

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica

“HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos”

Helena Sofia Morgado Porto

Orientador(a): Professor Doutor Sérgio Simões

Co- orientador(a): D^{ra} Mónica Pereira

Tese apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica.

Coimbra, 2014

A informação que consta nesta tese de mestrado cumpre as políticas de privacidade empresariais onde a mesma foi desenvolvida.

*“Para ser grande, sê inteiro;
Nada teu exagera ou exclui;
Sê todo em cada coisa;”*

Ricardo Reis

Ao meu avô Manuel,
pelo símbolo de coragem, dedicação e amor
que sempre me instruiu ao longo da minha vida.

Agradecimentos

A realização desta dissertação, para conclusão do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, só foi possível graças a um grupo de intervenientes que demonstraram muito empenho e, aos quais presto aqui os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro, gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio que sempre me prestou em todas as etapas da minha vida;

À administração da empresa farmacêutica, pela oportunidade concedida em poder realizar o meu projeto de mestrado numa área de elevada relevância na indústria farmacêutica;

A toda a equipa da empresa farmacêutica, pela simpatia e confiança que sempre depositaram em mim;

A toda a equipa do laboratório de Controlo de Qualidade da unidade 4, em especial à D^{ra} Vera Gomes pela orientação científica ao longo de todo o meu projeto;

À D^{ra} Mónica Pereira, diretora dos laboratórios de Controlo de Qualidade da empresa farmacêutica pela amabilidade e carinho com que me acolheu ao longo dos 7 meses de estágio;

Ao Professor Doutor Sérgio Simões por todo o apoio e excelente orientação ao longo de todo o meu projeto.

A todos eles o meu muito sincero, obrigada!

Índice

<i>Capítulo 1</i>	- 1 -
<i>Fundamentação teórica</i>	- 1 -
1. A empresa.....	- 2 -
2. Introdução à cromatografia.....	- 4 -
2.1. Abordagem geral de cromatografia	- 4 -
2.2. A história da cromatografia	- 5 -
2.3. Classificação dos processos cromatográficos.....	- 6 -
2.4. Aplicações da cromatografia.....	- 10 -
3. Cromatografia Líquida de Alta e Ultra Pressão (HPLC e UPLC).....	- 11 -
3.1. Princípios básicos	- 11 -
3.2. Constituição de um sistema de HPLC	- 13 -
3.2.1. Bomba.....	- 14 -
3.2.2. Sistema de Injeção	- 15 -
3.2.3. Coluna de Separação	- 16 -
3.2.4. Detetor	- 19 -
3.3. Operação de um sistema de HPLC	- 21 -
4. Caracterização do produto: <i>Cefuroxima injetável</i>	- 22 -
5. Desenvolvimento e validação de um método analítico	- 25 -
5.1. Desenvolvimento e otimização.....	- 25 -
5.2. Noções introdutórias de validação de um método analítico.....	- 27 -
5.3. Parâmetros analíticos de validação	- 28 -
<i>Capítulo 2</i>	- 32 -
<i>Transferência do método analítico de HPLC para UPLC</i>	- 32 -
1. Equipamentos e reagentes.....	- 33 -
2. Preparação das amostras.....	- 34 -

3. Condições cromatográficas de HPLC e UPLC.....	- 35 -
4. Resultados e discussão.....	- 37 -
<i>Capítulo 3</i>	- 44 -
<i>Validação do método analítico de doseamento do princípio ativo por UPLC</i>	- 44 -
1. Preparação das amostras.....	- 46 -
2. Condições cromatográficas.....	- 47 -
3. Procedimento de validação.....	- 48 -
4. Resultados e discussão.....	- 51 -
<i>Capítulo 4</i>	- 57 -
<i>Validação do método analítico de quantificação de compostos relacionados por UPLC</i>	- 57 -
2. Preparação das amostras.....	- 60 -
3. Condições cromatográficas.....	- 62 -
4. Procedimento de validação.....	- 63 -
5. Resultados e discussão.....	- 67 -
<i>Capítulo 5</i>	- 73 -
<i>Análise conclusiva</i>	- 73 -
<i>Bibliografia</i>	- 76 -
<i>Anexos</i>	- 80 -
<i>Anexo I</i>	- 81 -
<i>Anexo II</i>	- 86 -
<i>Anexo III</i>	- 94 -

Índice de figuras

Figura 1- Empresa farmacêutica	- 3 -
Figura 2- Ilustração da experiência cromatográfica de S. Tswett	- 5 -
Figura 3- Técnicas cromatográficas.....	- 8 -
Figura 4- Cromatograma ilustrativo do tempo de retenção de um composto	- 12 -
Figura 5- Constituição de um sistema de HPLC.....	- 13 -
Figura 6- Operação de um sistema de HPLC.....	- 21 -
Figura 7- Mecanismo de ação da Cefuroxima	- 24 -
Figura 8- Acquity UPLC Calculator	- 82 -
Figura 9- Sugestão inicial das condições cromatográficas para transferência analítica.....	- 82 -
Figura 10- Cromatograma de resultados da transferência analítica da coluna Cortecs	- 84 -
Figura 11- Novas condições cromatográficas para transferência analítica.....	- 84 -
Figura 12- Cromatograma da coluna BEH com as novas condições cromatográficas	- 85 -
Figura 13- Cromatograma da coluna Cortecs com as novas condições cromatográficas .	- 85 -
Figura 14- Gráfico da reta linear do método de doseamento do princípio ativo	- 88 -
Figura 15- Cromatograma da amostra de Cefuroxima em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo	- 90 -
Figura 16- Cromatograma do padrão de Cefuroxima em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo	- 91 -
Figura 17- Cromatograma da fase móvel A em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo.....	- 91 -
Figura 18- Cromatograma da fase móvel B em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo.....	- 91 -
Figura 19- Cromatograma do solvente em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo.....	- 91 -
Figura 20- Gráfico da reta linear do método de compostos relacionados.....	- 96 -
Figura 21- Cromatograma da fase móvel A em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 98 -
Figura 22- Cromatograma da fase móvel B em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados	- 98 -
Figura 23- Cromatograma do solvente em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados	- 98 -

Figura 24- Cromatograma do padrão de Cefuroxima 1mg/ml em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 99 -
Figura 25- Cromatograma da Impureza A em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 99 -
Figura 26- Cromatograma da Impureza B em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 99 -
Figura 27- Cromatograma da Impureza C em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 100 -
Figura 28- Cromatograma da Impureza E em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 100 -
Figura 29- Cromatograma da Impureza F em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 100 -
Figura 30- Cromatograma da Impureza G em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 101 -
Figura 31- Cromatograma da Impureza H em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 101 -
Figura 32- Cromatograma da Impureza I em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 101 -
Figura 33- Cromatograma da solução amostra Cefuroxima a 1mg/ml em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 102 -
Figura 34- Cromatograma da solução Cefuroxima "Spiked" em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados.....	- 102 -

Índice de tabelas

Tabela 1- Classificação cromatográfica quanto ao modo de separação de compostos	9 -
Tabela 2- Exemplo de proporções de fase móvel em operações de método em gradiente e isocrático	14 -
Tabela 3- Fases estacionárias de cromatografia de fase reversa	18 -
Tabela 4- Condições cromatográficas de HPLC	35 -
Tabela 5- Condições cromatográficas iniciais de UPLC para transferência analítica	36 -
Tabela 6- Condições cromatográficas finais de UPLC para transferência analítica.....	36 -
Tabela 7- Condições cromatográficas de validação do método de doseamento do princípio ativo por UPLC.....	47 -
Tabela 8- Condições cromatográficas de validação do método de compostos relacionados por UPLC	62 -
Tabela 9- Requisitos de validação do ensaio de adequabilidade do sistema no método de compostos relacionados.....	63 -
Tabela 10- Ensaio de transferência analítica com coluna Cortecs	83 -
Tabela 11- Valores do ensaio de SST para padrão de Cefuroxima no método de doseamento do princípio ativo.....	87 -
Tabela 12- Áreas das concentrações para cálculo da reta linear do princípio ativo no método de doseamento	87 -
Tabela 13- Estabilidade da amostra e do padrão de Cefuroxima até às 24h no método de doseamento do princípio ativo.....	89 -
Tabela 14- Repetibilidade instrumental do padrão Cefuroxima no método de doseamento do princípio ativo	89 -
Tabela 15- Precisão intermédia entre analistas em ensaios de precisão do método de doseamento do princípio ativo.....	90 -
Tabela 16- Percentagem de recuperação no ensaio de exatidão do método de doseamento do princípio ativo	92 -
Tabela 17- Variação do pH da fase móvel A no ensaio de robustez do método de doseamento do princípio ativo.....	92 -
Tabela 18-Variação da temperatura da coluna no ensaio de robustez do método de doseamento do princípio ativo.....	93 -

Tabela 19- Variação do fluxo de trabalho no ensaio de robustez do método de doseamento do princípio ativo.....	- 93 -
Tabela 20- Valores de ensaio de SST do método de compostos relacionados	- 95 -
Tabela 21- Áreas das concentrações para cálculo da reta linear do método de compostos relacionados.....	- 95 -
Tabela 22- Repetibilidade instrumental do padrão de Cefuroxima a 0,05% na validação do método de compostos relacionados.....	- 96 -
Tabela 23- Ensaio de precisão intermédia na validação do método de compostos relacionados	- 97 -
Tabela 24- Resumo dos tempos de retenção das impurezas no ensaio de selctividade do método de compostos relacionados.....	- 102 -

Resumo

A cromatografia tornou-se no primeiro método de separação de espécies quimicamente muito semelhantes. Neste contexto, a aplicação da cromatografia líquida (HPLC) na indústria farmacêutica tem vindo a destacar-se pelas suas inúmeras vantagens.

Não obstante, a rotina de um laboratório de controlo de qualidade requer análises complexas num curto intervalo de tempo. Desta forma, a transferência de método de quantificação de um produto de HPLC para UPLC tem vindo a destacar-se por esta técnica, UPLC, ser relativamente mais rápida e abranger um maior número de lotes para análise. Com o intuito de uma maior rentabilidade laboratorial, é necessário que os métodos sejam, então, transferidos em HPLC para UPLC. Posteriormente à transferência analítica, é necessário proceder a uma etapa de validação do método em questão.

A validação do método analítico garante, através de estudos experimentais, que o mesmo tem a capacidade de desempenho consistente com a aplicação que requer. Desta forma, a validação de um método analítico é fundamental para implementar um sistema de controlo de qualidade em qualquer laboratório analítico.

A validação de um método incluiu o estudo de diversos parâmetros definidos pela *ICH* e pela *EP*, nomeadamente a seletividade, linearidade, exatidão, precisão, ensaio de adequabilidade do sistema, robustez e estabilidade da amostra e do padrão.

Deste modo, o presente trabalho teve como propósito a transferência de um método analítico de quantificação da *Cefuroxima* em HPLC para UPLC.

Foram estudados quais os parâmetros que poderiam ser alterados para obter resoluções entre impurezas conforme os limites especificados. Após a obtenção das condições cromatográficas ideais em UPLC, procedeu-se à validação do método. Foram executados dois métodos analíticos em UPLC: um correspondente ao método de doseamento do princípio ativo e outro correspondente ao método de quantificação de compostos relacionados.

Inicialmente avaliou-se se o equipamento utilizado estaria apto a gerar resultados com exatidão e precisão. Uma vez testado, confirmou-se que o sistema era capaz de fornecer dados de qualidade aceitáveis.

Os dois métodos demonstraram ser seletivos e específicos para a determinação da *Cefuroxima* e todos os seus compostos relacionados. Foi ainda demonstrado que, os dois métodos são capazes de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração da substância presente na amostra com precisão e exatidão.

Os limites de detecção e quantificação, no método de compostos relacionados, são adequados tendo em consideração o âmbito de utilização do mesmo. Assim, o método analítico apresentado demonstrou ser suficientemente sensível para a detecção e quantificação da *Cefuroxima* e de todas as impurezas a ela associadas.

De realçar, também, que após a análise da estabilidade da amostra e do padrão, esta era garantida durante 24 horas e que, apesar de alterações que possam suceder nos parâmetros do método analítico de doseamento do princípio ativo, este é considerado como robusto.

Palavras-chave: *Cefuroxima*; Cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC); Transferência analítica; Validação de métodos analíticos.

Abstract

Chromatography became the first separation method of chemically similar species. In this context, high pressure liquid chromatography's application in pharmaceutical industry has come to stand out for its numerous advantages.

Nevertheless, the standard procedure of quality control laboratory requires complex analysis in a short period of time. Thus, the transference of HPLC quantification method for UPLC has to stand out since it's relatively faster and reach a large number of lots for analysis. In order to have great profitability in laboratory, it's worthwhile that methods are transferred from HPLC to UPLC. However, after analytical transference, a validation step is necessary.

Method's validation ensures that, through experimental studies, it's capable of being performed with the application that is desired to. Thus, the validation of an analytical method is essential to implement a system of quality control in any analytical laboratory.

A method validation included studies of various parameters defined by *ICH* and *EP*, namely selectivity, linearity, accuracy, precision, system suitability test, robustness and sample and standard's stability.

Therefore, this study was intended to a transference of an analytical method for *Cefuroxime*'s quantification from HPLC to UPLC. Parameters that could be changed in order to have impurities' resolution in an acceptable criteria were studied. After obtaining optimal chromatographic conditions for UPLC, validation was proceeded. Two UPLC analytical methods were performed, a corresponding method of assaying the active and the other corresponding to the related compounds' quantification method.

Initially it was evaluated if the equipment in use would be able to generate results with accuracy and precision. Once tested, it was confirmed that the system was capable of providing acceptable data quality.

Two methods proved to be specific and selective for the determination of *Cefuroxime* and all its related compounds. It has been shown that both methods are capable of generating results linearly proportional to the substance's concentration in the sample, with precision and accuracy.

Detection and quantification limits of related compounds' method are suitable, considering the intended use for it. Thus, the analytical method presented has proved to be sufficiently sensitive for *Cefuroxime*'s detection and quantification and all its related compounds.

Noteworthy, after an analysis of standard and sample's stability, it was assured for 24hours and, despite changes that may occur in analytical method parameters, this is considered robust.

Keywords: *Cefuroxime*; Ultra performance liquid chromatography (UPLC); Analytical transference; Analytical methods' validation.

Lista de abreviaturas

CR's- Compostos relacionados;

EP- Farmacopeia Europeia;

HPLC- Cromatografia líquida de alta pressão;

ICH- *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*;

IM- Via de administração intramuscular;

INFARMED- Autoridade Nacional do Medicamento e produtos de saúde;

IPAC- Instituto Português de Acreditação;

IV- Via de administração intravenosa;

κ - Fator de capacidade;

LD- Limite de deteção;

LQ- Limite de quantificação;

m - Declive da reta linear;

R- Fator de correlação;

RSD- Desvio padrão relativo;

S- Desvio padrão absoluto;

SST- Ensaio de adequabilidade do sistema;

TLC- Cromatografia líquida em camada fina;

T_R - Tempo de retenção de um composto;

UPLC- Cromatografia líquida de ultra pressão;

USP- Farmacopeia dos Estados Unidos;

U.V.- Ultravioleta;

\bar{x} - Média das leituras obtidas.

Capítulo I

Fundamentação teórica

1. A empresa

A empresa farmacêutica onde foi desenvolvido o projeto de mestrado foi fundada na década de 50 por um farmacêutico, fundador de uma importante obra social na região. Inicialmente a empresa operava num pequeno laboratório de apoio, numa farmácia local e dedicava-se, essencialmente, a preparações galénicas, vindo mais tarde iniciar a produção de especialidades farmacêuticas, para o mercado externo e interno, após a edificação de uma unidade fabril ^[1].

A empresa local integra, desde 2005, a rede internacional de unidades de produção de uma multinacional alemã. Tem como principal objetivo o compromisso de apoiar os profissionais de saúde no direcionamento de uma melhor terapêutica para os doentes crónicos e críticos, através do desenvolvimento de produtos farmacêuticos e dispositivos médicos dotados da melhor tecnologia. A empresa aposta em produtos de tratamentos agudos, cirúrgicos e terapêuticos de doentes, nomeadamente no âmbito do tratamento hospitalar e em ambulatório ^[2].

Desta forma, a empresa assume uma missão: “*caring for life*”, que é levada a cabo pelos mais de 30.000 funcionários que emprega em todo o mundo ^[2].

A unidade de produção^[3] é constituída por três edifícios com quatro unidades de produção distintas.

A unidade 1 foi a primeira unidade fabril. É a unidade destinada à produção de penicilinas em pó para injetáveis e em comprimidos e está em funcionamento desde 2000.

A unidade 2 é a unidade de produção de injetáveis de grande e pequeno volume. Esta unidade encontra-se em funcionamento desde 2002.

A unidade 3 é a unidade de produção de sólidos e semissólidos. Aqui são produzidos os comprimidos, as cápsulas, as pomadas e as soluções oftálmicas. Esta unidade está incorporada no mesmo edifício que a unidade 2 e, encontra-se em funcionamento desde 2004.

No edifício onde está situada a unidade 2 e 3, produção de injetáveis e produção de sólidos e semissólidos respetivamente, encontra-se incorporado um dos laboratórios de Controlo de

Qualidade que é responsável por assegurar todo o controlo das produções destas duas unidades.

A unidade 4 foi a unidade desenvolvida mais recentemente, começando a operar em 2007. Nesta unidade são produzidas as cefalosporinas para soluções injetáveis e é onde se encontra o laboratório de Controlo de Qualidade da Unidade 1 e 4 ^[1].

Os dois laboratórios de Controlo de Qualidade responsáveis pela unidade fabril são certificados pelo IPAC, sendo considerados laboratórios de referência nos diversos tipos de ensaios.

O projeto de tese de mestrado foi desenvolvido no laboratório de Controlo da Qualidade, nomeadamente no sector de validação de métodos analíticos, que incorpora o edifício da unidade 4.



Figura 1- Empresa farmacêutica [adaptado de ^[3]]

2. Introdução à cromatografia

2.1. Abordagem geral de cromatografia

A cromatografia é um método de separação e distribuição dos compostos de uma mistura entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária ^[4].

A cromatografia é uma técnica em que a fase móvel (gás, líquido ou fluído supercrítico ^[5]), juntamente com os compostos a separar, escoam numa direção definida ao longo da fase estacionária ^[4]. Esta fase estacionária é uma coluna composta por pequenas partículas porosas esféricas ou por um líquido imiscível de propriedades específicas, dotado de um elevado potencial de separação ^[6]. A fase móvel percorre a fase estacionária através dos poros existentes entre as partículas que compõem a mesma, promovendo a separação dos compostos da mistura através de interações químicas ou físicas. A este processo designamos por eluição.

Estes compostos vão ser, posteriormente, identificados por um detetor que se encontra localizado à saída da coluna cromatográfica. O detetor tem como finalidade identificar e representar, na forma de um gráfico designado por cromatograma, os compostos que percorreram a fase estacionária ^[7].

2.2. A história da cromatografia

A cromatografia surgiu no início de 1900 quando o botânico russo Mikhail S. Tswett se focou na separação de pigmentos extraído de folhas de plantas, fazendo passar um solvente através de uma coluna cheia de partículas de vidro ^[8]. O seu estudo tinha como finalidade a pesquisa da clorofila e da xantofila das plantas ^[9]. Assim sendo, na sua experiência fez correr, através da coluna, a amostra que tinha preparado - extrato de solvente de folhas de plantas homogeneizadas, seguindo-se a passagem de um solvente puro, Figura 2 ^[8]. A análise dos pigmentos, que atravessaram a coluna através da força da gravidade, foi feita com base na visualização das faixas com cores diferentes. Com esta análise, S. Tswett pôde identificar os diferentes pigmentos que se encontravam na mistura homogénea da folha de uma planta e concluiu que a separação analítica dos mesmos baseava-se na força da atração química que cada pigmento tinha com a fase estacionária. Em termo de conclusão, os pigmentos que foram fortemente atraídos pelas partículas da coluna teriam uma maior afinidade com a fase estacionária e, conseqüentemente, escoavam mais lentamente da mesma. Por outro lado, as partículas que tinham sido mais atraídas pelo solvente (fase móvel) e excluídas mais rapidamente da coluna teriam uma maior afinidade para este. Desta forma, cada pigmento percorreu a coluna com uma velocidade diferente, possibilitando uma separação dos compostos que puderam ser analisados e identificados posteriormente ^[8].

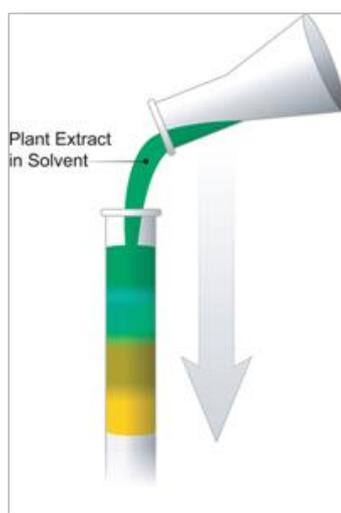


Figura 2- Ilustração da experiência cromatográfica de S. Tswett [adaptado de ^[8]]

2.3. Classificação dos processos cromatográficos

As técnicas cromatográficas dependem de inúmeros critérios, de entre os quais estão apresentados na Figura 3 ^[6].

Relativamente ao **tipo de suporte**, a cromatografia pode dividir-se em dois tipos: cromatografia em coluna e cromatografia planar ^[6].

Na cromatografia em coluna, a fase estacionária encontra-se fixa num tubo estreito, onde a fase móvel é forçada a passar sobre uma determinada pressão.

Por outro lado, na cromatografia planar, também conhecida por cromatografia em camada fina ou TLC, a fase estacionária é suportada sobre uma placa plana específica ou pelos interstícios de um papel. A fase móvel encontra-se numa tina vertical onde vai ser mergulhada a placa de TLC contendo a fase estacionária e onde, por ação capilar ou por influência da gravidade, vai migrar ao longo da mesma ^{[9] [10]}.

Relativamente ao **modo de separação dos compostos**, tendo em conta os princípios químicos e físicos das duas fases de separação (fase móvel e fase estacionária), a cromatografia pode ser classificada como cromatografia de adsorção, de partição, de permuta iónica, de exclusão de tamanhos ou de afinidade, Tabela I ^[6].

Na cromatografia de adsorção, a separação dos compostos ocorre devido às interações electrostáticas e às forças Van Der Waals que se estabelecem entre a fase estacionária (geralmente um sólido) e os componentes a separar da fase móvel (líquido ou gás) ^[6]. Este tipo de cromatografia é aplicável na separação de compostos não polares muito semelhantes entre si, química e fisicamente, e de pesos moleculares inferiores a 5000 g/mol ^{[10] [11]}.

Na cromatografia de partição, os compostos são separados com base nas diferenças de solubilidade entre dois líquidos imiscíveis que constituem duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. A fase estacionária encontra-se imóvel nas partículas porosas e a fase móvel, contendo a mistura a separar, percorre a mesma até haver separação total dos compostos. Segundo a lei de partição de Nernst, o composto a separar é repartido numa porção com uma determinada concentração, entre a fase móvel e a fase estacionária ^[11].

Na cromatografia de permuta iónica, a separação dos componentes ocorre devido a tendências de os componentes trocarem iões entre a fase estacionária e a fase móvel ^[6]. Os

mecanismos de permuta iónica têm por base o equilíbrio de permuta entre iões em solução, na fase móvel, e iões à superfície de um composto sólido, da fase estacionária, de elevado peso molecular, por exemplo as resinas ^[10].

Na cromatografia de exclusão de tamanhos, tal como o nome indica, os componentes são separados de acordo com o seu tamanho molecular. Assim sendo, as moléculas maiores não conseguem agregar-se à fase estacionária, deslocando-se mais rapidamente ao longo da coluna até à saída. Contrariamente a estas, as moléculas mais pequenas têm maior capacidade de se agregar às partículas da fase estacionária e deslocam-se de uma forma mais retardada ao longo da coluna ^[10].

Por último, na cromatografia de afinidade a ligação entre o soluto e um ligante imobilizado da fase estacionária ocorre especificamente e de uma forma reversível. Este tipo de separação cromatográfica acontece quando se pretende separar especificamente produtos biológicos, nomeadamente ligações enzima-substrato, anticorpos- substratos e recetores de hormonas ^[6].

Relativamente à **natureza da fase móvel**, a cromatografia classifica-se em cromatografia gasosa, líquida e supercrítica ^[6].

Na cromatografia gasosa, a fase móvel encontra-se sob a forma de um gás, designado por gás de arraste, enquanto a fase estacionária pode ser um líquido ou um sólido, proporcionando uma separação com base em processos físico-químicos, tais como adsorção, diferenças de solubilidade e volatilidade ^[6]. O gás arrastador deve ser inerte, para que não haja interação entre o mesmo e a fase estacionária e também deve ser puro, de forma a promover uma maior reprodutibilidade dos resultados cromatográficos ^[12]. Este tipo de cromatografia permite separar substâncias voláteis arrastadas pelo gás, ao longo da fase estacionária até ao detetor, onde os componentes separados são detetados ^[6].

Na cromatografia líquida, ao contrário da cromatografia gasosa, a fase móvel é um líquido que escoar, numa direção definida, ao longo da fase estacionária. Esta técnica cromatográfica é adequada para a separação de componentes de soluções líquidas, em que a amostra injetada na coluna é homoganeamente distribuída ao longo da fase estacionária. A fase móvel, transportando a amostra, percorre a fase estacionária (coluna) devido a uma força de gravidade (cromatografia de baixa pressão) ou através de uma força mais intensa gerada por uma bomba (cromatografia de alta pressão- HPLC). Durante o processo de arrastamento da fase móvel através da coluna, os componentes migram com velocidades diferentes e são

identificados de acordo com o seu acoplamento à fase estacionária, devido a um detetor localizado à saída da coluna cromatográfica. Este detetor fornece um registo contínuo da composição da amostra que está a ser analisada e que é transcrito num cromatograma [6].

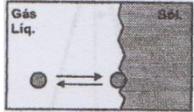
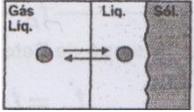
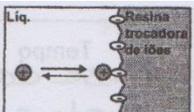
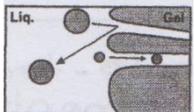
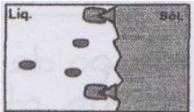
No que diz respeito à cromatografia com fluido supercrítico, esta permite uma quantificação e separação de uma categoria de compostos que não podem ser determinados, com precisão, por cromatografia líquida nem por cromatografia gasosa. Neste contexto, a temperatura crítica de uma substância é a temperatura acima da qual essa substância não se encontra sob a forma de um líquido, nem sob a forma de um gás. Quando uma substância se encontra a temperaturas e pressões acima da sua temperatura e pressão críticas, são denominados de fluidos supercríticos, pois apresentam propriedades de densidade e viscosidade como tais. O uso de fluidos supercríticos tornou-se promissor na análise de amostras ambientais (pesticidas, herbicidas e combustíveis fósseis), biomédicas e alimentares (extração de cafeína dos grãos de café e a nicotina do tabaco dos cigarros). O equipamento de cromatografia em fluido supercrítico é semelhante a um HPLC. Varia apenas no facto de a coluna ter que estar termostaticada e com uma pressão controlada de tal forma que a substância apresente as propriedades de viscosidade e densidade características [10].

No que diz respeito à **composição da fase móvel**, esta pode ter uma composição constante (método isocrático) ou uma composição variável (método de gradiente). Este item será abordado na secção 3.2.1. do Capítulo I, onde se descreve, mais pormenorizadamente, a constituição de um equipamento de cromatografia líquida de alta pressão.



Figura 3- Técnicas cromatográficas [adaptado de [6]]

Tabela I- Classificação cromatográfica quanto ao modo de separação de compostos

Cromatografia	Tipo de separação	Esquema separação
Adsorção	Interações electrostáticas e forças Van Der Waals	
Partição	Diferenças solubilidade (Lei de partição de Nernst)	
Permuta iónica	Troca iónica entre iões fase móvel e estacionária	
Exclusão de tamanhos	Peso molecular das moléculas	
Afinidade	Ligação do soluto a um ligante específico	

2.4. Aplicações da cromatografia

Como já foi referido na secção 2.3 do capítulo I, de acordo com os métodos de separação dos componentes desejados, e também com a natureza da fase móvel, as aplicações da cromatografia, como método de separação, são inúmeras. Por isso, de uma forma generalista, a cromatografia pode ser aplicada em análises quantitativas, *fingerprint* e de farmacocinética ^[13].

No que diz respeito à cromatografia líquida, esta é utilizada em análises de quantificação alimentar, cosméticos, matrizes ambientais, amostras forenses e no âmbito da química industrial ^[8]. Para além disso, é utilizada na purificação de produtos farmacêuticos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas e esteroides ^[6] e, também, na determinação dos níveis de impurezas em substâncias da ciência farmacêutica e biomédica ^[14].

A cromatografia gasosa é utilizada para separar componentes relativamente voláteis, como é o caso dos álcoois, cetonas, aldeídos, entre outros ^[6]. Não obstante, a cromatografia gasosa também pode ser utilizada na identificação de pesticidas e gasolinas.

A cromatografia com fluido supercrítico, tal como foi referido anteriormente, é utilizado em análises de amostras ambientais, pesticidas, herbicidas e combustíveis fósseis ^[15] e também em análises biomédicas e alimentares, nomeadamente na extração de cafeína dos grãos de café e da nicotina do tabaco dos cigarros ^[10].

A área da cromatografia está cada vez mais em desenvolvimento e distingue-se por a sua análise ser, não só mais rentável ao nível do tempo, como também a mais fidedigna no que diz respeito à quantificação dos analitos.

3. Cromatografia Líquida de Alta e Ultra Pressão (HPLC e UPLC)

3.1. Princípios básicos

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC- High Pressure Liquid Chromatography) é uma técnica com a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos que estão presentes numa mistura ^[8].

Ao tempo que uma determinada substância, juntamente com a fase móvel, demora a atravessar a coluna (fase estacionária) e a atingir o detetor, designamos por tempo de retenção. Assim sendo, o tempo de retenção corresponde à medida em função do tempo, entre o ponto de injeção da amostra e o pico de um componente que emerge da coluna (Figura 4). O tempo de retenção pode variar com o fluxo, o comprimento e o diâmetro da coluna ^[16].

Esta técnica é também caracterizada pelo uso de colunas em aço inoxidável com diâmetro interno entre 2-5 mm, empacotadas com partículas porosas esféricas de tamanho muito pequeno, 3-10 µm, constituindo a fase estacionária. A fase móvel passa continuamente pela coluna, a uma pressão elevada e com um fluxo controlado. A utilização de pressões elevadas permite uma maior eficiência das análises e o uso de colunas com micropartículas permite uma elevada eficiência na separação dos compostos ^[4].

Um sistema de HPLC está, normalmente, acoplado a um computador (Figura 5), onde é traduzida, sob a forma de um gráfico (cromatograma) a leitura dos analitos que foram identificados pelo detetor ^[8].

De forma a obter uma maior eficiência na separação dos compostos, desenvolveu-se uma nova técnica de cromatografia líquida, a cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC). Esta técnica assenta nos princípios da cromatografia líquida de alta pressão, mas com algumas diferenças que vão facilitar o método de separação. O desenvolvimento da técnica de UPLC veio trazer claras vantagens à separação cromatográfica de analitos. Esta técnica permite uso de colunas com um comprimento mais reduzido, assim como das partículas que compõem a

fase estacionária, a aplicação de pressões mais elevadas, que podem ser superiores aos 14 000 psi, o consumo de solvente é relativamente inferior e o fluxo aplicado para a passagem das amostras pela fase estacionária pode ser mais elevado. Para além disso, o cromatograma apresenta uma maior resolução (grau de separação entre os picos) e uma maior sensibilidade de deteção dos compostos presentes nas amostras. Todas estas vantagens vieram contribuir para uma redução do tempo de análise, uma das principais dificuldades aplicadas à cromatografia líquida de alta pressão [5] [13] [17] [18] [19] [20].

A cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) caracteriza-se pelo uso de colunas em aço inoxidável com diâmetro interno na ordem dos 2mm, empacotadas com partículas de tamanho muito pequeno, inferiores a 2µm.

Esta técnica veio despertar interesse na quantificação de compostos em análises farmacêuticas, biomédicas, ambientais e alimentares, destacando-se como um futuro promissor da cromatografia líquida [14] [20].

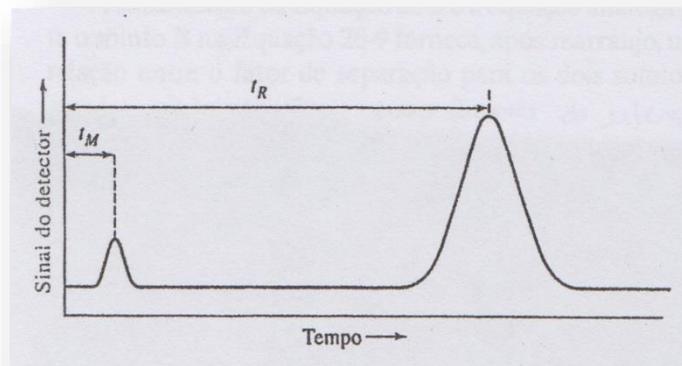


Figura 4- Cromatograma ilustrativo do tempo de retenção de um composto [adaptado de [9]]

3.2. Constituição de um sistema de HPLC

Um sistema de HPLC é caracterizado como o conjunto de componentes que estão num único aparelho e que permite a identificação e a quantificação dos compostos que estão presentes numa amostra, com um tempo e custo mais reduzidos.

Um sistema de HPLC é, então, constituído por quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detetor, como estão representados na Figura 5 ^[21].

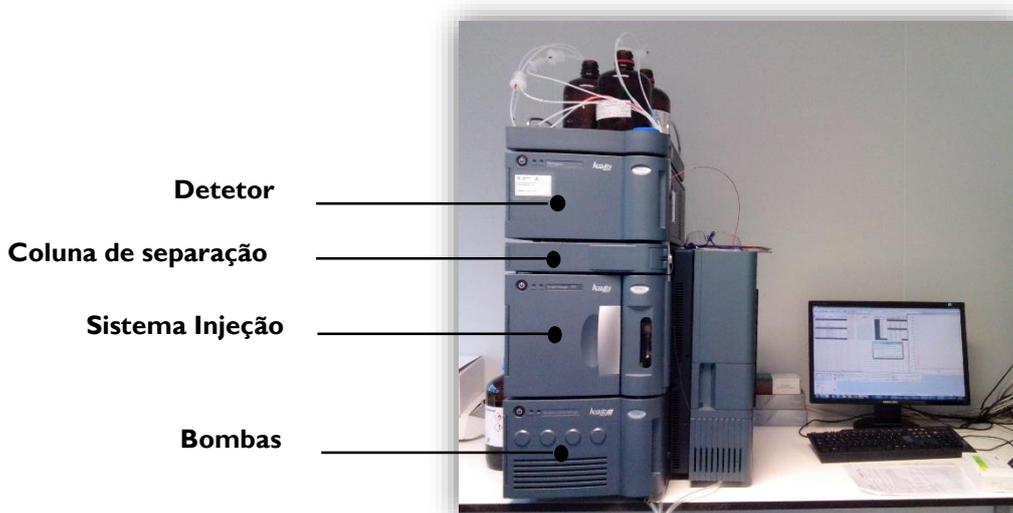


Figura 5- Constituição de um sistema de HPLC

3.2.1. Bomba

A bomba de alta pressão é necessária para fazer passar a fase móvel, através da coluna, com um fluxo geralmente na ordem dos mililitros por minuto [8].

A fase móvel, que é bombeada para passar na fase estacionária, nem sempre possui a mesma composição, variando consoante os compostos e o método de separação. Assim, quando há uma alteração gradual da composição da fase móvel ao longo do processo cromatográfico, por aumento e posterior diminuição de percentagem de solvente orgânico móvel, diz-se que o sistema está a operar num método de gradiente. Neste método, a percentagem de fase móvel A e fase móvel B não é a mesma ao longo de todo o processo de separação cromatográfica, variando nas suas proporções.

Por sua vez, nos casos em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise (percentagem de A e de B é exatamente igual durante todo o processo de separação cromatográfica) diz-se que o sistema está a operar num método isocrático (Tabela 2).

Tabela 2- Exemplo de proporções de fase móvel em operações de método em gradiente e isocrático

Método	Tempo (min)	%A	%B
Gradiente	2	90	10
	4	80	20
	6	60	40
	8	80	20
	10	90	10
Isocrático	2	80	20
	4	80	20
	6	80	20
	8	80	20
	10	80	20

3.2.2. Sistema de Injeção

O processo de separação cromatográfica começa quando a amostra, juntamente com a fase móvel, é injetada logo no início da coluna. A amostra é bombeada e percorre a coluna, onde vai ocorrer a separação dos analitos.

O injetor é o responsável por introduzir a amostra na fase móvel, que está continuamente a passar na coluna do sistema de cromatografia líquida.

Apesar de ainda existir aparelhos de HPLC de injetor manual, na sua maioria estes equipamentos operam de forma *autosampler*, permitindo uma programação contínua de injeções automáticas das amostras.

3.2.3. Coluna de Separação

Na cromatografia analítica, são utilizadas colunas de separação com comprimentos e diâmetro interno variável. A coluna é constituída por um material de empacotamento específico para a separação cromatográfica dos componentes. Este material de empacotamento da coluna é designado por fase estacionária e é constituído por pequenas partículas porosas esféricas com uma superfície específica variável ou por um líquido específico, dotado de um elevado potencial de separação de componentes. Este material de empacotamento da fase estacionária pode suportar pressões que podem ser superiores a 14 000psi e vai contribuir para um comportamento cromatográfico específico ^{[6] [8]}.

Para separações analíticas, o tamanho de partículas habitualmente usado varia entre 3-10µm, podendo ser inferior a 2µm para o caso de operações em UPLC. Apesar de existirem colunas refrigeradas ou aquecidas, proporcionando uma maior eficiência de separação, a maioria das separações cromatográficas são feitas à temperatura ambiente. Todas as colunas possuem temperaturas específicas de trabalho, para que não ocorra uma potencial degradação da fase estacionária ou alteração da composição da fase móvel.

Relativamente à coluna de separação, esta pode ser caracterizada de acordo com a sua polaridade ou de acordo com a composição das partículas. Tanto na polaridade, como na composição das partículas da coluna, as suas identificações vão variar de acordo com os compostos que se quer identificar e quantificar.

Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, designamos que a cromatografia líquida é de fase normal. Desta forma, numa solução contendo compostos mais polares que outros, os compostos mais polares vão ter uma maior afinidade com a fase estacionária, saindo da coluna de separação mais tarde do que os compostos menos polares. Na cromatografia líquida de fase normal, os adsorventes da fase estacionária mais utilizados são normalmente a sílica e a alumina.

Por outro lado, quando a fase estacionária é menos polar que o solvente (fase móvel) designamos que a cromatografia é de fase reversa. Pode dizer-se que, na cromatografia de fase reversa os compostos apolares, ou fracamente polares, são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção na fase estacionária é tanto maior, quanto menor é a sua solubilidade na fase móvel. Na cromatografia líquida de fase reversa utiliza-se, como adsorventes da fase estacionária, substâncias quimicamente modificadas com ligações de grupos funcionais ^{[6] [22]}.

Quanto à composição das partículas, estas podem ser constituídas por diversos materiais que vão influenciar o tipo de separação dos compostos.

Quando as partículas são constituídas por materiais como a sílica, a alumina ou a grafite, o tipo de cromatografia aplicado é de fase normal, onde a separação dos compostos ocorre devido às diferenças de adsorção ou distribuição de massa. Quando a sua composição é de resina ou polímeros com grupos ácidos ou básicos, o tipo de cromatografia aplicada é a de troca iónica, em que a separação faz-se por competição entre os iões da amostra e os iões da fase móvel. Quando a composição é de sílica porosa ou polímeros, a cromatografia aplicada é de exclusão por tamanho, em que a separação ocorre com base nas diferenças de tamanhos das moléculas. E, quando são utilizados materiais com suportes quimicamente modificados, preparados a partir de polímeros- sílica ou grafite porosa, é aplicada uma cromatografia de fase reversa, em que a separação dos compostos é feita com base na partição de moléculas entre a fase estacionária e a fase móvel, Tabela I.

Atualmente, e na sua maioria, os processos de separação cromatográfica são baseados em mecanismos de partição que utilizam fases estacionárias com materiais de sílica quimicamente modificadas e as fases móveis são normalmente polares, ou seja, operam em fase reversa. A natureza da fase estacionária é um parâmetro crítico para a determinação da separação do sistema cromatográfico. Este tipo de fase estacionária é amplamente utilizado, nomeadamente na indústria farmacêutica. Não obstante, este tipo de cromatografia permite separações mais eficientes e reprodutíveis uma vez que são mais estáveis e a deteção dos compostos é mais fácil. As colunas de sílica

de fase reversa mais utilizadas nos processos de separação cromatográfica estão identificadas na Tabela 3 ^[23].

Tabela 3- Fases estacionárias de cromatografia de fase reversa [adaptado de ^[23]]

Nomenclatura	Estrutura molecular da fase estacionária	Abreviatura
<i>n</i> - Octil	Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C ₈
<i>n</i> - Octadecil	Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
<i>n</i> - Fenil	Si-(CH ₂) _n -(C ₆ H ₅)	C ₆ H ₅
<i>n</i> - Cianopropil	Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
<i>n</i> - Aminopropil	Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂

3.2.4. Detetor

O detetor é importante para identificar e quantificar os analitos. Existem diversos tipos de detetores: detetores espectrofotométricos (UV), de fluorescência (sensíveis a espécies que fluorescem), de índice de refração, eletroquímicos, de massa, de dispersão de luz, de radioatividade e detetores especiais ^[6] ^[23].

O limite de detecção (LD) é considerado como a menor quantidade de analito que está presente numa amostra e que pode ser detetado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais inicialmente estabelecidas para o método analítico em questão ^[24].

O limite de quantificação (LQ) é considerado como a menor quantidade de analito que pode ser determinada, numa amostra, com níveis de precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais inicialmente estabelecidas para o método analítico. O limite de quantificação é um parâmetro que avalia baixos níveis de compostos na amostra e é essencialmente utilizado na determinação de impurezas ^[24].

Um detetor de HPLC deve seguir alguns requisitos, de entre os quais se destacam:

- Boa sensibilidade para todos os solutos;
- Limite de detecção suficientemente baixo;
- Boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal;
- Resposta rápida do sensor;
- Detetor com menor volume possível ^[25].

Para além disso, o detetor deve possuir algumas características adicionais às referidas anteriormente, que vão afetar a aplicação do mesmo.

Assim sendo, o sinal do detetor deve ser o menos possível influenciado pela temperatura, pela velocidade do fluxo e pela composição da fase móvel, para que seja garantida uma correta deteção dos analitos.

Desta forma, o detetor deve ser adequado aos componentes que se pretendem analisar e que percorrem a coluna cromatográfica, para que a eficácia da deteção e quantificação dos mesmos seja elevada.

Em laboratórios de análises farmacêuticas, o tipo de detetor mais utilizado é o espectrofotométrico, permitindo monitorizar e registar a absorvância na gama do U.V. de um composto, a um determinado comprimento de onda (λ).

3.3. Operação de um sistema de HPLC

O processo de cromatografia líquida é um processo contínuo e que opera num circuito fechado, Figura 6.

As amostras encontram-se dissolvidas em vias, acondicionadas num compartimento do equipamento, a uma determinada temperatura. A fase móvel encontra-se em reservatórios de vidro, equipados com um removedor de gás, que garante a eficiência do detetor por eliminação total das bolhas de ar ^[26]. A fase móvel é introduzida no sistema através de um canal com um filtro, de forma a garantir a ausência de partículas e microrganismos que poderão pôr em causa o bom funcionamento do sistema. A fase móvel é bombeada, através das bombas, a passar na coluna a um fluxo constante, definido pelo método analítico.

O injetor começa por extrair um volume de amostra (μL) e introdu-la na fase móvel que está constantemente a passar pela coluna. A amostra passa, juntamente com a fase móvel, através dos poros existentes entre as microesferas da fase estacionária, com uma determinada pressão e, consoante a sua afinidade para esta e o seu peso molecular, vão sair da coluna num determinado tempo, designado por tempo de retenção. Depois de saírem da coluna, os compostos são detetados, identificados e quantificados através do detetor, que vai transferir essa informação para um cromatograma.

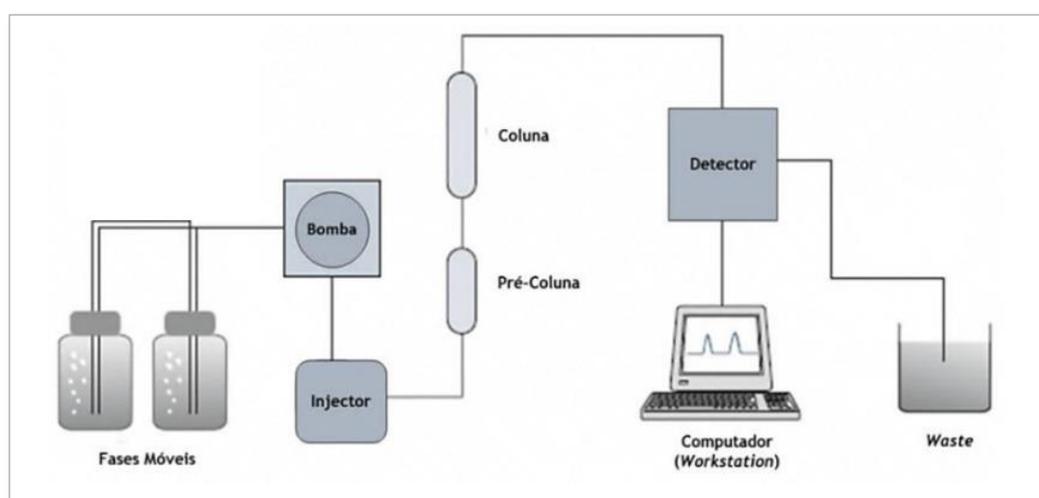


Figura 6- Operação de um sistema de HPLC [adaptado de ^[32]]

4. Caracterização do produto: *Cefuroxima injetável*

O produto escolhido para a realização do projeto de Mestrado foi a *Cefuroxima* para solução injetável.

A *Cefuroxima* é um antibiótico que pertence à família dos antibióticos β - lactâmicos ^{a)}, que por sua vez pertence à classe das cefalosporinas de segunda geração ^{b)}. Este antibiótico é ativo contra um largo espectro de microrganismos gram-positivos e gram-negativos. É um produto muito utilizado, nomeadamente, no âmbito hospitalar.

I. Forma farmacêutica:

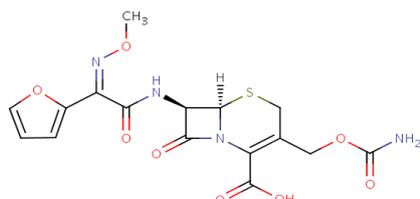
Frasco para injetável doseado com 250mg, 750mg ou 1500mg de pó, acondicionados numa embalagem com a respetiva ampola.

II. Informação química:

a) Fórmula molecular



b) Estrutura molecular



c) Peso molecular

446,4 g/mol

III. Indicações terapêuticas:

Infeções do trato urinário; infeções dos tecidos moles; infeções ósseas e das articulações; infeções obstétricas e ginecológicas; doenças inflamatórias pélvicas; gonorreia; outras infeções (ex. meningite).

IV. Posologia:

- Em adultos, a dose administrada é, parenteralmente, de 750mg a 1,5g de antibiótico, de 8 em 8 horas;
- Em infeções não complicadas são administradas IV ou IM 750mg de antibiótico de 8 em 8 horas;
- Em infeções severas são administradas IV 1,5g de antibiótico, três vezes ao dia, podendo vir a aumentar a frequência da sua administração;
- No caso da gonorreia, administrar em dose única, em locais diferentes, 1,5g do medicamento com associação a outro antibiótico oral.
- Nos casos de meningite, administrar IV em monoterapia ^{c)} 3g de antibiótico, de 8 em 8 horas.

V. Propriedades farmacodinâmicas:

Os antibióticos β - lactâmicos inibem irreversivelmente uma enzima, a transpeptidase, que é responsável por catalisar a reação de transpeptidação ^{d)} que ocorre na parede celular das bactérias. Desta forma, as propriedades farmacológicas da *Cefuroxima*, antibiótico β - lactâmico,

resultam na inibição da síntese da parede celular bacteriana, por ligação a proteínas-alvo essenciais [27].

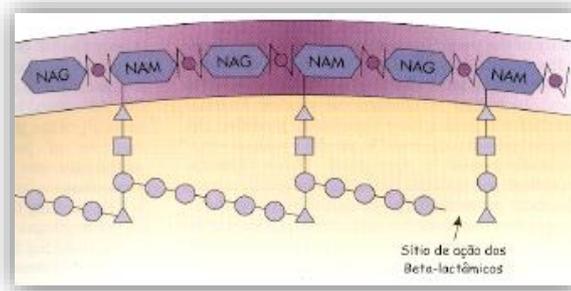


Figura 7- Mecanismo de ação da Cefuroxima [adaptado de [33]]

VI. Propriedades farmacocinéticas:

- **Absorção:** após administração IM, a absorção é rápida e completa. A sua biodisponibilidade na dose de 500mg é de 92%;
- **Distribuição:** a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas é de 33%. O volume de distribuição é de 25-30L no caso de um sujeito saudável;
- **Eliminação:** a *Cefuroxima* é eliminada na ordem dos 95% através do trato urinário, sob a sua forma inalterada e não metabolizada pelo organismo [28] [29].

I

-
- a) Inibem a síntese da parede celular das bactérias, impedindo as ligações de peptidoglicano presentes na mesma.
 - b) São menos ativas que as cefalosporinas de primeira geração contra as bactérias gram-positivas mas, por sua vez, possuem uma maior atividade contra as bactérias gram-negativas.
 - c) Quando a sua administração não necessita de associação com outro antibiótico.
 - d) Reação em que a enzima, transpeptidase, leva à formação de ligações cruzadas entre cadeias de peptidoglicano presentes na parede celular bacteriana e que conferem rigidez à mesma, evitando variações osmóticas do meio.

5. Desenvolvimento e validação de um método analítico

5.1. Desenvolvimento e otimização

A transferência de um método analítico é um processo complexo e relativamente moroso.

O método de transferência analítica de HPLC para UPLC tem o propósito de obter resultados num menor intervalo de tempo, com menor gasto de reagentes e com quantidades de amostra analisada muito menores. Contudo, na transposição de um método analítico de HPLC para UPLC, é crucial existir uma confirmação de que os novos resultados obtidos em UPLC são semelhantes aos já existentes e aprovados em HPLC, nomeadamente no que diz respeito ao parâmetro de resolução entre os compostos. Portanto, os resultados obtidos pelo método de UPLC têm que concretizar os idênticos obtidos pelo método de quantificação do produto por HPLC.

Posteriormente à transferência analítica, existe uma etapa de validação do método de doseamento do ativo, bem como de todos os compostos relacionados existentes num produto final. No que diz respeito ao método de doseamento, o processo de transferência é mais simples do que o método de compostos relacionados. Enquanto no método de doseamento, a única variante a avaliar é o pico correspondente à substância ativa, no método dos compostos relacionados há que avaliar todas as impurezas que estão associadas ao produto final. No método de compostos relacionados o propósito é obter resolução para todas as substâncias relacionadas, de modo análogo ao observado em HPLC. Todos os parâmetros que serão avaliados ao longo deste subcapítulo são referentes à investigação e quantificação de compostos relacionados (CR's).

De forma a minimizar algum do tempo dispensado no processo de transferência analítica, a *Waters* desenvolveu um equipamento de UPLC dotado de um sistema de bombas quaternárias, designado por UPLC Classe H. Este aparelho é relativamente semelhante a um HPLC e, desta forma, vai permitir que a diferença de operação entre um HPLC e um UPLC

seja menor. Por conseguinte, a transferência analítica torna-se mais vantajosa quando se opera num sistema Classe H.

O software *Empower*, utilizado pela empresa, é dotado de uma ferramenta, o *Acquity UPLC Calculator* (Anexo I, Figura 8), que permite a introdução das condições cromatográficas de um método em HPLC e sugere a adaptação desses mesmos parâmetros para UPLC. Não obstante, a utilização do *Acquity UPLC Calculator* é apenas um ponto de partida para os estudos de transferência analítica, uma vez que as condições cromatográficas aconselhadas podem, nem sempre, ser totalmente aplicáveis à transferência em estudo.

A transferência de um método de quantificação de compostos relacionados de HPLC para UPLC é um processo longo, que requer a avaliação e o ajuste de uma série de parâmetros cromatográficos que são considerados críticos na transferência analítica, e que seguem o propósito de obter resoluções entre compostos em UPLC, em todo, semelhantes às que se obtêm em HPLC. Estes parâmetros podem ser:

- Tipo de coluna;
- Fluxo da fase móvel;
- Temperatura da coluna;
- Proporção da fase móvel que atravessa a coluna (% Fase móvel A e % Fase móvel B);
- Composição da fase móvel;
- Volume de injeção ^[19].

Tal como já foi referido anteriormente, nem sempre os parâmetros sugeridos pelo *Acquity UPLC Calculator* são totalmente aplicáveis à quantificação do produto em estudo. Desta forma, torna-se essencial reajustar os mesmos, para que os resultados obtidos se encontrem dentro dos parâmetros aceitáveis.

5.2. Noções introdutórias de validação de um método analítico

A qualidade analítica é um fator muito importante na indústria farmacêutica, nomeadamente nos processos de desenvolvimento, produção e controlo de qualidade dos medicamentos.

Os métodos analíticos permitem avaliar a conformidade dos resultados de identificação e quantificação dos analitos com as especificações definidas para um determinado processo ou produto.

A validação de um método analítico é o processo que atesta que o mesmo é adequado ao fim a que se destina.

A validação evidencia, objetivamente, que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional.

Na indústria farmacêutica, o processo de validação torna-se complexo, pois todos os procedimentos analíticos de um medicamento, desde o seu desenvolvimento até ao seu controlo de qualidade, devem ser validados. A validação de todos os processos de um produto farmacêutico tem que satisfazer determinados requisitos impostos legalmente pelas autoridades reguladoras e diretivas vigentes.

Muito frequentemente, a transferência de um método analítico é complementada com a respetiva validação, sendo esta alargada ao doseamento da substância ativa e aos compostos relacionados associados a um dado medicamento ^[24] ^[30].

5.3. Parâmetros analíticos de validação

As estratégias e os parâmetros a avaliar, aquando de uma validação de um método analítico, encontram-se descritos na “*ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”.

De seguida encontram-se enumerados todos os parâmetros de validação de um método analítico documentados para a indústria farmacêutica.

I. Seletividade

A seletividade de um método analítico avalia a presença, não só do composto ativo em estudo, bem como de todos os compostos relacionados que poderão estar normalmente presentes e que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa (ex. impurezas). A seletividade garante que o pico de resposta é exclusivamente do princípio ativo do produto ^{[24] [30] [31]}.

2. Exatidão

O ensaio de exatidão expressa a proximidade entre o valor quantificado e o valor real de referência do nosso analito. A exatidão mede o erro que está associado a esta proximidade de resultados. Os erros sistemáticos põem em causa a veracidade do resultado experimental, provocando um desfasamento do mesmo, relativamente ao valor real presente na amostra. A exatidão é calculada segundo a equação (1):

$$\text{Exatidão}(\%) = \frac{\text{valor quantificado}}{\text{valor real}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Segundo a “*ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”, o cálculo da exatidão consiste na determinação de três leituras a cada uma das três concentrações diferentes definidas pelo método. O valor da exatidão é

apresentado sob a forma de percentagem de recuperação. A percentagem de recuperação é definida como a quantidade de substância existente numa amostra que é extraída e possível de ser quantificada ^{[24] [30] [31]}.

3. Precisão

A precisão expressa a proximidade entre valores obtidos a partir de múltiplas análises à mesma amostra homogénea. Normalmente é expressa através do desvio padrão relativo (RSD) de várias repetições. É calculado com base na relação entre o desvio padrão absoluto “S” e a média das determinações “X média”.

$$RSD = \frac{S}{X \text{ média}} \quad \text{Equação (2)}$$

A precisão pode ser avaliada através de dois níveis:

- A. Repetibilidade instrumental:** expressa a precisão sob as mesmas condições de operação num curto intervalo de tempo;
- B. Precisão intermédia:** avalia variações intra-laboratoriais e que comprometem a execução das análises, tais como a execução em diferentes dias, por diferentes analistas, em equipamentos diferentes, etc. A precisão intermédia permite avaliar se, no mesmo laboratório, os resultados obtidos pelo método serão os mesmos, independentemente das alterações que possam ocorrer ^{[24] [30] [31]}.

4. Estabilidade de amostra e padrão

A estabilidade de soluções permite estabelecer um período de tempo em que estas não sofrem alterações ou degradações às suas características originais. Desta forma, este ensaio permite avaliar que, quer a amostra quer o padrão, apresentam um comportamento estável durante um determinado tempo de análise ^{[24] [30] [31]}.

5. Limite de deteção (LD)

O limite de deteção avalia a menor concentração de analito presente na amostra que pode ser detetado, mas não necessariamente quantificado. O limite de deteção é calculado com base na equação (3), em que o “S” corresponde ao desvio padrão absoluto e o “m” ao declive da reta linear calculados no ensaio de linearidade ^{[24] [30] [31]}.

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{m} \quad \text{Equação (3)}$$

6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação avalia a menor concentração de analito presente na amostra que pode ser detetado e quantificado com precisão e exatidão. O limite de quantificação é calculado com base na equação (4), em que, à semelhança do cálculo do limite de deteção, o “S” corresponde ao desvio padrão absoluto e o “m” ao declive da reta linear calculados no ensaio de linearidade ^{[24] [30] [31]}.

$$LQ = 10 \times \frac{S}{m} \quad \text{Equação (4)}$$

7. Linearidade

A linearidade expressa a capacidade do método gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, construindo uma reta linear. A reta linear é traçada com um mínimo de cinco concentrações diferentes, correspondentes à diferença entre a maior e a menor concentração de analito presente na amostra. O fator de correlação (R) avalia o grau de linearidade entre os pontos experimentais e este deve encontrar-se próximo de 0,99 de forma a garantir um melhor ajuste dos resultados ^{[24] [30] [31]}.

8. Robustez:

A robustez avalia a sensibilidade do método, face a pequenas e deliberadas variações. Diz-se que o método é robusto, quando este permite pequenas variações, como alterações da composição da fase móvel, alteração da temperatura da coluna, alteração do fluxo e alteração do solvente orgânico na composição da fase móvel e, que não originam resultados muito díspares dos resultados do método original. O ensaio de robustez é, normalmente, avaliado pelo tempo de retenção dos compostos, quando sujeitos a alterações dos parâmetros, e quando comparados com os tempos de retenção do método original ^{[24] [30] [31]}.

9. Adequabilidade do sistema (SST)

O ensaio de adequabilidade do sistema permite avaliar se a resposta do sistema é concordante ao longo da análise. Neste ensaio é avaliada a capacidade de resposta após a análise de sucessivas leituras a amostras com tempos de retenção conhecidos ^{[24] [30] [31]}.

Capítulo 2

*Transferência do método
analítico de HPLC para UPLC*

I. Equipamentos e reagentes

Equipamentos:

- Balança analítica (*Mettler Toledo*);
- Potenciômetro (*Metrohm*);
- Placa de agitação (*Thermo Scientific*);
- UPLC Classe H *Waters* com sistema de bombas quaternárias, forno para a coluna, sistema de injeção autosampler e detetor de fotodíodos PDA UV-Vis;

Reagentes:

- Água purificada obtida através do sistema *Milli Q, Millipore*;
- Acetonitrilo (*VWR*);
- Acetato de sódio tri-hidratado (*Merck*);
- Ácido acético glacial 100% (*Merck*);
- Solução de hidróxido de sódio 1 M²;
- Padrão secundário *Cefuroxima*;
- Amostra *Cefuroxima*.

² Preparação da solução Hidróxido de Sódio 1 M: Pesar 39,9971g de Hidróxido de Sódio (*VWR*) para um balão volumétrico de 1000mL, adicionar água purificada e agitar. Perfazer o restante volume com o mesmo solvente (concentração= 1M).

2. Preparação das amostras

Todas as concentrações de trabalho no desenvolvimento e otimização do método analítico de transferência são concentrações de método de compostos relacionados, pois pretende-se analisar o comportamento de todos os compostos quando sujeitos a concentrações relativamente baixas. Desta forma, analisa-se o pior caso de comportamento dos mesmos.

- (1) Solução padrão de Cefuroxima 1mg/ml: Pesar 20 mg de padrão de *Cefuroxima* para um balão volumétrico de 20 ml com água purificada.

- (2) Solução de amostra de impureza 0,01mg/ml: Preparar uma solução-mãe (C=0,1mg/ml) para cada uma das impurezas individuais: pesar 2mg de impureza para um balão volumétrico de 20mL com água purificada. Diluir 1mL da solução mãe (C=0,1mg/ml) para um balão volumétrico de 10mL com o mesmo solvente.

- (3) Solução mistura impurezas 0,01mg/mL com padrão Cefuroxima 1mg/mL: Pesar 10mg de padrão de *Cefuroxima* para um balão volumétrico de 10mL com água purificada. Pipetar 1mL das soluções mãe de todas as impurezas de C=0,1mg/ml e aferir o restante volume com o mesmo solvente.

3. Condições cromatográficas de HPLC e UPLC

As condições cromatográficas correspondentes ao método original de quantificação da *Cefuroxima* por HPLC e a transferência das mesmas para UPLC encontram-se descritas nas tabelas apresentadas de seguida.

Tabela 4- Condições cromatográficas de HPLC

Parâmetro	Descrição		
Coluna	C ₈ , 150 mm x 4.6mm x 5µm		
Fase móvel A	Dissolver 680 mg de acetato de sódio tri-hidratado e 5,7 ml de ácido acético glacial 100% num balão volumétrico de 1000mL com água purificada. Ajustar o pH a 3.5 com solução de hidróxido de sódio 1M.		
Fase móvel B	Acetonitrilo		
Volume de injeção	10µL		
Fluxo	1.5 ml/min		
Detetor PDA UV- Vis	λ=273 nm		
Temperatura das amostras	8° C		
Temperatura da coluna	35° C		
Gradiente	Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	0	93	7
	5	93	7
	9	88	12
	18	88	12
	20	80	20
	25	80	20
	32	60	40
	33	93	7
40	93	7	

Tabela 5- Condições cromatográficas iniciais de UPLC para transferência analítica

Parâmetro	Descrição		
Coluna	Cortecs C ₁₈ , 100mm x 2.1mm x 1.6µm		
Fase móvel A	Dissolver 680 mg de acetato de sódio tri-hidratado e 5,7 ml de ácido acético glacial 100% num balão volumétrico de 1000mL com água purificada. Ajustar o pH a 3.2 com ácido acético glacial 100%.		
Fase móvel B	Acetonitrilo		
Volume de injeção	1.4µL		
Fluxo	0.919 ml/ min		
Detetor PDA UV-Vis	λ=273 nm		
Temperatura das amostras	8° C		
Temperatura da coluna	35° C		
Gradiente	Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	0	93	7
	1.13	93	7
	2.04	88	12
	4.08	88	12
	4.53	80	20
	5.67	80	20
	7.25	60	40
	7.48	93	7
9.07	93	7	

Tabela 6- Condições cromatográficas finais de UPLC para transferência analítica

Parâmetro	Descrição		
Coluna	BEH C ₈ , 100mm x 2.1mm, 1.7µm		
Fase móvel A	Dissolver 680 mg de acetato de sódio tri-hidratado e 5,7 ml de ácido acético glacial 100% num balão volumétrico de 1000mL com água purificada. Ajustar o pH a 3.2 com ácido acético glacial 100%.		
Fase móvel B	Acetonitrilo		
Volume de injeção	1µL		
Fluxo	0.5 ml/ min		
Detetor PDA UV-Vis	λ=273 nm		
Temperatura das amostras	8° C		
Temperatura da coluna	35° C		
Gradiente	Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	0	93	7
	1.53	93	7
	3.20	88	12
	6.95	88	12
	7.79	80	20
	9.87	80	20
	12.79	60	40
	13.21	93	7
16.12	93	7	

4. Resultados e discussão

A transferência de um método analítico é um processo complexo e cujo propósito é assegurar que o novo método ou o novo laboratório garantem os critérios exigidos à implementação de um método analítico para fins de controlo do desenvolvimento ou da qualidade de um medicamento ^[30].

O principal objetivo deste projeto de mestrado é transferir um método analítico de quantificação de *Cefuroxima*, já existente em HPLC, para um novo método de análise, baseado em UPLC. Este projeto é extremamente importante, pois a análise e quantificação em UPLC traz inúmeras vantagens no âmbito laboratorial, como já foi referido no capítulo anterior.

Existem diversos fatores a ter em conta quando se inicia um processo de transferência analítica, tais como a escolha das condições cromatográficas, de que se destacam a coluna cromatográfica e as fases móveis.

O primeiro fator a ter em consideração é a característica da molécula que se pretende avaliar e quantificar. Dos diferentes aspetos a considerar salientam-se o seu peso molecular, a sua solubilidade, a sua polaridade e o seu pH, para que seja selecionada uma fase móvel e uma fase estacionária o mais adequadamente possível.

No que diz respeito ao peso molecular da molécula, a *Cefuroxima* possui um peso molecular de 446,4 g/mol, ou seja, é considerada uma molécula pequena. Esta consegue estabelecer ligações de hidrogénio com a água e, por isso, é considerado um composto polar. Relativamente ao seu pH, em solução, esta apresenta um pH próximo de 7, sendo considerado um composto neutro.

O segundo fator a ter em consideração é a escolha da fase estacionária que melhor se adequa à molécula farmacêutica em estudo. Desta forma, é crucial avaliar a química da coluna, o tamanho das partículas esféricas, o método de separação cromatográfico e o fator de capacidade do composto, que irá ser definido no parágrafo seguinte.

As colunas cromatográficas são normalmente constituídas por partículas porosas revestidas com um material que interage com a amostra. Tal como já foi referido no capítulo anterior, existem diversas colunas com diferentes tipos de revestimento. O tipo de revestimento mais frequentemente utilizado na indústria farmacêutica são as partículas de sílica quimicamente modificadas, pois permitem separar eficazmente moléculas relativamente mais pequenas.

Assim, para moléculas mais pequenas, seleciona-se uma coluna mais densa, com partículas mais pequenas e com um espaço entre elas relativamente menores, comparativamente à análise de moléculas maiores. Uma vez que as operações de análise em UPLC comprometem pressões mais elevadas e a *Cefuroxima* é uma molécula pequena, a seleção do tamanho das partículas que constituem a fase estacionária, tem de reverter para partículas com diâmetro inferior, C_8 e C_{18} , para que haja uma correta separação dos componentes do produto em questão.

O método de separação é um a fator a ter em consideração, pois de acordo com a polaridade da molécula, é possível definir o tipo de separação que pode ser aplicado. Uma vez que a *Cefuroxima* é um composto polar, a fase móvel terá que ser mais polar que a fase estacionária, ou seja, operar em fase reversa.

Para que os compostos sejam separados e quantificados, estes têm que ser retidos na coluna cromatográfica. A retenção dos compostos, na fase estacionária, é descrita através do fator de capacidade. O fator de capacidade de uma molécula (κ) corresponde à quantidade de tempo, t_R , que essa molécula demora a atravessar a fase estacionária. Uma vez que o tempo de retenção de um composto é diretamente proporcional ao fator de capacidade, pode-se afirmar que, os compostos que são fortemente retidos pela fase estacionária, t_R elevados, possuem um maior valor de κ . A escolha da coluna vai, então, ser influenciada pelo fator de capacidade do produto, *Cefuroxima* [22].

O último ponto a considerar em estudos analíticos é a escolha das fases móveis.

A seleção das fases móveis é feita com base no método de separação e na polaridade da partícula. Uma vez que para a *Cefuroxima* o tipo de separação aplicado é a separação por cromatografia de fase reversa e o composto é polar, as fases móveis têm que ter uma polaridade muito superior à fase estacionária. Selecionou-se, então, uma fase móvel A correspondente a uma solução tampão, constituída por água purificada, ácido acético e por um sal, o acetato de sódio tri-hidratado, cuja principal função é manter o pH da solução constante.

Por outro lado, a fase móvel B, o acetonitrilo, é um solvente orgânico forte. É amplamente utilizado em cromatografia líquida, pois a sua ação é suficientemente forte para dessorver os compostos retidos na fase estacionária [20].

Ambas as fases móveis, solução tampão constituída por água, e o acetonitrilo são dotados de uma polaridade elevada e, por conseguinte, vão ser capazes de estabelecer uma ligação polar

com a *Cefuroxima*, que vai permitir que ocorra a separação dos compostos quando atravessam a fase estacionária, que é menos polar.

Neste projeto de transferência analítica utilizou-se, como referência, a coluna cromatográfica e as fases móveis utilizadas no método de HPLC.

Após uma breve abordagem à escolha da coluna cromatográfica e das fases móveis para o processo de transferência, iniciou-se o processo de testes de método em UPLC.

Para todos os testes realizados ao longo da transferência analítica, em todos os métodos testados, foram injetadas individualmente cada uma das soluções (1), (2) e (3). A solução (1) e (2) serviram de confirmação dos tempos de retenção do princípio ativo e de todas as impurezas individuais. Já a solução (3) permitiu avaliar o comportamento das mesmas, quando presentes numa mistura.

As condições cromatográficas de operação que são utilizadas pelo método de HPLC para o produto em análise estão sintetizadas na Tabela 4. As condições sugeridas e, que vão ser devidamente detalhadas ao longo deste subcapítulo, encontram-se descritas nas Tabela 5 e Tabela 6.

Para iniciar o projeto de transferência analítica, procedeu-se à escolha de uma coluna cujas características fossem semelhantes à já utilizada em HPLC, C_8 , 150mm x 4.6mm x 5 μ m. Desta forma, foi selecionada uma coluna de UPLC inovadora, lançada recentemente no mercado e com um elevado potencial de separação, *Cortecs C₁₈ 100mm x 2.1mm x 1.6 μ m*. Após a escolha da coluna simulou-se, no *Acquity UPLC Calculator*, as condições cromatográficas para a transferência de UPLC (Anexo I, Figura 9).

Por conseguinte, as condições iniciais sugeridas eram o tempo de análise cromatográfica total de 9.07 minutos, com o mesmo gradiente que opera em HPLC, fluxo de 0.919 ml/min, volume de injeção de 1.4 μ l e temperatura da coluna e das amostras iguais às de HPLC, 35° e 8° respetivamente.

Numa primeira abordagem às condições cromatográficas sugeridas pelo *Acquity UPLC Calculator*, verificou-se que o volume de injeção de 1 μ L era suficiente para obter níveis aceitáveis de absorção e deteção dos compostos. Outro parâmetro que foi alterado foi o fluxo de trabalho. Tinha sido sugerido a utilização de um fluxo de trabalho de 0.919 ml/min. Contudo, com esse fluxo, a pressão era demasiado elevada e não permitia a operação no

equipamento. Desta forma, estabeleceu-se um valor inferior de fluxo, de 0.6 ml/min, que permitiu a obtenção de uma pressão já suportada pelo equipamento.

Os testes às condições cromatográficas e, que serão descritas nos parágrafos seguintes, encontram-se esquematizados no Anexo I, Tabela 10.

Definiu-se, para testes de transferência analítica, as concentrações de trabalho correspondentes ao método de compostos relacionados, pois pretendeu-se avaliar qual o comportamento do princípio ativo e de todos os compostos relacionados, quando presentes em concentrações relativamente baixas numa mistura.

Na primeira análise às condições cromatográficas verificou-se que existia uma sobreposição do tempo de retenção das impurezas E e C quando juntas na mistura. Desta forma, variou-se o parâmetro fluxo, em 0.6 ml/min e 0.5 ml/min (Método 1, Tabela 10), para avaliar se, com esta alteração, haveria separação entre elas. Contudo, os resultados demonstraram que, para o fluxo a 0.6ml/min, os tempos de retenção das impurezas C e E eram, respetivamente, 4,5500 minutos e 4,5090 minutos e para o fluxo a 0.5ml/min, os tempos de retenção eram de 5,2332 e 5,2341 respetivamente. Por análise dos resultados obtidos, verificamos que, com o fluxo a 0.6ml/min, a impureza E é detetada mais cedo que a impureza C. Já com o fluxo a 0.5ml/min, a ordem das impurezas altera-se e, a impureza C passa a ser detetada mais cedo que a impureza E. Apesar disso, a sobreposição das impurezas continuou a prevalecer.

Numa segunda análise (Método 2, Tabela 10), estabeleceu-se a temperatura da coluna a 30°C e avaliou-se se, com esta temperatura e variando o fluxo para 0.6 ml/min e 0.5 ml/min, haveria alguma separação das impurezas que se apresentavam como críticas. Os tempos de retenção das impurezas C e E com o fluxo de 0.6 ml/min eram, respetivamente, 4,6513 minutos e 4,6924 minutos, e para o fluxo de 0.5ml/min era de 5,3667 minutos e 5,3791 minutos, respetivamente. Para ambas as condições, a ordem de deteção das impurezas foi mantida, verificando-se uma deteção mais precoce da impureza C relativamente à impureza E. Uma vez que, com estas condições, as impurezas apresentavam uma sobreposição, houve necessidade de se proceder a novos testes.

Uma terceira análise às condições cromatográficas foi realizada (Método 3, Tabela 10). De acordo com o manual de uso da coluna *Cortecs*, as temperaturas aconselháveis de operação da mesma eram na gama entre os 20 e os 45°C. Desta forma, manteve-se o fluxo de trabalho a 0.5ml/min e apenas se alterou a temperatura da coluna dentro dos seus limites. No ensaio da temperatura da coluna a 25°C, o equipamento não conseguiu atingir níveis de temperatura

abaixo dos 30°C e, desta forma, descartou-se a hipótese de testar temperaturas mais baixas. No ensaio da temperatura da coluna a 40°C começou-se a verificar que os tempos de retenção das impurezas, que antes apresentavam o mesmo valor, passaram a obter valores de separação visíveis. A impureza C apresentou um tempo de retenção de 3,8580 minutos e a impureza E apresentou um tempo de retenção de 3,7170 minutos. Por análise dos resultados obtidos, constatou-se que, com a temperatura mais elevada, a ordem de detecção das impurezas variou, passando a ser detetada a impureza E mais precocemente que a impureza C. Contudo, embora a separação das impurezas se tenha tornado mais visível, estas não apresentaram uma resolução, entre si, dentro dos limites aceitável (≥ 1.5).

Numa quarta análise às condições cromatográficas (Método 4, Tabela 10) estabeleceu-se um fluxo de trabalho de 0.4 ml/min, com uma temperatura de coluna de 45°C e alterou-se a proporção das fases móveis (%fase móvel A e % fase móvel B) durante a análise. Esta variação não se demonstrou favorável na separação das impurezas que, apesar de apresentarem tempos de retenção diferentes, 5,1670 minutos para a impureza C e 5,0860 minutos para a impureza E, a resolução entre elas não se encontrava de acordo com os limites de resolução especificados.

Numa quinta análise às condições cromatográficas (Método 5, Tabela 10) estabeleceram-se as mesmas condições que no teste anterior, com a exceção do fluxo que passou a ser 0.5 ml/min. Após a obtenção dos resultados, sob as condições cromatográficas definidas neste teste, verificou-se que os tempos de retenção das impurezas C e E, 4,2480 minutos e 4,1810 minutos respetivamente, ainda não apresentavam uma resolução aceitável. Para além disso, existiu ainda um problema acrescido, pois as impurezas B e H, cujos seus tempos de retenção foram de 4,7570 minutos e 4,8480 minutos, passaram a apresentar resoluções muito inferiores ($\leq 1,5$) às apresentadas até ao presente ensaio.

Após a realização de 5 ensaios, todos eles sem sucesso relativamente à separação de impurezas, iniciou-se uma nova análise (Método 6, Tabela 10). Nesta sexta análise retomou-se o gradiente do método inicial, variando apenas o tempo de corrida, que passou de um total de 9,07 minutos para 8,77 minutos. Os resultados do cromatograma (Anexo I, Figura 10) demonstraram que os tempos de retenção para as impurezas C e E foram de 4,8460 minutos e 4,6870 minutos e para as impurezas B e H foram de 5,3110 minutos e 7,0020 minutos, respetivamente. Da análise aos resultados obtidos, verificou-se que as impurezas se

encontravam todas separadas, com uma resolução dentro dos limites especificados, inclusive a resolução entre as impurezas C e E, apresentando uma resolução “border line” de 1,55.

Mediante sucessivos ensaios, estabeleceu-se um método em que as condições cromatográficas se adequavam à separação do princípio ativo e de todas as impurezas a ele associado, com níveis de resolução dentro dos limites especificados (Método 6, Tabela 10). Contudo, questionou-se que, em análises de rotina de controlo laboratorial do produto por UPLC, o “border line” correspondente à resolução entre as impurezas C e E poderia ficar comprometida.

Desta forma, atualizou-se a versão do *Acquity UPLC Calculator*, ajustou-se o fluxo de trabalho que tinha sido definido (0.5ml/min) e, mediante esse ajuste, o *Acquity UPLC Calculator* sugeriu novas condições cromatográficas, que se encontram descritas no Anexo I, Figura 11.

Já com as novas condições cromatográficas definidas, iniciaram-se novos testes com a coluna *Cortecs*. Em simultâneo, realizaram-se os mesmos testes numa outra coluna que já era conhecida pelos analistas da empresa, *BEH C₈ 100mm x 2.1mm x 1.7µm* e sujeitaram-se as duas colunas às mesmas condições cromatográficas, no mesmo intervalo de tempo, em equipamentos separados. A coluna *BEH* distingue-se da coluna *Cortecs* no que refere ao empacotamento da coluna cromatográfica. Ambas são constituídas por sílica quimicamente modificada, C₈ ou *n*-octil para a coluna *BEH* e C₁₈ ou *n*-octadecil para a coluna *Cortecs*, diferem essencialmente no tamanho das partículas da mesma. Uma vez que a molécula em estudo possui um tamanho molecular pequeno e, como as colunas com uma constituição C₈ são mais adequadas a separações de moléculas mais pequenas, e tal como foi comprovado no método de HPLC para este produto, decidiu-se reverter os estudos de transferência para uma coluna C₈. Após a análise dos resultados obtidos com as duas colunas, verificou-se que, nestas novas condições, as impurezas C e E deixaram de ser críticas na separação quando colocadas na mesma mistura, passando a ser a F e a H, as impurezas que requeriam uma análise mais detalhada. Da observação dos cromatogramas obtidos, concluiu-se que a coluna *BEH*, nestas condições cromatográficas, apresentava uma resolução entre as impurezas F e H de 3,3 (Anexo I, Figura 12), enquanto a coluna *Cortecs* apresentava uma resolução de 1,9 para as mesmas impurezas (Anexo I, Figura 13). Uma vez que todas as outras impurezas cumpriam o limite de resolução especificado, foi com base na resolução entre as impurezas F e H que se escolheu a coluna *BEH* para proceder à validação do método analítico.

Contudo, verificou-se que, após a análise comparativa das condições cromatográficas com as duas colunas, *Cortecs* e *BEH*, a temperatura do laboratório se encontrava fora dos limites especificados, registrando um valor incorreto de pH. Depois de uma leitura posterior do pH da fase móvel A, verificou-se que este se encontrava a 3.2 e não a 3.5 como era especificado pelo método. Não obstante, esta leitura incorreta de pH tinha registado os melhores resultados de transferência analítica executados até ao momento. Assim, foi notório que o registo incorreto de pH despertou uma alteração positiva numa variante que não tinha sido analisada até então.

Desta forma, encontravam-se reunidas todas as condições para proceder à validação do método de doseamento e de compostos relacionados por UPLC. Criou-se a necessidade de validação de dois métodos de quantificação distintos, pois o método de doseamento do princípio ativo não necessitava de tempos de corrida de 16.12 minutos, uma vez que o pico do ativo saía com um tempo de retenção de cerca de 2 minutos e a operação poderia ser em modo isocrático ao invés de gradiente. Após a realização de testes que comprovassem que o método de doseamento do princípio ativo era capaz de detetar e quantificar a *Cefuroxima*, definiram-se condições cromatográficas com operação em modo isocrático e com tempos de corrida de 5 minutos.

Capítulo 3

*Validação do método analítico de
doseamento do princípio ativo por UPLC*

I. Equipamentos e reagentes:

Equipamentos:

- Balança analítica (*Mettler Toledo*);
- Potenciómetro (*Metrohm*);
- Placa de agitação (*Thermo Scientific*);
- UPLC Classe H *Waters* com bomba quaternária, forno para a coluna, injeção em autosampler, detetor de fotodiodos PDA UV-Vis;
- UPLC *Waters* com bomba binária, forno para a coluna, injeção em autosampler, detetor de fotodiodos PDA UV-Vis;

Reagentes:

- Acetonitrilo (*VWR*);
- Ácido acético glacial 100% (*Merck*);
- Acetato de sódio tri-hidratado (*Merck*);
- Água purificada obtida através do sistema *Milli Q, Millipore*;
- Padrão secundário de *Cefuroxima*;
- Amostra de *Cefuroxima*.

I. Preparação das amostras

(1) Solução padrão de Cefuroxima 0,1mg/ml: Pesar 2 mg de padrão de Cefuroxima para um balão volumétrico de 20 ml com água purificada.

(2) Solução de amostra de Cefuroxima 0,1mg/ml: Pesar 2mg de amostra para um balão volumétrico de 20mL com água purificada.

2. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para a validação do método de doseamento do princípio ativo por UPLC encontram-se descritas na tabela seguinte.

Tabela 7- Condições cromatográficas de validação do método de doseamento do princípio ativo por UPLC

Parâmetro	Descrição		
Coluna	BEH C ₈ , 100mm x 2.1mm x 1.7µm		
Fase móvel A	Dissolver 680 mg de acetato de sódio tri-hidratado e 5,7 ml de ácido acético glacial 100% num balão volumétrico de 1000mL com água purificada. Ajustar o pH a 3.2 com ácido acético glacial 100%.		
Fase móvel B	Acetonitrilo		
Volume de injeção	1 µL		
Fluxo	0.5 ml/ min		
Detetor PDA UV- Vis	λ=273 nm		
Temperatura das amostras	8° C		
Temperatura da coluna	35° C		
Concentração de trabalho	0.1 mg/ml		
Gradiente	Tempo análise (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	5	88	12

3. Procedimento de validação

a) **Ensaio de adequabilidade de sistema**

Injetar 6 vezes a solução (1).

O RSD entre as 6 injeções deve ser $\leq 2,0\%$.

b) **Linearidade**

Preparação de soluções padrão de *Cefuroxima* com concentrações de 50, 80, 100, 120 e 150%. Injetar cada solução 3 vezes.

O fator de correlação (R) deve ser $\geq 0,99$.

c) **Estabilidade de amostra e do padrão**

Injetar as soluções (1) e (2), durante um período de tempo correspondente às seguintes situações: $t=0h$ (imediatamente após a preparação), $t=12h$ e $t=24h$.

O padrão e a amostra são estáveis se o RSD entre as áreas do princípio ativo, nos três tempos de análise, for inferior a 2,5%.

d) **Precisão:**

i) **Repetibilidade instrumental**

Injetar 10 vezes a solução (1).

O RSD entre as áreas deve ser inferior a 1,0%

ii) Precisão intermédia

Analisar uma amostra homogénea de *Cefuroxima* (solução (2)), fazendo 6 preparações distintas dessa amostra. Outro analista executa a mesma análise com o mesmo número de amostras num equipamento diferente, em dias diferentes.

Determinar a média e o RSD entre as amostras para cada analista, que não deve ser superior a 2,0%.

O RSD dos resultados entre os dois analistas não deve ser superior a 2,5%.

e) Seletividade

Injetar a fase móvel A, fase móvel B, solvente, solução (1) e solução (2).

Não deve existir nenhum composto com o mesmo tempo de retenção que o do princípio ativo, de forma a não comprometer o seu comportamento e o seu tempo de retenção em solução.

f) Exatidão

Preparar soluções padrão a níveis de 80%, 100% e 120%. Para cada nível, preparar 3 amostras distintas.

A percentagem de recuperação deve estar entre 98,0% e 102,0%.

g) Robustez

i) Varição do pH da fase móvel A (pH=3,2 ±0,2)

Variar o valor de pH da fase móvel A para 3,0 e 3,4 (3,2±0,2) e injetar, nestas condições, a solução (I).

Avaliar a influência da variação de pH da fase móvel no tempo de retenção do composto ativo quando comparado com as condições do método original.

ii) Varição da temperatura da coluna (T= 35 ±5°C)

Variar a temperatura da coluna para 30°C e 40°C (35°C±5°C) e injetar, nestas condições, a solução (I).

Avaliar a influência da temperatura da coluna no tempo de retenção do composto ativo quando comparado com as condições do método original.

iii) Varição do fluxo de trabalho (Fluxo= 0,5±0,1 ml/min)

Variar o fluxo de trabalho para 0,4ml/min e 0,6ml/min (0,5ml/min ±20%) e injetar, nestas condições, a solução (I).

Avaliar a influência do fluxo no tempo de retenção do composto ativo quando comparado com as condições do método original.

4. Resultados e discussão

A validação de um método analítico tem o propósito de demonstrar que o método é adequado ao fim a que se destina. Para validar um método analítico de doseamento do princípio ativo, é essencial que sejam avaliados alguns parâmetros, tais como o ensaio de adequabilidade do sistema, a linearidade, a estabilidade da amostra e do padrão, a precisão, a seletividade, a exatidão e a robustez do método.

O ensaio de adequabilidade do sistema (SST) é um parâmetro de validação que é estabelecido de forma a assegurar que a resposta do sistema e do método analítico são mantidos ao longo de toda a análise cromatográfica. Desta forma, e segundo o critério interno laboratorial para validação do ensaio de SST, preparou-se um padrão de *Cefuroxima* com $C=0,1\text{mg/ml}$ e procedeu-se à sua leitura por seis vezes. Os resultados das seis leituras encontram-se descritos no Anexo II, Tabela 11. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que o RSD entre as seis leituras do padrão de *Cefuroxima* é de 0,1%. Uma vez que o limite especificado para este parâmetro era que este fosse inferior a 2,0%, verificou-se que o valor obtido cumpre os critérios de validação estabelecidos para o parâmetro de adequabilidade do sistema. Assim, pode-se afirmar que, quer o sistema, quer o método analítico têm a capacidade de quantificar corretamente o princípio ativo ao longo de toda a análise.

O ensaio de linearidade expressa a capacidade do método gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, construindo uma reta linear. Esta reta linear é calculada com base na concentração inferior e superior do analito presente na amostra. De acordo com a “*ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*” e com o critério interno de validação analítica da empresa, as concentrações definidas para cálculo da reta linear são de 50, 80, 100, 120 e 150%. Desta forma, prepararam-se amostras com as cinco concentrações e procedeu-se a três leituras para cada uma delas. Os resultados das áreas obtidas encontram-se descritos no Anexo II, Tabela 12. Com base na média das áreas obtidas com as concentrações definidas, delineou-se uma reta (Anexo II, Figura 14) com a seguinte equação: $y=5196,8727x - 6636,2621$, em que o fator de correlação (R) é de 0,9999. Uma vez que o critério de aceitação para a validação da linearidade era que o fator de correlação (R) apresentasse um valor superior a 0,99, verificou-se que o valor obtido cumpre os critérios de validação estabelecidos para o parâmetro de linearidade.

O ensaio de estabilidade da amostra e do padrão assegura que, quer a amostra quer o padrão, são estáveis durante um certo intervalo de tempo. Uma vez que, nas análises quantitativas em UPLC, o tempo de análise é substancialmente inferior ao tempo de análise em HPLC e, desta forma, com o mesmo tempo que seria gasto para a quantificação em HPLC pode-se analisar um maior número de amostras em UPLC, estabeleceu-se, para este parâmetro que, a estabilidade da amostra e do padrão deveria ser analisada até às 24h. Por conseguinte, realizou-se uma leitura do padrão e da amostra com concentração de 0,1 mg/ml nos tempos 0h (imediatamente após a preparação), 12h e 24h. Por análise dos resultados obtidos para este parâmetro de validação (Anexo II, Tabela 13) verificou-se que o RSD entre as três leituras nos três tempos é de 0,4% para o padrão e de 0,3% para a amostra. Uma vez que a estabilidade é definida com base no RSD, e este teria que ser inferior a 2,5% para garantir estabilidade, pode-se afirmar que, até às 24h, é garantida a estabilidade quer da amostra, quer do padrão.

O ensaio de precisão é designado como o coeficiente de variação de medições sucessivas da mesma amostra homogénea. A precisão é avaliada sob dois tipos de ensaios, a repetibilidade instrumental e a precisão intermédia.

A repetibilidade instrumental avalia a precisão da leitura, sob as mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes e dias) durante um certo intervalo de tempo. Desta forma, procedeu-se a uma leitura sucessiva do padrão de *Cefuroxima* e o RSD dos resultados dessa leitura tem que ser mínimo ($\leq 1,0\%$), para que a resposta do equipamento seja declarada como precisa, ao longo da análise. Assim, garante-se que o valor do padrão, que está a ser fornecido pelo equipamento, é preciso ao longo de todas as leituras. De acordo com a “*ICH-Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*” é estabelecido o mínimo de 6 leituras de uma concentração teste a 100%. Contudo, o procedimento interno da empresa estabelece a injeção de 10 vezes o padrão. Uma vez que a concentração de trabalho na validação do método de doseamento da *Cefuroxima* é de 0,1 mg/ml, estabeleceu-se que o padrão, com esta concentração, devia ser lido por 10 vezes. Após as 10 leituras sucessivas (Anexo II, Tabela 14), sob as condições cromatográficas estabelecidas, verificou-se que o RSD entre elas foi de 0,2%. Uma vez que o limite estabelecido para este parâmetro era de 1,0% e o resultado obtido é inferior ao limite especificado, pode-se afirmar que, sob as mesmas condições cromatográficas, o método é preciso.

A precisão intermédia avalia a precisão após a aplicação de alterações na execução do método analítico, dentro do mesmo laboratório, como a manipulação por diferentes analistas e a utilização de equipamentos diferentes, em dias distintos. Segundo a “USP 1225- Validation of Compendial Procedures”, este parâmetro deve ser avaliado através do ensaio de um número suficiente de amostras homogéneas que permita o cálculo estatístico do desvio padrão relativo (RSD) entre elas e entre analistas. Desta forma, para a validação deste parâmetro estabeleceu-se a preparação de 6 amostras homogéneas individuais, com as concentrações de trabalho definidas, para diferentes analistas, procedendo à leitura em diferentes dias e em diferentes equipamentos, no mesmo laboratório. O analista 1 procedeu à preparação de 6 amostras homogéneas da solução (2) e realizou a sua leitura num equipamento de UPLC Classe H. Num dia diferente à leitura do analista 1, o analista 2 procedeu à preparação de 6 novas amostras (solução (2)) e a sua leitura foi realizada num equipamento UPLC de bombas binárias. Os resultados obtidos dos dois analistas estão registados no Anexo II, Tabela 15. Por análise dos mesmos, verificou-se que o RSD entre as seis leituras do analista 1 era de 0,3% e do analista 2 era de 0,4%. Uma vez que o limite especificado para este parâmetro era o seu valor ser inferior a 2,0%, conclui-se que há precisão entre as seis leituras de cada analista. No que diz respeito à comparação dos resultados das leituras entre os dois analistas, verifica-se que o RSD entre eles é de 0,3%. Uma vez que o limite especificado, para a validação deste parâmetro, seria um valor máximo de 2,5%, pode-se concluir que a precisão entre analistas, através deste método analítico, é garantida.

Como conclusão do ensaio de precisão, pode-se afirmar que existe uma proximidade entre os valores obtidos por múltiplas análises a amostras homogéneas, quer pelo mesmo analista sob as mesmas condições, quer por analistas distintos, com condições de manipulação diferentes. O método analítico é, então, preciso.

A seletividade avalia a capacidade de o método detetar o analito de interesse, neste caso, o princípio ativo. Este ensaio permite excluir a presença de qualquer analito, com o mesmo tempo de retenção do princípio ativo, e que comprometa o seu comportamento e o seu tempo de retenção numa amostra complexa. Para análise deste parâmetro, procedeu-se à leitura de uma injeção a um vial contendo fase móvel A, outro de fase móvel B, outro de solvente, outro contendo a solução (1) e outro contendo a solução (2). Após a leitura das soluções, verificou-se que o tempo de retenção correspondente à *Cefuroxima*, presente na amostra (solução (2)), era de 1,9520 minutos (Anexo II, Figura 15). Na leitura do padrão (solução (1)), o tempo de retenção da *Cefuroxima* era, à semelhança do tempo de retenção do

princípio ativo na amostra, de 1,9520 minutos (Anexo II, Figura 16) e não foi registado qualquer pico com tempo de retenção igual ao do princípio ativo, nas soluções de fase móvel A (Anexo II, Figura 17), fase móvel B (Anexo II, Figura 18) e solvente (Anexo II, Figura 19). Desta forma, conclui-se que não existe qualquer composto com o mesmo tempo de retenção que o princípio ativo, que comprometa o seu comportamento e o seu tempo de retenção, em solução.

A exatidão de um processo analítico corresponde à proximidade do valor quantificado em relação ao valor teórico de referência. A exatidão mede o erro associado à proximidade de resultados e é expressa através da percentagem de recuperação. A percentagem de recuperação é definida como a quantidade de substância existente numa amostra que é extraída e possível de ser quantificada. De acordo com a “*ICH-Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”, o cálculo da exatidão deve-se basear na determinação de três leituras a três concentrações diferentes. Para a validação deste parâmetro, prepararam-se, então, três amostras de padrão para três níveis de concentrações de 80%, 100% e 120%. Da análise dos resultados obtidos (Anexo II, Tabela 16) conclui-se que, nas três concentrações analisadas, a quantidade recuperada (razão entre a quantidade de amostra lida e a quantidade de amostra pesada) é cerca de 100% e o RSD entre elas é de 0,4%. Desta forma, pode-se concluir que não há discrepâncias entre as quantidades pesadas e lidas e, por isso, a quantidade de substância presente numa amostra que é extraída e possível de ser quantificada é de cerca de 100%.

O último parâmetro de validação de um método analítico de doseamento do princípio ativo é o ensaio de robustez. O ensaio de robustez avalia a capacidade de o padrão se manter estável, após variações deliberadas a alguns parâmetros do método analítico. Desta forma, assegura-se que o método em estudo é robusto, independentemente das alterações a que se sujeita o sistema. As variações que podem ser aplicadas aos parâmetros do método analítico encontram-se descritas na “*ICH-Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”. Para operações em cromatografia líquida, as variações podem ser avaliadas pela influência de variações de pH da fase móvel, variações da composição da fase móvel, utilização de diferentes colunas, variações de temperatura e variações de fluxo.

Para a validação do ensaio de robustez, e conforme descrito na “*ICH-Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”, estabeleceram-se variações a três parâmetros do método analítico: variação do pH da fase móvel A, variação da temperatura da coluna e

variação do fluxo de trabalho. Uma vez que, na validação do doseamento apenas se analisa o princípio ativo, a resolução não é relevante para estudos de robustez, contrariamente ao que acontece na validação do método de CR's por UPLC.

Para análise da variação do pH da fase móvel no ensaio de robustez, procedeu-se à preparação de duas fases móveis A, uma com pH a 3,0 e outra com pH a 3,4 e analisou-se o padrão de *Cefuroxima* (solução (I)). A alteração do pH da fase móvel vai afetar os tempos de retenção do princípio ativo. Perante os resultados obtidos (Anexo II, Tabela 17), verificou-se que na fase móvel A com pH 3,4, a *Cefuroxima* é detentora de um tempo de retenção de 1,903 minutos, enquanto que com pH 3,0 esse tempo de retenção obtém valores de 2,023 minutos. Assim sendo, é notório que a variação do pH da fase móvel para níveis mais básicos, desencadeia o processo de dessorção dos compostos, associados à fase estacionária, mais rapidamente do que com pH com níveis mais ácidos.

A outra variação aplicada ao método cromatográfico foi a alteração da temperatura da coluna. Para analisar este parâmetro, procedeu-se à leitura do padrão de *Cefuroxima* (solução (I)) quando a coluna é sujeita a temperaturas de 30°C e 40°C. A alteração da temperatura vai influenciar a viscosidade da fase móvel e, conseqüentemente, os tempos de retenção do princípio ativo [19]. Perante os resultados obtidos (Anexo II, Tabela 18), verificou-se que, quando a coluna é sujeita a temperaturas mais elevadas, a viscosidade da fase móvel diminui, passando mais fluentemente pela coluna cromatográfica e, por consequência, o princípio ativo percorre-a a uma velocidade mais elevada. Desta forma, a temperaturas mais elevadas, o tempo de retenção do princípio ativo é de 1,925 minutos, mais reduzido do que quando é aplicada à coluna, a temperatura do método original. Por outro lado, quando são aplicadas temperaturas mais baixas à coluna cromatográfica, a viscosidade da fase móvel que a percorre aumenta e, conseqüentemente, o tempo de retenção do princípio ativo também aumenta para 2,048 minutos. Como termo de conclusão, a temperatura que é aplicada à coluna cromatográfica vai influenciar a viscosidade da fase móvel que a percorre e, conseqüentemente, o tempo de retenção do princípio ativo que se pretende quantificar.

A última variação aplicada ao método cromatográfico foi a variação do fluxo de trabalho. Desta forma, procedeu-se à leitura do padrão de *Cefuroxima* (solução (I)) a um fluxo de 0.4 ml/min e de 0.6 ml/min. O fluxo corresponde à quantidade de amostra que passa por uma coluna cromatográfica num certo intervalo de tempo. A variação do fluxo é diretamente proporcional à pressão que tem que ser aplicada no sistema. Por isso, quando se aumenta o fluxo, a pressão

que tem que ser aplicada ao sistema é muito maior, logo a amostra vai passar através do detetor mais cedo do que quando se aplica as condições de fluxo do método original. Segundo o que foi referido anteriormente e com base nos resultados obtidos (Anexo II, Tabela 19), quando o fluxo de trabalho aplicado é de 0.6 ml/min, a pressão aumenta e, desta forma, a amostra percorre a coluna cromatográfica com um menor tempo de retenção, 1,670 minutos. Quando o fluxo de trabalho aplicado é 0.4ml/min, a pressão diminui comparativamente ao método original e, desta forma, a amostra percorre a coluna cromatográfica com um maior tempo de retenção, 2,462 minutos.

Perante os resultados obtidos, conclui-se que, apesar das variações que possam ser aplicadas aos parâmetros do método analítico, a sua capacidade de resposta, embora que significativa, não apresentou uma variação consideravelmente grande. Assim, assegura-se que o método é robusto.

Por análise dos parâmetros de validação definidos para o método de doseamento da *Cefuroxima* em UPLC, pode-se afirmar que o método é preciso, seletivo, exato e robusto, que o padrão e a amostra são estáveis por 24h e que a resposta do sistema é concordante ao longo de toda a análise.

Desta forma, ficou por concluída a validação do método de doseamento da *Cefuroxima* por UPLC. Após a validação do método analítico, este tem que ser sujeito às entidades reguladoras (INFARMED, no caso de Portugal), para que este seja aprovado e posteriormente utilizado pelo laboratório de controlo da qualidade de uma indústria farmacêutica. ^[31] ^[24]

Capítulo 4

*Validação do método analítico de
quantificação de compostos relacionados
por UPLC*

I. Equipamentos e reagentes:

Equipamentos:

- Balança analítica (*Mettler Toledo*);
- Potenciômetro (*Metrohm*);
- Placa de agitação (*Thermo Scientific*);
- UPLC Classe H *Waters* com bomba quaternária, forno para a coluna, injeção em autosampler, detetor de fotodiodos PDA UV-Vis;
- UPLC *Waters* com bomba binária, forno para a coluna, injeção em autosampler, detetor de fotodiodos PDA UV-Vis;

Reagentes:

- Acetonitrilo (*VWR*);
- Ácido acético glacial 100% (*Merck*);
- Acetato de sódio tri-hidratado (*Merck*);
- Água purificada obtida através do sistema *Milli Q, Millipore*;
- Padrão secundário de *Cefuroxima*;
- Impureza A de *Cefuroxima* da *EP*;
- Impureza B de *Cefuroxima* da *EP*;
- Impureza C de *Cefuroxima* da *EP*;
- Impureza E de *Cefuroxima* da *EP*;

- Impureza F de *Cefuroxima* da EP;
- Impureza G de *Cefuroxima* da EP;
- Impureza H de *Cefuroxima* da EP;
- Impureza I de *Cefuroxima* da EP;
- Amostra de *Cefuroxima*.

2. Preparação das amostras

- (1) Solução padrão de Cefuroxima 1mg/mL: Pesar 10 mg de padrão de Cefuroxima para um balão volumétrico de 10 ml com água purificada.
- (2) Solução padrão de Cefuroxima 1%: Pipetar 1mL da solução padrão de C=1mg/ml – Solução (1), para um balão volumétrico de 100mL com água purificada.
- (3) Solução padrão de Cefuroxima 0,05%: Pipetar 1mL da solução padrão Cefuroxima 1% - solução (2), para um balão volumétrico de 20mL com água purificada.
- (4) Solução amostra de impurezas individuais 0,01mg/mL: Pesar 2 mg de amostra de impureza para um balão volumétrico de 20 ml com água purificada (C=0,1mg/ml). Diluir 1mL da solução preparada para um balão volumétrico de 10mL com água purificada. Preparar esta solução para cada uma das impurezas individuais em análise.
- (5) Solução de adequabilidade do sistema (SST): Pesar 10mg de padrão de Cefuroxima e pipetar 1mL das soluções de impurezas A, B, C, E e H (C=0,1mg/ml) para um balão volumétrico de 10mL com água purificada.
- (6) Solução de amostra de Cefuroxima 1mg/mL: Pesar 10mg de amostra de Cefuroxima para um balão volumétrico de 10ml com água purificada.
- (7) Solução de amostra de Cefuroxima Spiked (Amostra 1mg/mL + mix imp 0,01mg/mL): Pesar 10mg de amostra de Cefuroxima e pipetar 1mL das

soluções amostra de impurezas ($C=0,1 \text{ mg/mL}$) para um balão volumétrico de 10mL com água purificada.

3. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para a validação do método de quantificação dos compostos relacionados por UPLC encontram-se descritas na tabela seguinte.

Tabela 8- Condições cromatográficas de validação do método de compostos relacionados por UPLC

Parâmetro	Descrição		
Coluna	C ₈ , 100mm x 2.1mm x 1.7µm		
Fase móvel A	Dissolver 680 mg de acetato de sódio tri-hidratado e 5,7 ml de ácido acético glacial 100% num balão volumétrico de 1000mL com água purificada. Ajustar o pH a 3.2 com ácido acético glacial 100%.		
Fase móvel B	Acetonitrilo		
Volume de injeção	1 µL		
Fluxo	0.5 ml/ min		
Detetor PDA UV- Vis	λ=273 nm		
Temperatura das amostras	8° C		
Temperatura da coluna	35° C		
Concentração de trabalho	1 mg/ml		
Gradiente	Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
	0	93	7
	1.53	93	7
	3.20	88	12
	6.95	88	12
	7.79	80	20
	9.87	80	20
	12.79	60	40
	13.21	93	7
16.12	93	7	

4. Procedimento de validação

a) Ensaio de adequabilidade de sistema

Injetar uma vez a solução (3) e a solução (5).

Injetar três vezes solução (2).

Deve-se comprovar os seguintes requisitos:

Tabela 9- Requisitos de validação do ensaio de adequabilidade do sistema no método de compostos relacionados

Solução	Critério SST	Requisitos
Solução de adequabilidade do sistema (SST) - Solução (5)	Resolução entre impureza H e Impureza E	$\geq 1,5$
	Resolução entre impureza E e Impureza C	$\geq 1,5$
	Resolução entre impureza C e Impureza B	$\geq 1,5$
	Resolução entre <i>Cefuroxima</i> e Impureza A	$\geq 2,0$
Solução padrão <i>Cefuroxima</i> 1%- solução (2)	RSD entre as 3 leituras	$\leq 5,0$
Solução padrão <i>Cefuroxima</i> 0,05%- solução (3)	Razão sinal/ruído do pico de <i>Cefuroxima</i>	≥ 10

b) Linearidade

Preparação, por diluição de um padrão-mãe concentrado de $C=1\text{ mg/mL}$ (solução (1)), soluções padrão de *Cefuroxima* com concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0%. Injetar cada solução 3 vezes.

O fator de correlação (R) deve ser $\geq 0,99$. Calcular os limites de detecção e quantificação.

c) Precisão

I) Repetibilidade instrumental

Injetar 10 vezes a solução (3).

O RSD entre as áreas deve ser inferior a 5,0%.

II) Precisão intermédia

Analisar uma amostra homogénea de *Cefuroxima* de $C=1\text{mg/ml}$ (solução (6)) fazendo 6 preparações distintas dessa amostra.

Outro analista executa a mesma análise com o mesmo número de amostras, num dia diferente e num outro equipamento.

Determinar a média e o RSD entre as amostras de cada analista, que não deve ser superior a 10,0%. O RSD dos resultados entre os dois analistas não deve ser superior a 10,0%.

d) Seletividade

Injetar cada uma das seguintes soluções:

- Fase móvel A

- Fase móvel B

- Solvente

- Padrão de *Cefuroxima* de concentração 1mg/mL (solução (1))

- Impureza A de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de $0,01\text{mg/ml}$ (solução (4))

- Impureza B de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/ml (solução (4))
- Impureza C de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/ml (solução (4))
- Impureza E de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/ml (solução (4))
- Impureza F de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/mL (solução (4))
- Impureza G de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/mL (solução (4))
- Impureza H de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/mL (solução (4))
- Impureza I de *Cefuroxima* da EP com limite de especificação de 0,01mg/mL (solução (4))
- Solução (6)
- Solução (7)

Não deve existir nenhum composto com o mesmo tempo de retenção que o do princípio ativo, de forma a não comprometer o seu comportamento e o seu tempo de retenção em solução.

e) **Robustez**

i) Varição do pH da fase móvel A (pH = 3,2±0,2)

Variar o valor de pH da fase móvel A para 3,0 e 3,4 (3,2±0,2) e injetar a solução (7).

Avaliar a influência da variação de pH da fase móvel no tempo de retenção do composto ativo e resolução, quando comparado com as condições do método original.

ii) Varição do solvente orgânico na composição da fase móvel ($7 \pm 2,1\%$)

Variar a proporção do solvente orgânico (Fase móvel B- acetonitrilo) no início e no fim do gradiente em percentagem relativa de 30%, para 9,1% e 4,9 %, e injetar a solução (7).

Avaliar a influência da variação de 2% de solvente orgânico no tempo de retenção do composto ativo e resolução, quando comparado com as condições do método original.

iii) Varição da temperatura da coluna ($T = 35 \pm 5^\circ\text{C}$)

Variar a temperatura da coluna para 30°C e 40°C ($35^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$) e injetar a solução (7).

Avaliar a influência da temperatura da coluna no tempo de retenção do composto ativo e resolução, quando comparado com as condições do método original.

vi) Varição do fluxo de trabalho (Fluxo = $0,5 \pm 0,1$ ml/min)

Variar o fluxo para de 0,4ml/min e 0,6ml/min ($0,5\text{ml/min} \pm 20\%$) e injetar a solução (7).

Avaliar a influência do fluxo no tempo de retenção do composto ativo e resolução, quando comparado com as condições do método original.

5. Resultados e discussão

O método de compostos relacionados tem o propósito de quantificar, não só o princípio ativo presente numa amostra, como também todas as impurezas a ele associadas. Estas impurezas são compostos presentes num produto final e a sua concentração deve estar abaixo dos limites especificados, de forma a não interferir com o efeito do produto.

A validação de um método analítico, tal como já foi referido no capítulo anterior, tem o propósito de demonstrar que o método é adequado ao fim a que se destina.

Na validação do método analítico de CR'S, contrariamente ao que acontece na validação do método de doseamento em que o único componente a avaliar é o princípio ativo, existe uma série de impurezas associadas ao princípio ativo. Esta especificação confere à validação do método de CR'S uma maior complexidade no tratamento dos resultados, comparativamente ao método de doseamento.

Para validar um método analítico de compostos relacionados é essencial que sejam avaliados alguns parâmetros, tais como a adequabilidade do sistema, a linearidade, a precisão, a seletividade e a robustez do método.

No ensaio de adequabilidade do sistema (SST) é necessário que haja a confirmação de que, quer as impurezas, quer o composto ativo têm um tempo de corrida e uma resolução constante ao longo de todo o processo de validação. Por análise dos resultados obtidos (Anexo III, Tabela 20) é possível concluir que na solução de SST, são cumpridos todos os requisitos. Na solução padrão 1%, o valor do RSD entre as três leituras efetuadas é de 0,4%. Uma vez que o seu valor é inferior a 5,0%, o valor obtido é aceitável para análise de adequabilidade do sistema. No que diz respeito à solução de *Cefuroxima* a 0,05%, esta apresenta uma razão sinal/ruído (comparação entre o valor quantificado e o ruído registado pelo equipamento) do pico de *Cefuroxima* de 10,8. O limite aceitável para esta solução era que a razão sinal/ruído fosse superior a 10 e, embora o seu valor esteja em "border line", o requisito é cumprido para análise da adequabilidade do sistema.

Desta forma, pode-se afirmar que, o ensaio de adequabilidade do sistema obteve valores que cumprem os limites especificados, garantido que, quer o método analítico, quer o equipamento, mantém a capacidade de resposta ao longo de toda a análise cromatográfica.

A linearidade é a capacidade de o método gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, construindo uma reta linear. Segundo a “*ICH-Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*” e o critério interno de validação do laboratório foram definidos 7 níveis de concentrações para a análise deste parâmetro. Assim, prepararam-se soluções-padrão de *Cefuroxima* com concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; e 5,0%. Para cada uma das concentrações, fizeram-se três leituras e as suas médias foram registadas no Anexo III, Tabela 21. Após o registo das áreas determinadas através da análise dos cromatogramas, delineou-se uma reta linear (Anexo III, Figura 20) em que a equação é $y=50684,6579x -234,9354$ e o fator de correlação (R) é 1,0. Uma vez que o limite especificado para o fator de correlação era $\geq 0,99$ e o valor obtido é 1,0, pode-se concluir que o método é capaz de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito.

O limite de deteção avalia a menor concentração de analito presente numa amostra que pode ser detetado, mas não necessariamente quantificado. O limite de deteção pode ser determinado através da reta obtida no ensaio de linearidade, em que é analisada uma amostra com uma concentração muito baixa, que torne possível a sua deteção. O LD é calculado com base na equação 3. Através da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o ‘S’ contém o valor de 282,23 e o ‘m’, por análise da equação da reta, tem o valor de 50684,6579. Por substituição dos dados na equação 3, conclui-se que o valor do limite de deteção é de 0,02%.

O limite de quantificação avalia a menor concentração de analito presente numa amostra e que pode ser detetado e quantificado com precisão e exatidão. O LQ é calculado com base na equação 4. Através da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o valor de ‘S’ é de 282,23 e o ‘m’ é de 50684,6579. Por substituição dos dados na equação 4, conclui-se que o valor do limite de quantificação é de 0,06%.

Como conclusão do ensaio de linearidade é possível afirmar que, perante os resultados obtidos, o método é capaz de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito e que o limite mínimo de deteção de um analito presente numa amostra, que pode ser detetado mas não necessariamente quantificado, é de 0,02%. O limite mínimo de concentração de um analito presente numa amostra que pode ser quantificado e detetado, com precisão e exatidão, é de 0,06%.

Os testes de validação para a determinação quantitativa das impurezas incluem uma investigação de precisão. O ensaio de precisão é designado como o coeficiente de variação de medições sucessivas efetuadas na mesma amostra homogénea. A precisão é avaliada por dois tipos de ensaios, a repetibilidade instrumental e a precisão intermédia.

A repetibilidade instrumental do método de CR's avalia a precisão da análise, sob as mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes e dias) num determinado espaço de tempo. Segundo o critério interno de validação do laboratório, foi definido que a avaliação da repetibilidade instrumental deveria ser feita com uma concentração de analito o mais baixo possível, para garantir que, até com níveis de concentração reduzida, o equipamento conseguia quantificar, o mesmo, com precisão. Desta forma, a repetibilidade instrumental corresponde a leituras sucessivas do padrão de *Cefuroxima* com concentração de 0,05% (solução (3)). A variação (RSD) entre as 10 leituras do padrão tem que ser mínima, de forma a assegurar que a resposta do equipamento ao longo da análise é precisa. Por análise dos resultados obtidos (Anexo III, Tabela 22) conclui-se que o RSD entre as 10 leituras da mesma amostra de padrão é de 2,1%, conferindo precisão do método sob as mesmas condições cromatográficas.

A precisão intermédia avalia o valor de precisão que existe quando se aplica variações dentro do mesmo laboratório, tais como a manipulação por diferentes analistas e a utilização de equipamentos diferentes, em dias distintos. Segundo a “USP 1225- Validation of Compendial Procedures”, este parâmetro deve ser avaliado através do ensaio de um número suficiente de uma amostra homogénea e que permita o cálculo estatístico do RSD entre elas. Por conseguinte, para a validação do parâmetro de precisão intermédia do método UPLC de CR's, definiu-se a preparação de 6 amostras homogéneas individuais, com a concentração de trabalho definida. O analista 1 preparou, num dia, 6 amostras de *Cefuroxima* a 1mg/mL e procedeu à sua leitura num equipamento de UPLC Classe H. Um outro analista, analista 2, preparou as mesmas 6 amostras de *Cefuroxima*, num dia diferente, com concentração de 1mg/ml e procedeu à sua leitura num equipamento de UPLC de bombas binárias. As análises dos dois analistas foram executadas com a mesma coluna e com as mesmas condições cromatográficas. Os resultados obtidos encontram-se esquematizados no Anexo III, Tabela 23. Da análise dos mesmos, verifica-se que o RSD entre as seis amostras do analista 1 é de 0% e do analista 2 é de 9%. Uma vez que o RSD especificado entre as seis amostras de cada analista não deveria ser superior a 10,0%, conclui-se que os resultados obtidos encontram-se dentro dos valores aceitáveis. Por análise do RSD entre as 12 amostras dos dois analistas, verifica-se que este possui o valor 9,42%. Uma vez que o valor especificado deste parâmetro era que este tinha que ser inferior a 10,0%, conclui-se que, existe precisão entre as 12 leituras totais dos 2 analistas.

Perante os resultados obtidos nos dois ensaios de precisão, o ensaio de repetibilidade instrumental e o de precisão intermédia, é possível afirmar que o método analítico é preciso, quer com as mesmas operações, quer com operações de análise diferentes.

O ensaio de seletividade permite avaliar, numa amostra, o tempo de retenção correspondente ao princípio ativo e a todas as impurezas a ele associadas. Este ensaio permite, também, avaliar se existe algum analito com o mesmo tempo de retenção do princípio ativo e que comprometa o seu comportamento e o seu tempo de retenção numa amostra complexa. Em estudos analíticos de impurezas, a seletividade é estabelecida através do “spiking” da amostra com quantidades de impurezas que permitam a sua quantificação com exatidão e precisão. Desta forma, a uma amostra de produto acabado, adicionam-se quantidades de impurezas, com concentrações de 0,01 mg/ml (descrito na solução (7)), para que estas sejam quantificadas com níveis de precisão e exatidão aceitáveis. Para análise deste parâmetro, procedeu-se à leitura das seguintes soluções: fase móvel A, fase móvel B, solvente, solução (1), solução (4) para as impurezas A,B,C,E,F,G,H e I, solução (6) e solução (7).

Em análise aos cromatogramas das soluções de fase móvel A (Anexo III, Figura 21), fase móvel B (Anexo III, Figura 22) e solvente (Anexo III, Figura 23), pode-se afirmar que estas soluções não apresentam picos que interfiram na quantificação nem do princípio ativo, nem das impurezas. Todas as instabilidades observadas, nomeadamente a partir dos 12 minutos, são referentes à estabilização das condições de gradiente pelo equipamento.

No cromatograma referente ao padrão de *Cefuroxima* 1mg/ml (Anexo III, Figura 24), visualiza-se que o tempo de retenção correspondente ao princípio ativo é de 3,995 minutos.

A análise dos resultados correspondentes aos cromatogramas das impurezas quantificadas individualmente encontra-se esquematizada no Anexo III, Tabela 24. Foi notório que cada impureza possui um tempo de retenção específico e diferente entre si.

No cromatograma referente à amostra de *Cefuroxima* a 1mg/ml (Anexo III, Figura 33), visualiza-se que o tempo de retenção correspondente ao princípio ativo é de 4,032 minutos, o da Impureza A é de 3,559 minutos, o da Impureza E é de 6,691 minutos e o da Impureza H é de 6,369 minutos.

No cromatograma referente à amostra “Spiked” de *Cefuroxima* (Anexo III, Figura 34), visualiza-se que o tempo de retenção correspondente ao princípio ativo é de 4,030 minutos, o da Impureza A é de 3,548 minutos, o da Impureza B é de 7,923 minutos, o da Impureza C é de

7,225 minutos, o da Impureza E é de 6,668 minutos, o da Impureza F é de 5,689 minutos, o da Impureza G é de 10,343 minutos, o da Impureza H é de 6,352 minutos e o da Impureza I é de 0,704 minutos.

Após uma análise detalhada a todos os cromatogramas obtidos, verificou-se que todas as impurezas apresentaram tempos de retenção específicos. Desta forma, foi notória a inexistência de algum composto com o mesmo tempo de retenção que as impurezas e o princípio ativo, não comprometendo os seus comportamentos e os seus tempos de retenção numa mistura. Assim, pode-se afirmar que o método é seletivo para os compostos em estudo.

O último parâmetro de validação do método analítico de compostos relacionados é o ensaio de robustez. Devido a condições laboratoriais e ao término do tempo do estágio na empresa, não foi possível proceder à execução deste ensaio para a validação do método de CR's por UPLC. Contudo, neste parágrafo será descrito como seria o procedimento deste parâmetro para a sua validação.

A robustez de um método analítico de compostos relacionados avalia os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método. Desta forma, define-se quais as condições que, em rotina, causam alterações aos tempos de retenção do princípio ativo e dos compostos relacionados a ele associados. De acordo com a “*ICH-Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*”, as variações que podem ser aplicadas ao ensaio de robustez são a variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, alteração da coluna em uso, alteração das temperaturas e alteração do fluxo de trabalho. Uma vez que, na validação dos CR's analisa-se não só o princípio ativo, como também todas as impurezas a ele associadas, há que avaliar a influência das variações aplicadas na resolução entre todos os compostos.

Para variação do pH da fase móvel, teriam que ser preparadas duas fases móveis A, uma com pH a 3,0 e outra com pH a 3,4 e analisar-se-ia a solução de amostra de *Cefuroxima* “Spiked” (solução (7)).

A outra variação aplicada seria a variação do solvente orgânico na composição da fase móvel ($7\% \pm 2,1\%$). Desta forma, teria que variar a proporção de solvente orgânico no início e no fim do gradiente, para 9,1% e 4,9% e analisar-se-ia a solução de amostra de *Cefuroxima* “Spiked” (solução (7)).

A outra variação a aplicar seria a variação da temperatura aplicada à coluna cromatográfica ($35^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$). Desta forma, sujeitaria a coluna a temperaturas de 30°C e 40°C e procedia-se à leitura, sob estas condições, da solução amostra *Cefuroxima* “Spiked” (solução (7)).

A última variação definida para validar este ensaio, é a variação do fluxo de trabalho (0.5 ± 0.1 ml/min). Desta forma, avaliava-se a solução amostra de *Cefuroxima* “Spiked” (solução (7)) quando o fluxo fosse 0.4 ml/min e 0.6 ml/min.

As variações anteriormente descritas iriam comprometer os tempos de retenção, quer do princípio ativo, quer das impurezas, quando comparados com o método original. Desta forma, era possível afirmar que havia uma influência destas alterações, nos tempos de retenção, constatando que, em rotina, estes parâmetros demonstrar-se-iam críticos na resolução e nos tempos de retenção dos compostos. Para que este método fosse definido como robusto, as variações dos tempos de retenção, após as alterações dos parâmetros do mesmo, não poderiam ser muito acentuadas.

De acordo com os resultados obtidos e, caso os resultados do ensaio de robustez se apresentassem como os que foram descritos no parágrafo anterior, o método de compostos relacionados em UPLC seria validado.

Após a validação do método analítico de compostos relacionados da *Cefuroxima* por UPLC, este teria que ser sujeito às entidades reguladoras (INFARMED, no caso de Portugal), para que este fosse aprovado e posteriormente utilizado pelo laboratório do controlo de qualidade de produtos farmacêuticos. ^[31] ^[24]

Capítulo 5

Análise conclusiva

O presente trabalho teve como principal objetivo a execução da transferência de um método analítico de HPLC para UPLC e a avaliação dos aspetos críticos da mesma, assim como a sua posterior validação. Quer a transferência, quer a validação foram executadas num sistema de cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) e com um método analítico destinado à quantificação da substância ativa, *Cefuroxima*, e outro destinado a todas as impurezas a ela associadas. Desta forma, tornou-se essencial testar e validar o método em UPLC correspondente ao doseamento do princípio ativo e à quantificação das impurezas, para que haja a certificação de que o mesmo é adequado para o fim a que se destina.

A transferência de método analítico é um processo complexo e que tem que seguir determinados requisitos de forma a assegurar que o mesmo cumpre todas as especificações correspondentes às impurezas e ao princípio ativo.

Um dos desafios que foi apontado neste projeto de transferência foi o facto de existir um número significativo de impurezas que tinham que ser analisadas e quantificadas com precisão e resolução entre elas, quando presentes numa mistura. Para além disso, a escolha da fase estacionária, coluna cromatográfica, para efetuar a transferência analítica para UPLC, torna-se crucial para que a mesma seja executada de forma a cumprir os mesmos requisitos existentes e que são estabelecidos no método de HPLC.

Após a avaliação de alguns aspetos que se demonstraram críticos à transferência analítica, procedeu-se à validação dos métodos de doseamento e compostos relacionados transferidos para UPLC. Por análise dos parâmetros de validação dos dois métodos analíticos, foi possível assegurar que ambos são seletivos, precisos, exatos, robusto no caso do método de doseamento do princípio ativo, e capazes de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito na amostra.

O principal objetivo desta transferência era obter um método em UPLC que economizasse o tempo de análise do composto e, como tal, também este parâmetro se destacou como um desafio bastante promissor deste projeto.

Este projeto resultou num impacto bastante positivo relativamente ao ganho de tempo de análises deste produto. Em HPLC, o tempo de análise de um lote de amostra era cerca de 40 minutos. Com o novo método em UPLC, esse tempo foi reduzido para cerca de 16 minutos. Numa perspetiva global, consegue-se estimar uma quantificação em UPLC de um aumento em 2,5 vezes mais de lotes que podem ser analisados por dia, quando comparados com o método inicial de HPLC.

Não obstante, este novo método veio reduzir os gastos de solvente orgânico e de fase móvel, pois a quantidade de amostra a ser analisada em função do tempo reduziu de uma forma significativa.

Em termo de conclusão, este projeto veio trazer uma vantagem de operação em UPLC para as análises de quantificação de produtos numa rotina laboratorial de uma indústria farmacêutica. Este é um dos principais desafios que, atualmente, uma indústria farmacêutica enfrenta, não só constituindo uma maior competitividade de negócio, ao mesmo tempo que responde às exigências de qualidade cada vez mais rigorosas e ao cumprimento das diretivas internacionais.

Bibliografia

- [1]- JESUS, Margarida- **Manual de Acolhimento da empresa.**, 19 Nov. 2013. [Consult. 29 Jan 2014];
- [2]- Site da empresa onde foi desenvolvido o projeto. [Consult. 14 Nov. 2013].
- [3]- Galeria do site da empresa onde foi desenvolvido o projeto.[Consult. 18 Nov 2013];
- [4]- SIMPSON CF- **Practical High Performance Liquid Chromatography**. Edited by Simpson CF. London: Heyden & Son; 1978;
- [5]- United States Pharmacopeia 36- **621 Chromatography**. [Consult. 7 Feb 2014];
- [6]- Portal da Engenharia Química- **Processos de separação: cromatografia**. [Em linha]. Coimbra. [Consult. 11 Out 2013]. Disponível em: <URL: http://labvirtual.eq.uc.pt/sitejoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=451>;
- [7]- SCHWEDT, G- **The Essential Guide to Analytical Chemistry**. 2ª Edição. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons Ltd, 1997;
- [8]- WATERS- **HPLC: High Performance Liquid Chromatography**. [Em linha]. [Consult. 1 Out 2013]. Disponível em <URL: http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US>;
- [9]- SKOOG, Douglas A; HOLLER, F. James; Nieman, Timothy A. – **Introdução às separações cromatográficas**. In: **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. ISBN- 0-03-002078-6. 598-617;
- [10]- SIMÕES GONÇALVES, Maria de Lurdes Sadler- **Introdução aos métodos cromatográficos**. In: **Métodos Instrumentais para análise de soluções**. 4ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Novembro 2001. ISBN- 972-31-0928. 129, 730-735;

- [11]- WEDLER, Gerd- **Manual de química física**. 4ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Julho 2001. ISBN- 972-31-0918-2, 434-435;
- [12]- SIMÕES GONÇALVES, Maria de Lurdes Sadler- **Cromatografia em fase gasosa. In: Métodos Instrumentais para análise de soluções**. 2ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Maio 1990. ISBN- 972-31-0515-2, 553-577;
- [13]- JIN, Yu et al. - **HPLC AND UPLC switch for TCM analysis**. *Mode Tradit Chin Med* (2008), 10(1), 80-84;
- [14]- NAGESWARI, A; KRISHNA REDDY, K.V.S.R.; MUKKANTI, K. – **Stability-indicating UPLC method for determination of Imatinib Mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 66 (2002), 109-115;
- [15]- SIMÕES GONÇALVES, Maria de Lurdes Sadler- **Introdução aos métodos cromatográficos. In: Métodos Instrumentais para análise de soluções**. 4ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Novembro 2001. ISBN- 972-31-0928. 129, 775-785;
- [16]- WILLARD, H. ; MERRITT JR, L; DEAN, J- **Cromatografia em fase gasosa. In: Análise Instrumental**. 4ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Abril 1973. 558-571;
- [17]- PEDRAGLIO, S et al. - **New perspectives in bio- analytical techniques for preclinical characterization of a drug candidate: UPLC-MS/MS in *in vitro* metabolism and pharmacokinetic studies**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44 (2007). 665-673;
- [18]- RODRIGUEZ-ALLER, M. et al. – **Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications**. *Journal of chromatography A*. 1292(2013). 2-18;

- [19]- GUILLARME, D. et al. – **Recent developments in liquid chromatography- Impact on qualitative and quantitative performance.** Journal of Chromatography A, 1149 (2007) 20-29;
- [20]- SERRANO, A.; VAN BOMMEL, M.; HALLETT, J. – **Evaluation between ultrahigh pressure liquid chromatography and high- performance liquid chromatography analytical methods for characterizing natural dyestuffs.** Journal of Chromatography A, 1318 (2013) 102-111;
- [21]- JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. – **Clark’s Analytical Forensic Toxicology.** Cambridge: Pharmaceutical Press (2008);
- [22]- LEWANDROWSKI, Kent- **Chromatography and Capillary Electrophoresis. In: Clinical Chemistry, Laboratory Management & Clinical Correlations.** USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. ISBN 0-683-30085-7;
- [23]- European Pharmacopeia 5.0- **2.2.29.Liquid Chromatography.** 2005. [Consult. 05 Feb 2014];
- [24]- ICH Harmonised Tripartite Guideline- **Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (RI).** 2005. Disponível em URL< <http://www.ich.org/>>;
- [25]- SKOOG, Douglas A; HOLLER, F. James; Nieman, Timothy A. – **Cromatografia Gasosa. In: Princípios de Análise Instrumental.** 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. ISBN- 0-03-002078-6. 623-625;
- [26]- SKOOG, Douglas A; HOLLER, F. James; Nieman, Timothy A. – **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: Princípios de Análise Instrumental.** 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2002. ISBN- 0-03-002078-6. 641- 676;
- [27]- GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico- **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Quim. Nova. 2010. Vol. 33, No.3, 667-679;

- [28]- Infomed- **Resumo das características do medicamento**. [Em linha]. [Consult 13 Fev. 2014]. Disponível em <URL: <http://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php>>;
- [29]- Infomed- **Folheto informativo do medicamento**. [Em linha]. [Consult 13 Fev. 2014]. Disponível em <URL: <http://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php>>;
- [30]- United States Pharmacopeia 2014 – **1224 Transfer of analytical procedures**. [Consult. 28 Mar 2014];
- [31]- United States Pharmacopeia 2014- **1225 Validation of compendial procedures**. [Consult. 28 Mar 2014];
- [32]- Champ M., Langkilde A.M., Brouns F., Kettlitz B. e Collet Y.L.B., Nutrition Research Reviews, 16, 2003,71-82;
- [33]- Mecanismo ação cefalosporinas. [Em linha]. [Consult 12 Jun 2014]. Disponível em <URL: <http://dc152.4shared.com/doc/jdNj-jxD/preview.html>>;

Anexos

Anexo I

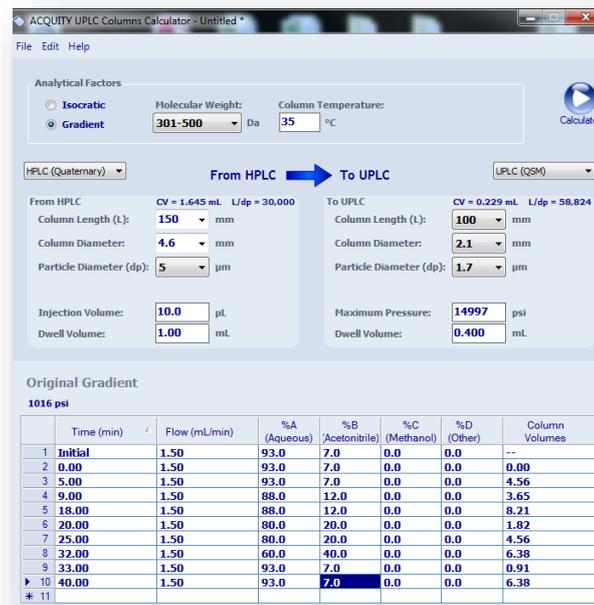


Figura 8- Acquity UPLC Calculator

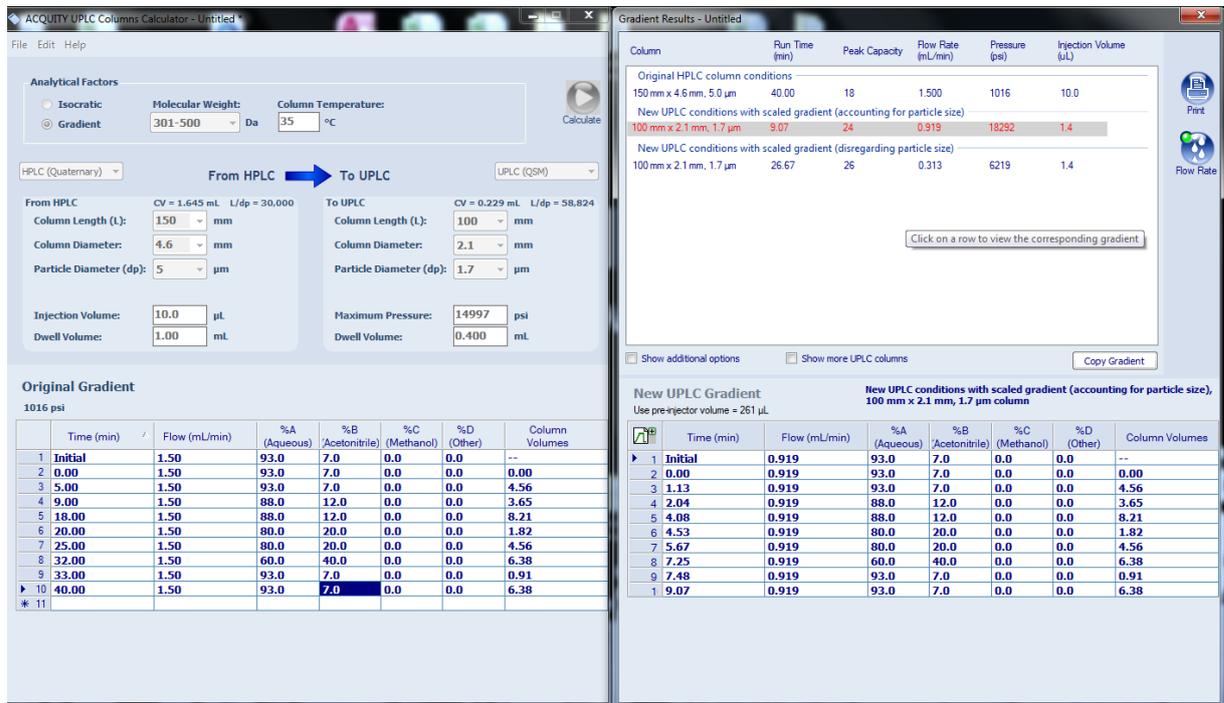


Figura 9- Sugestão inicial das condições cromatográficas para transferência analítica

Tabela 10- Ensaios de transferência analítica com coluna Cortecs

Testes	Tempo (min)	Gradiente de fase móvel		Fluxo (ml/min)	Temp Coluna (°C)	Temp amostra (°C)
		%A	%B			
1	0	93	7	0.6	35°	8°
	1,13	93	7			
	2,14	88	12			
	4,08	88	12			
	4,53	80	20			
	5,67	80	20			
	7,25	60	40			
	7,48	93	7			
	9,07	93	7			
	Igual (1)	Igual (1)	Igual (1)			
2	Igual (1)	Igual (1)	Igual (1)	0.6	30°	8°
	Igual (1)	Igual (1)	Igual (1)	0.5	30°	8°
3	Igual (1)	Igual (1)	Igual (1)	0.5	25°	8°
	Igual (1)	Igual (1)	Igual (1)	0.5	40°	8°
4	0	93	7	0.4	45°	8°
	1,13	93	7			
	2,04	88	12			
	4,08	88	12			
	4,53	88	12			
	5,67	80	20			
	7,25	80	20			
	7,48	93	7			
	9,07	93	7			
5	Igual (4)	Igual (4)	Igual (4)	0.5	45°	8°

6	0	93	7	0.5	45°	8°
	0,83	93	7			
	1,74	88	12			
	3,78	88	12			
	4,23	80	20			
	5,37	80	20			
	6,95	60	40			
	7,18	93	7			
	8,77	93	7			

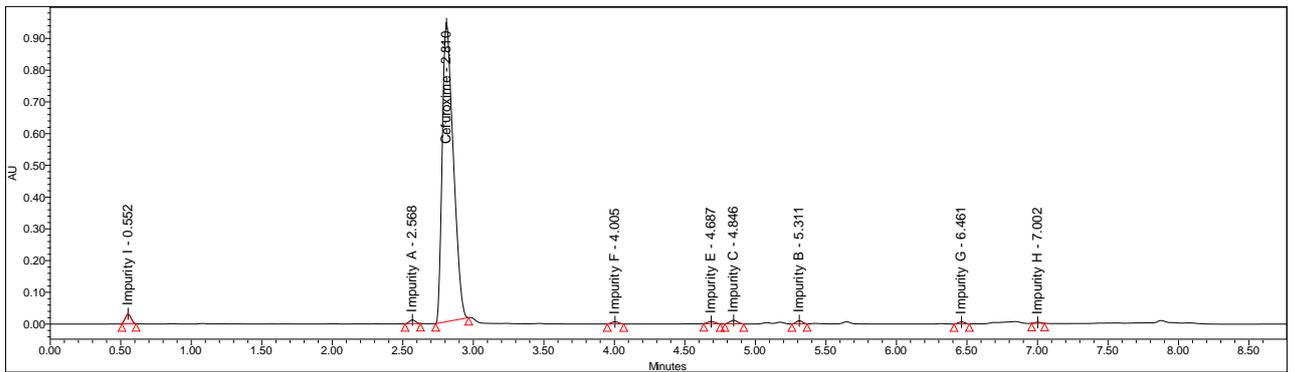


Figura 10- Cromatograma de resultados da transferência analítica da coluna Cortecs

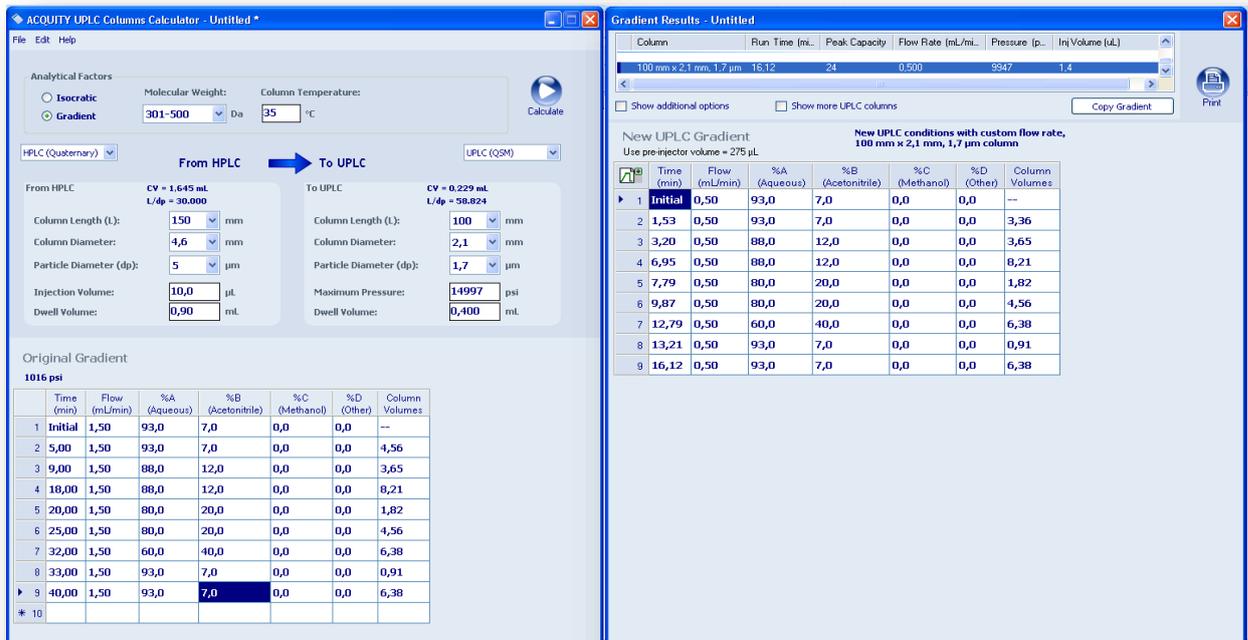


Figura 11- Novas condições cromatográficas para transferência analítica

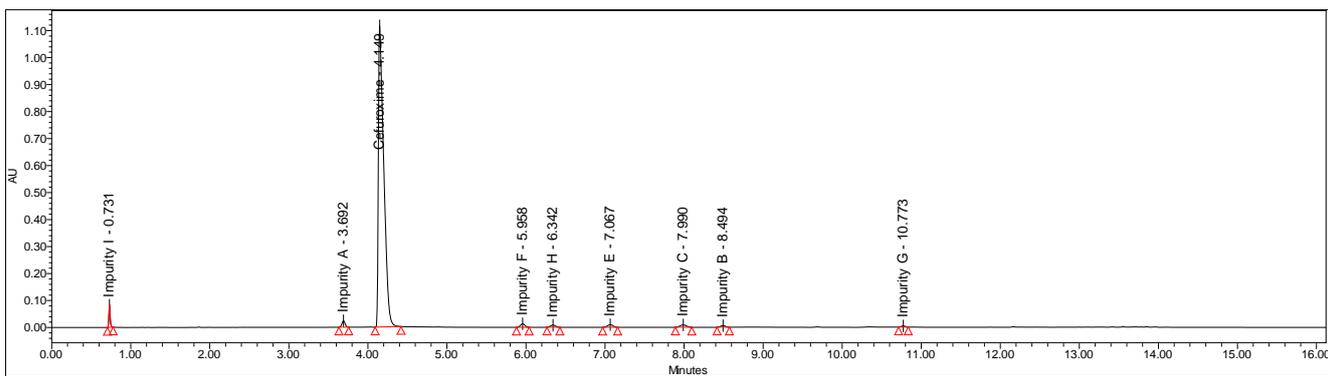


Figura 12- Cromatograma da coluna BEH com as novas condições cromatográficas

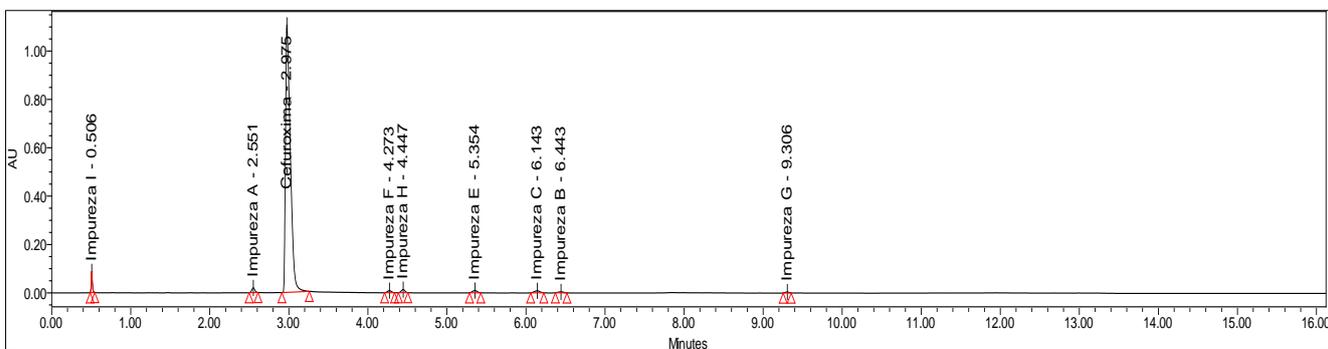


Figura 13- Cromatograma da coluna Cortecs com as novas condições cromatográficas

Anexo II

a) Ensaio de adequabilidade de sistema

Tabela 11- Valores do ensaio de SST para padrão de Cefuroxima no método de doseamento do princípio ativo

Injeção	Área
1	511016
2	510872
3	511687
4	511266
5	511872
6	511542
Média	511361
RSD	0,1%

b) Linearidade

Tabela 12- Áreas das concentrações para cálculo da reta linear do princípio ativo no método de doseamento

Concentração (%)	Concentração real (µg/ml)	Área de Cefuroxima
50	50,02	255341
		254822
		255600
	Média	255254
	RSD	0,2%
80	80,04	407212
		408199
		408714
	Média	408042
	RSD	0,2%

100		511597
	100,05	511519
		512097
	Média	511738
	RSD	0,1%
120		616280
	120,06	616877
		616373
	Média	616510
	RSD	0,1%
150		775236
	150,07	775162
		774615
	Média	775004
	RSD	0,0%

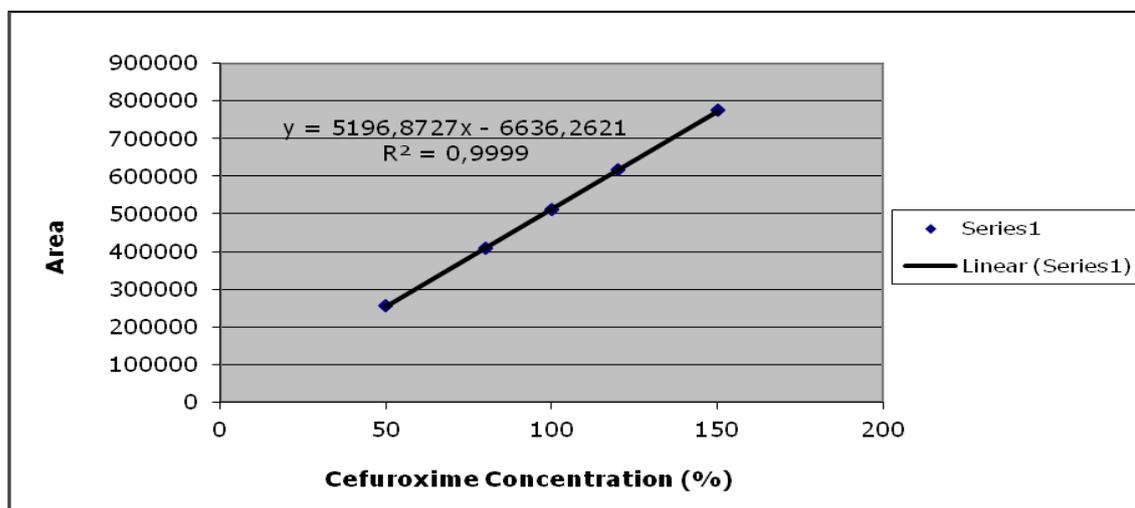


Figura 14- Gráfico da reta linear do método de doseamento do princípio ativo

c) Estabilidade da amostra e padrão

Tabela 13- Estabilidade da amostra e do padrão de Cefuroxima até às 24h no método de doseamento do princípio ativo

	Estabilidade padrão (área)	Estabilidade amostra (área)
T= 0h	511024	515723
T=12h	509368	517314
T=24h	508330	517758
Média	509677	516740
RSD	0,4%	0,3%

d) Precisão

i. Repetibilidade instrumental

Tabela 14- Repetibilidade instrumental do padrão Cefuroxima no método de doseamento do princípio ativo

Injeções	Area
1	512600
2	512798
3	513171
4	512669
5	513771
6	513581
7	513489
8	513800
9	515334
19	514229
Média	513551
RSD	0.2%

ii. Precisão intermédia

Tabela 15- Precisão intermédia entre analistas em ensaios de precisão do método de doseamento do princípio ativo

	Ensaio analista 1 (%)	Ensaio analista 2 (%)
A1	100,3	100,4
A2	99,6	99,3
A3	99,4	99,8
A4	99,6	99,8
A5	99,8	99,6
A6	99,8	100,1
Média (%)	99,8	99,8
RSD (%)	0,3	0,4
Média entre analistas (%)	99,8%	
RSD entre analistas (%)	0,3	

e) Seletividade

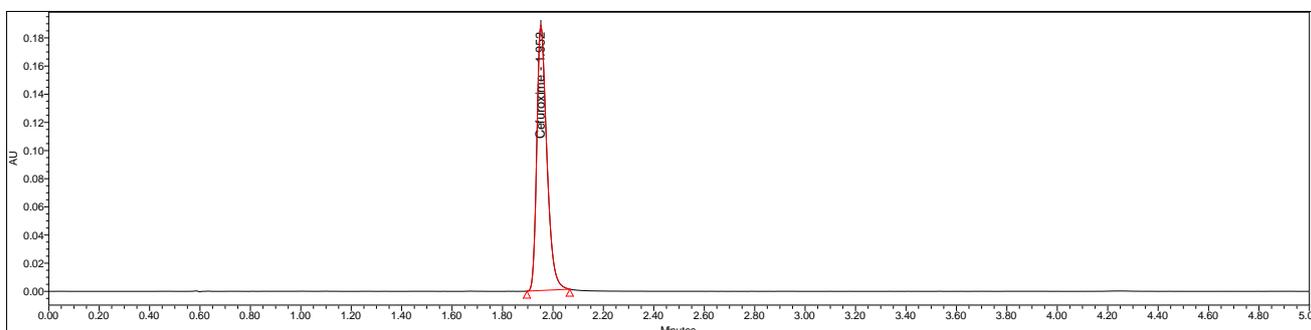


Figura 15- Cromatograma da amostra de Cefuroxima em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo

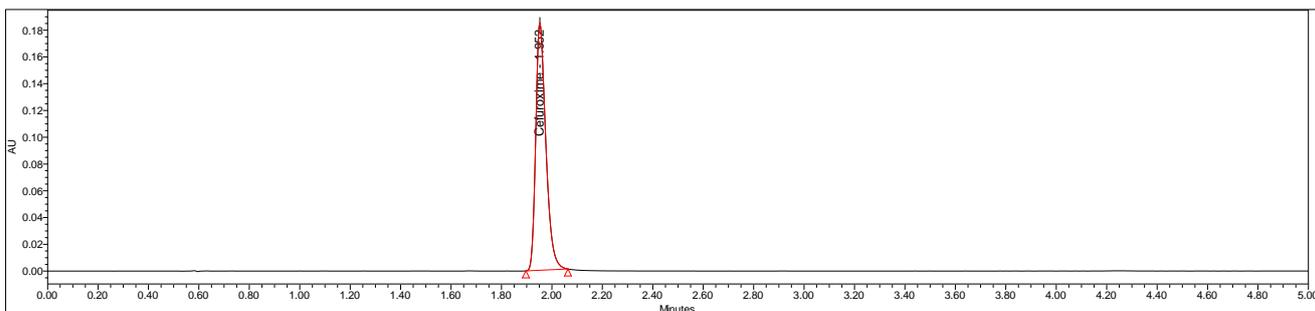


Figura 16- Cromatograma do padrão de Cefuroxime em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo

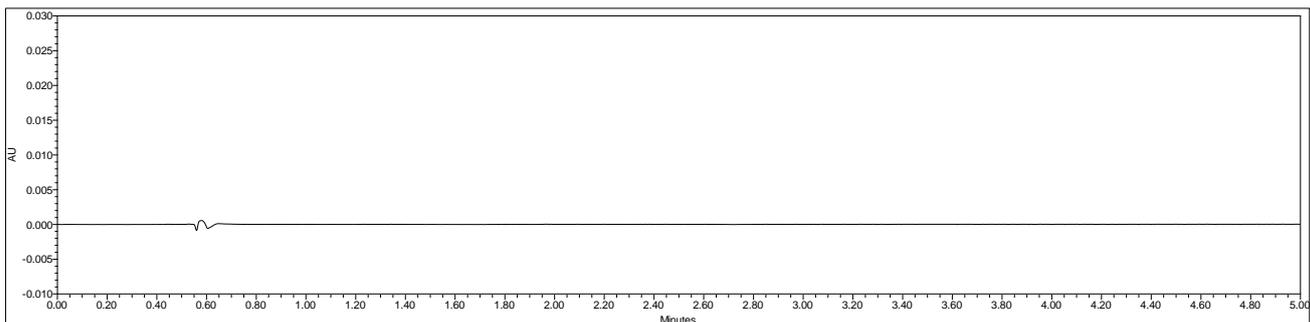


Figura 17- Cromatograma da fase móvel A em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo

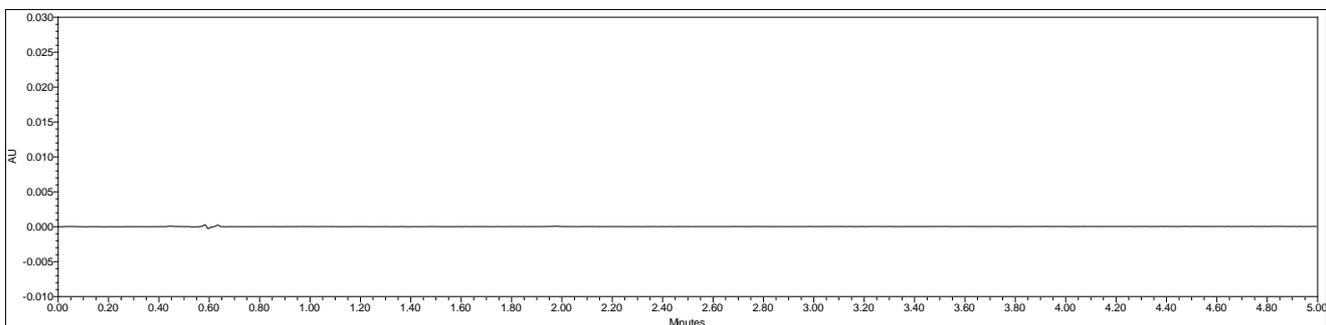


Figura 18- Cromatograma da fase móvel B em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo

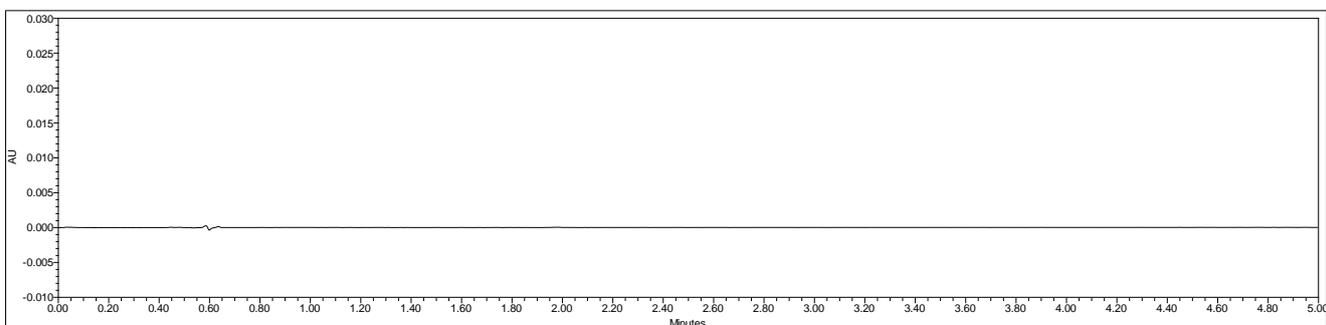


Figura 19- Cromatograma do solvente em ensaios de seletividade do método de doseamento do princípio ativo

f) Exatidão

Tabela 16- Percentagem de recuperação no ensaio de exatidão do método de doseamento do princípio ativo

Concentração (%)	Quantidade pesada (%)	Quantidade lida (%)	Quantidade recuperada (%)
80	80,264	80,964	100,873
	80,264	80,675	100,512
	79,890	79,901	100,014
100	100,423	101,130	100,704
	100,423	101,853	101,424
	100,423	101,217	100,791
120	120,582	121,627	100,866
	120,209	121,953	101,451
	120,582	121,372	100,655
Média (%)			100,8
RSD (%)			0,4

g) Robustez

i. Variação do pH da fase móvel A (pH 3.2±0,2)

Tabela 17- Variação do pH da fase móvel A no ensaio de robustez do método de doseamento do princípio ativo

Variação pH da fase móvel A	Condições método original pH 3,2	pH 3,0 (3,2 - 0,2)	pH 3,4 (3,2 + 0,2)
Tempo retenção Cefuroxima (min)	1,987	2,023	1,903

ii. Varição da temperatura da coluna ($T=35\pm 5^{\circ}\text{C}$)

Tabela 18-Varição da temperatura da coluna no ensaio de robustez do método de doseamento do princípio ativo

Varição da temperatura da coluna	Condições método original $T= 35^{\circ}\text{C}$	$T= 30^{\circ}\text{C}$ ($35^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$)	$T= 40^{\circ}\text{C}$ ($35^{\circ}\text{C} + 5^{\circ}\text{C}$)
Tempo retenção <i>Cefuroxima</i> (min)	1,987	2,048	1,925

iii. Varição do fluxo de trabalho (Fluxo= $0,5\pm 0,1$ ml/min)

Tabela 19- Varição do fluxo de trabalho no ensaio de robustez do método de doseamento do princípio ativo

Varição do fluxo de trabalho	Condições método original $F= 0,5$ ml/min.	$F= 0,4$ ml/min. ($0,5$ ml/min - 20%)	$F= 0,6$ ml/min. ($0,5$ ml/min + 20%)
Tempo retenção <i>Cefuroxima</i> (min)	1,987	2,462	1,670

Anexo III

a) Ensaio de adequabilidade de sistema

Tabela 20- Valores de ensaio de SST do método de compostos relacionados

Solução	Critério SST	Requisitos	Resultados obtidos
Solução de adequabilidade do sistema	Resolução entre impureza H e Impureza E	$\geq 1,5$	2,3
	Resolução entre impureza E e Impureza C	$\geq 1,5$	2,58
	Resolução entre impureza C e Impureza B	$\geq 1,5$	3,33
	Resolução entre Cefuroxima e Impureza A	$\geq 2,0$	3,27
Solução padrão Cefuroxima 1%	RSD (%)	$\leq 5,0$	0,4
Solução de Cefuroxima 0,05%	Razão sinal/ruído do pico de Cefuroxima	≥ 10	10,8

b) Linearidade

Tabela 21- Áreas das concentrações para cálculo da reta linear do método de compostos relacionados

Concentração (%)	Concentração real ($\mu\text{g/ml}$)	Área Cefuroxima (%)
0,05	0,504	2491
0,1	1,008	4941
0,2	2,016	10056
0,5	5,040	25325
1,0	10,080	50873
2,0	20,159	101382
5,0	50,398	255419

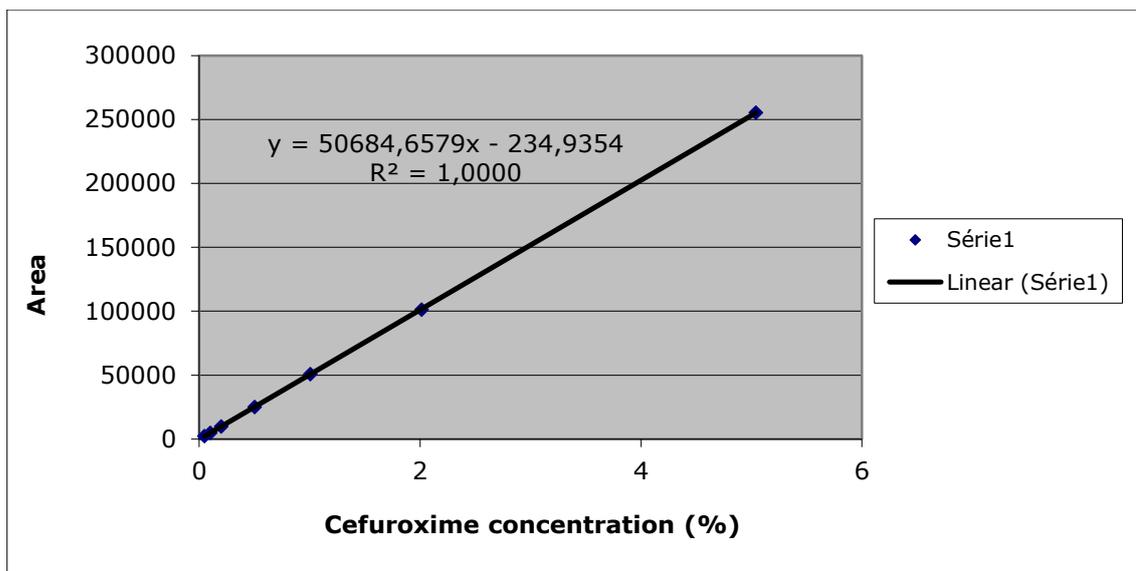


Figura 20- Gráfico da reta linear do método de compostos relacionados

c) Precisão

i. Repetibilidade instrumental

Tabela 22- Repetibilidade instrumental do padrão de Cefuroxime a 0,05% na validação do método de compostos relacionados

Injeções	Área
1	2531
2	2462
3	2534
4	2497
5	2471
6	2418
7	2474
8	2389
9	2454
19	2548
Média	2478
RSD	2,1%

ii. Precisão intermédia

Tabela 23- Ensaio de precisão intermédia na validação do método de compostos relacionados

	Ensaio analista 1 (%)						Ensaio analista 2 (%)					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Impureza I	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%
Impureza A	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%
Impureza H	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%
Impureza E	0,13%	0,13%	0,13%	0,13%	0,13%	0,13%	0,14%	0,14%	0,14%	0,17%	0,16%	0,14%
Média (%)	0,13%						0,15%					
RSD (%)	0,00%						9,00%					
Média entre analistas (%)	0,14%											
RSD entre analistas (%)	9,42%											

d) Seletividade

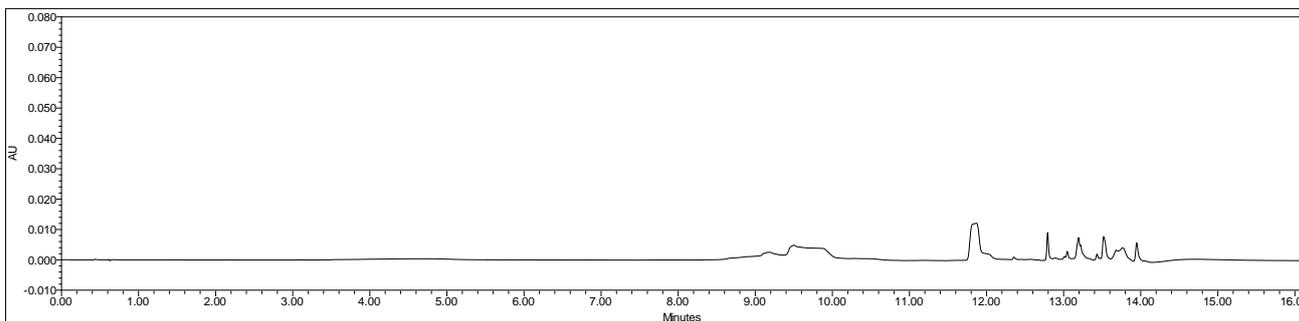


Figura 21-Cromatograma da fase móvel A em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

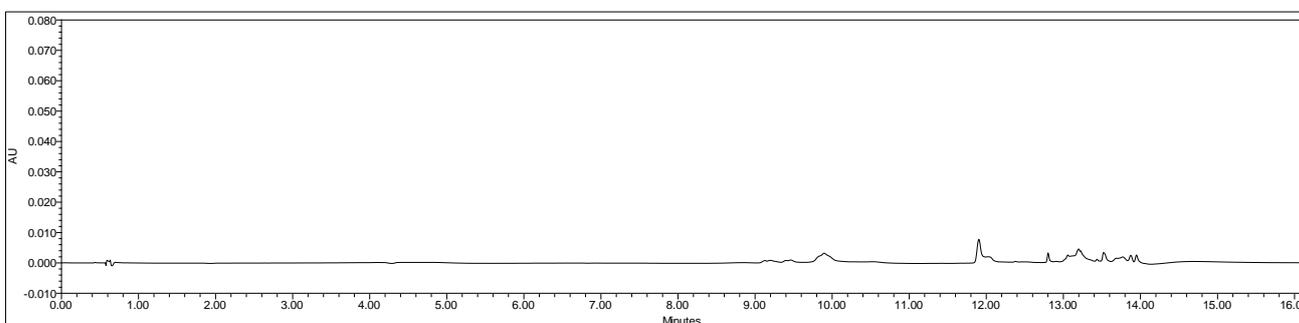


Figura 22-Cromatograma da fase móvel B em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

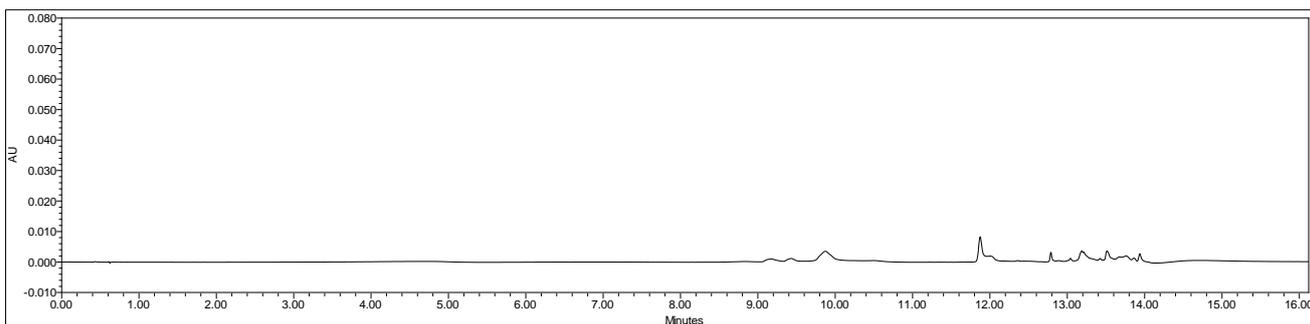


Figura 23- Cromatograma do solvente em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

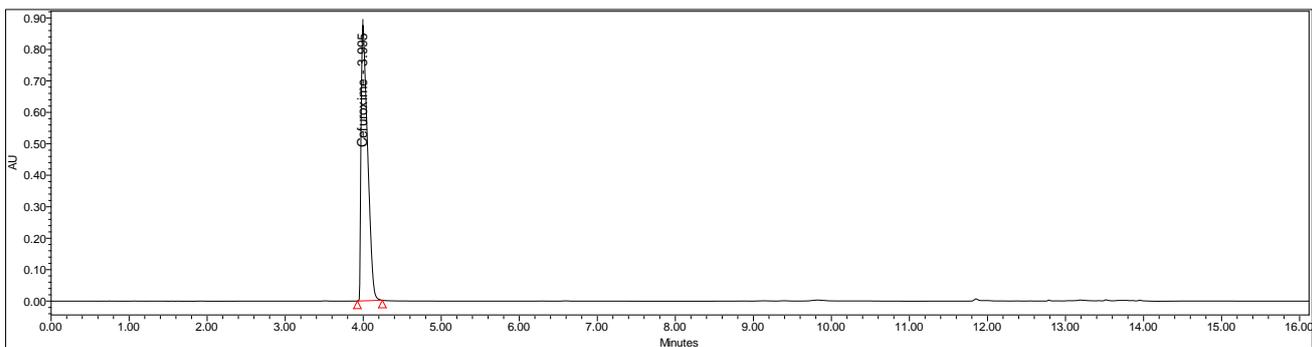


Figura 24- Cromatograma do padrão de Cefuroxima 1mg/ml em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

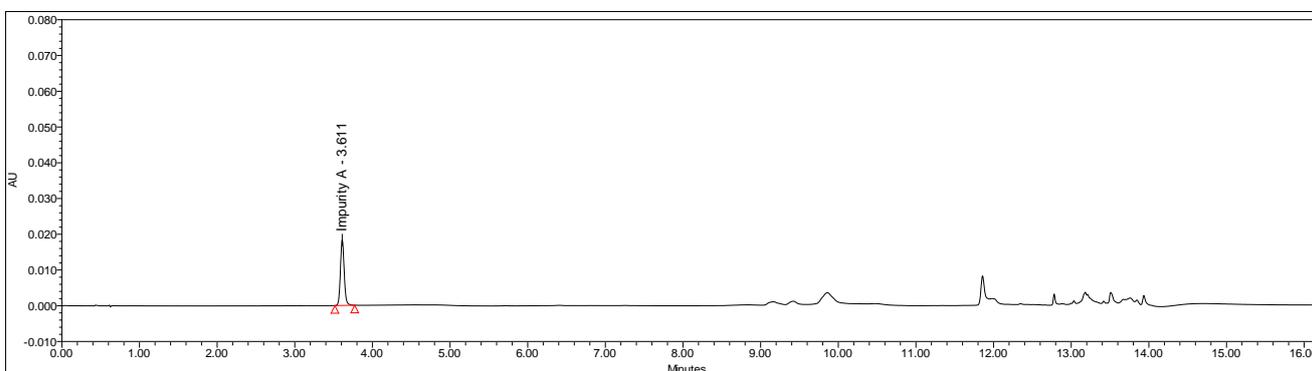


Figura 25- Cromatograma da Impureza A em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

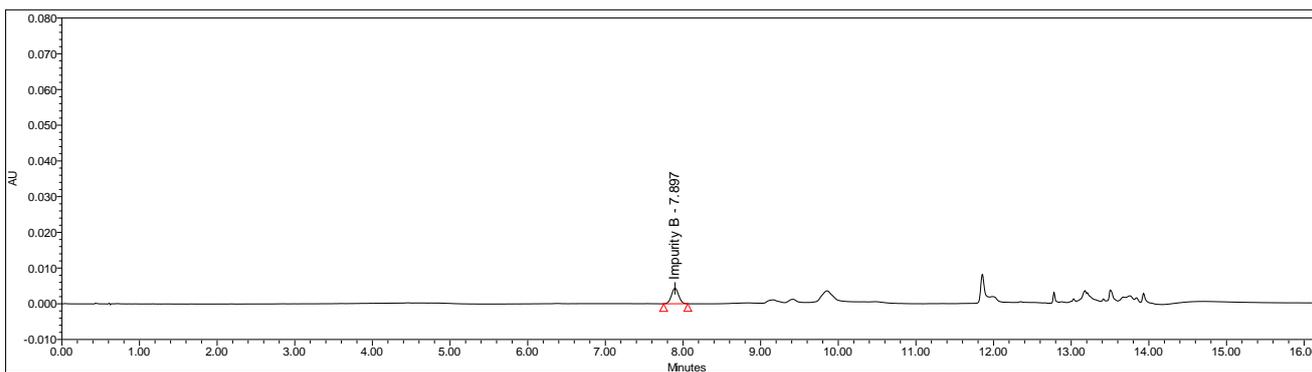


Figura 26- Cromatograma da Impureza B em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

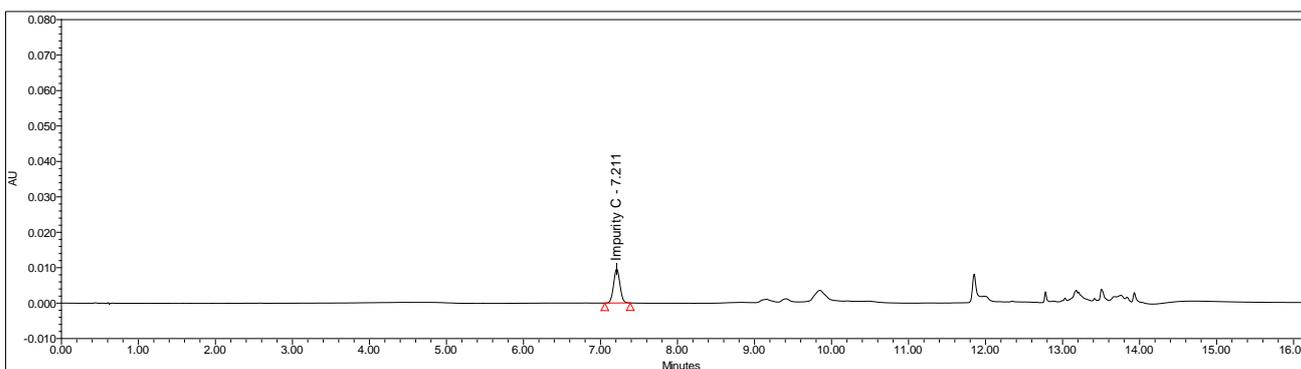


Figura 27- Cromatograma da Impureza C em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

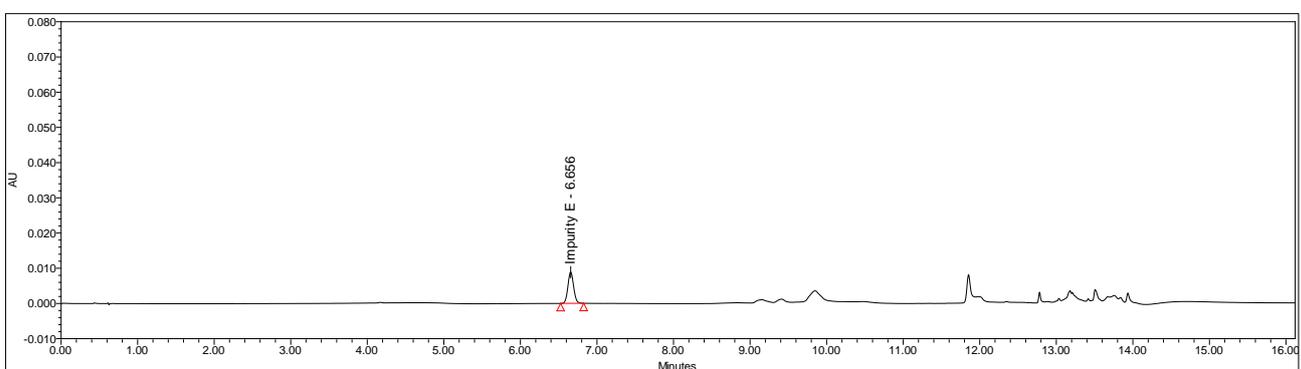


Figura 28- Cromatograma da Impureza E em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

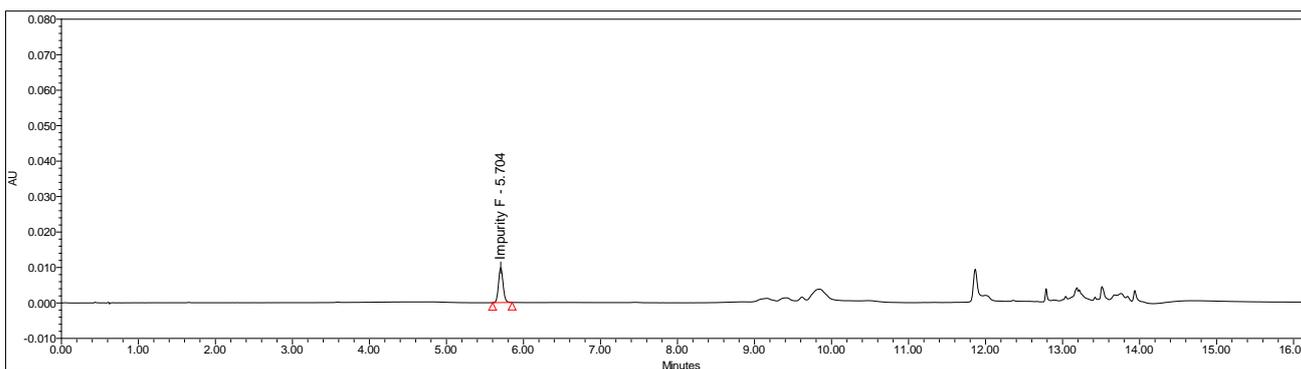


Figura 29- Cromatograma da Impureza F em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

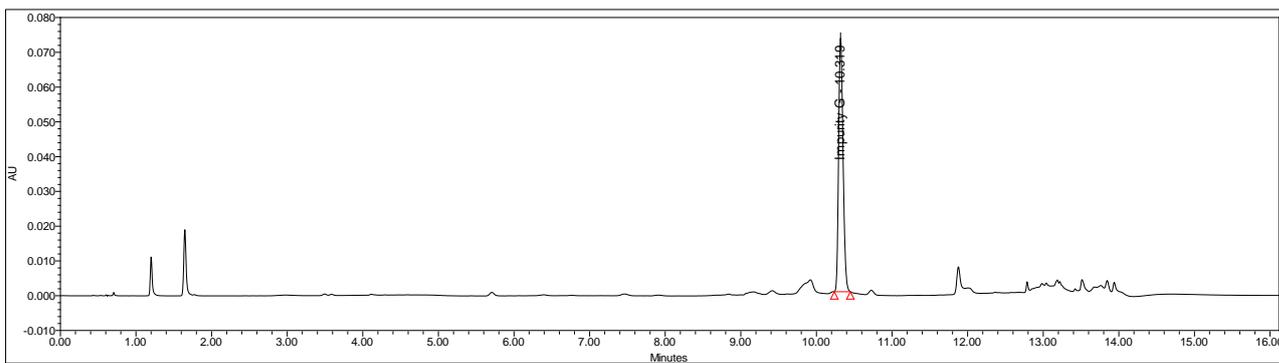


Figura 30- Cromatograma da Impureza G em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

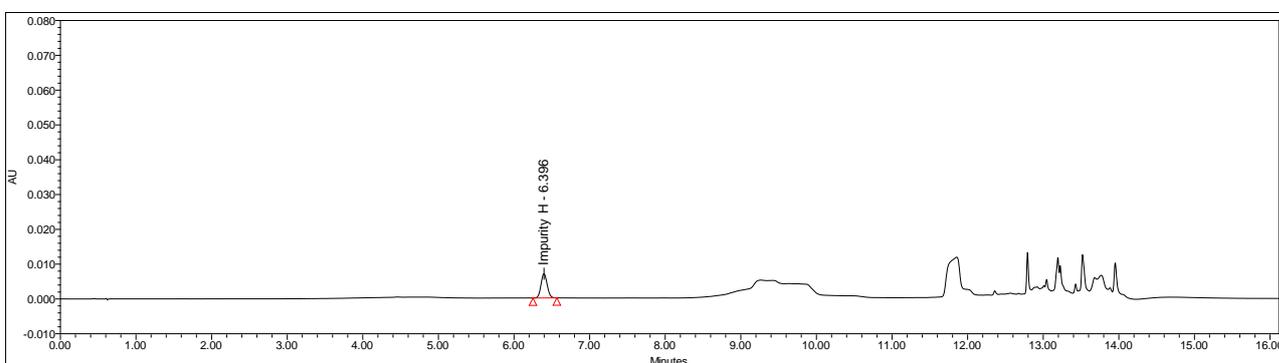


Figura 31- Cromatograma da Impureza H em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

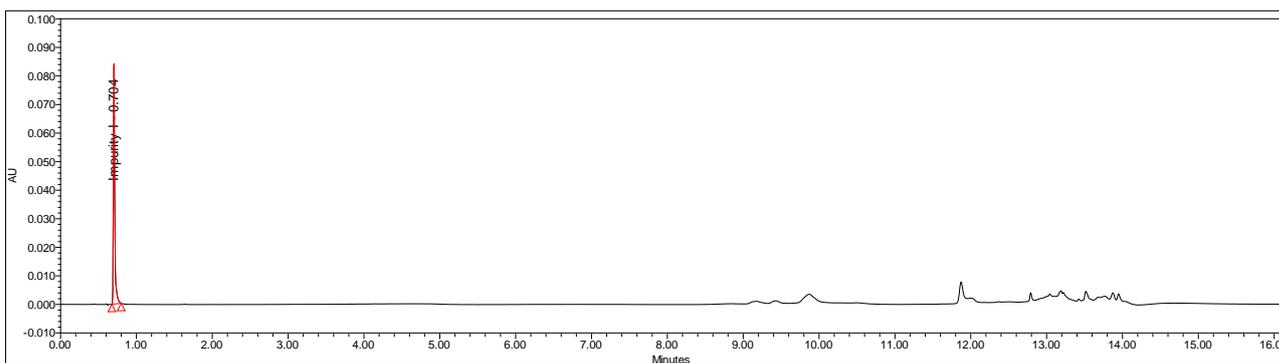


Figura 32- Cromatograma da Impureza I em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

Tabela 24- Resumo dos tempos de retenção das impurezas no ensaio de seletividade do método de compostos relacionados

Impurezas	Tempo de retenção (minutos)	Cromatograma
A	3.611	Figura 25
B	7.897	Figura 26
C	7.211	Figura 27
E	6.656	Figura 28
F	5.704	Figura 29
G	10.319	Figura 30
H	6.396	Figura 31
I	0.704	Figura 32

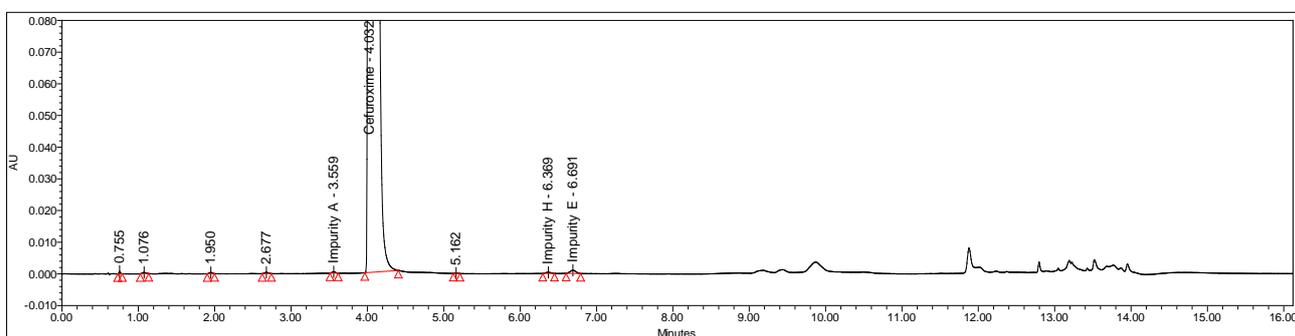


Figura 33- Cromatograma da solução amostra Cefuroxime a 1mg/ml em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados

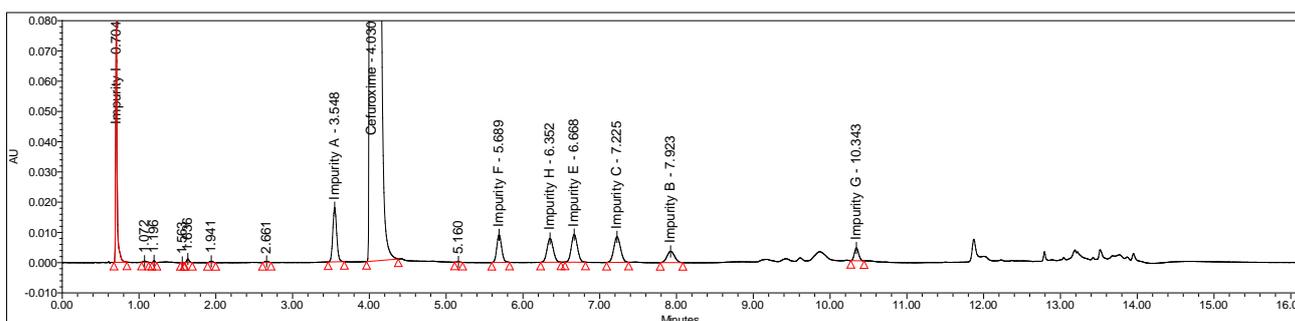


Figura 34- Cromatograma da solução Cefuroxime "Spiked" em ensaios de seletividade do método de compostos relacionados