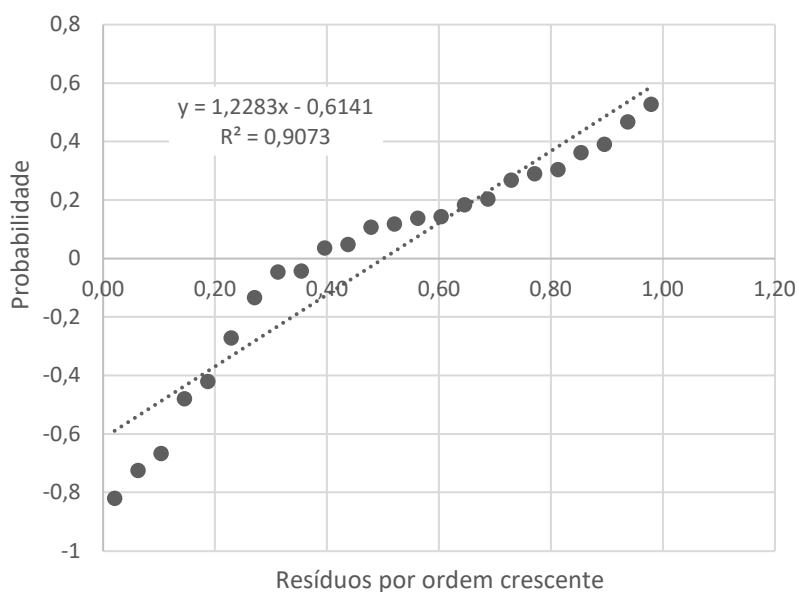


Figura F.10 - Probabilidades da distribuição normal - Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

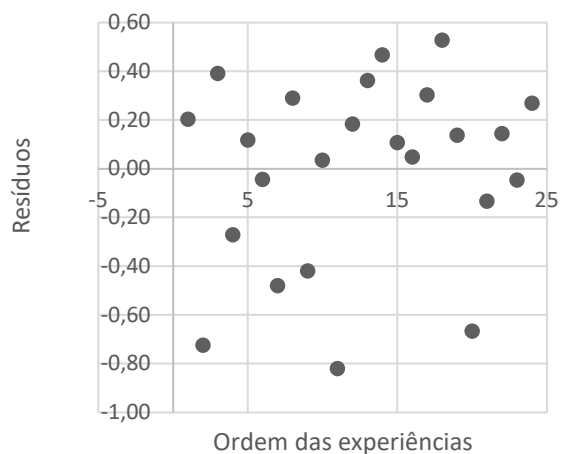


Figura F.11 - Representação gráfica dos resíduos em função da ordem das experiências - Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

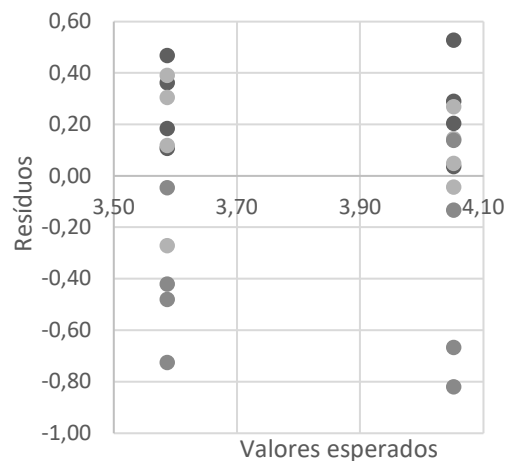


Figura F.12 - Representação gráfica dos resíduos em função dos valores esperados - Variação do doseamento de impurezas totais após estabilidade.

Todos os pressupostos são cumpridos: a **Figura F.10** segue aproximadamente uma regressão linear; a **Figura F.11** não segue nenhuma tendência especial e a **Figura F.12** apresenta os valores dos resíduos dispersos de forma heterogênea entre os valores esperados.

Avaliou-se a existência de *outliers*, sendo este também um parâmetro para validar o pressuposto da normalidade. Uma vez que os respectivos valores para o menor e maior valor de resíduos, - 2,11 e 1,36, se encontram dentro do intervalo $[-3,3]$, então confirma-se o pressuposto da normalidade.

Anexo G: Análise do tamanho de grão

O **Anexo G** apresenta os resultados obtidos na análise granulométrica de Limeciclina, realizada através do *Malvern Morphologi G3*.

Através da **Tabela G.1** é possível visualizar os resultados da distribuição de tamanho em volume, dos lotes de Limeciclina analisados, assim como a respetiva média, desvio-padrão e %RSD.

Tabela G.1 - Resultados da distribuição de tamanho em volume, dos lotes de Limeciclina analisados, obtidos através do software do *Malvern Morphologi G3*.

Lote	Dv (10)	Dv (50)	Dv (90)	Diâmetro min.	Diâmetro máx.
Padrão 75-1.1-75-01	16,12	36,79	61,86	0,22	106,14
75-1.1-81-01	15,32	34,67	57,63	0,22	87,35
75-1.1-87-01	18,28	34,9	55,33	0,22	79,63
75-1.1-89-01	16,42	32,52	51,4	0,22	75,34
75-1.2-12-01	14,37	30,07	49,78	0,22	70,36
75-1.2-18-01	16,91	34	52,92	0,22	76,1
75-1.2-22-01	14,02	29,99	49,57	0,22	74,98
Indústria 305.45 K018	15,6	32,77	52,07	0,22	67,64
Média	15,88	33,21	53,82	0,22	79,69
Desvio-padrão	1,29	2,22	3,96	0,00	11,43
%RSD	8,12	6,68	7,36	0,00	14,34

A **Figura G.1** representa graficamente a distribuição de tamanho em volume, dos lotes de Limeciclina analisados.

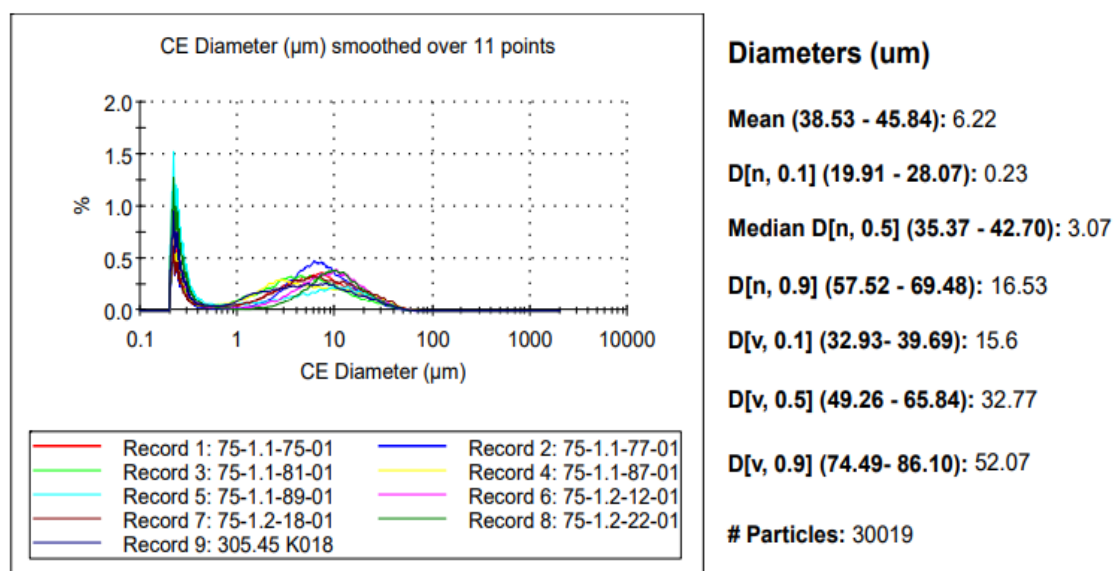


Figura G.1 - Representação gráfica da distribuição de tamanho em volume, para todos os lotes de Limeciclina analisados, obtida através do *Malvern Morphologi G3*.