

Andreia Filipa de Jesus Gonçalves

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica

Tese de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre

Trabalho desenvolvido sob orientação do Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra e Vice-presidente, Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. e da Doutora Cláudia Liliana de Bastos Sousa Silva, Diretora de Investigação, Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

Janeiro, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Sérgio Simões, pela oportunidade de realizar a tese de mestrado na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.

À Doutora Cláudia Silva, co-orientadora, pelas reuniões semanais, pela presença e disponibilidade ao longo deste ano e por toda a orientação científica.

À Doutora Cláudia Gama, diretora do Laboratório de Controlo de Qualidade da Bluepharma, por me ter ajudado a tornar possível a execução prática da tese. A todos os colegas do laboratório com quem trabalho diariamente, pelo apoio e força nos dias mais difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Investigação & Desenvolvimento da Bluepharma, que me ajudaram a perceber o que significa desenvolver e validar métodos analíticos em HPLC. Em especial à Alexandra Gonçalves, amiga e colaborada deste departamento, pela ajuda, disponibilidade e amizade.

À Adriana, companheira na realização deste projeto, pelas muitas horas de trabalho passadas no laboratório.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio, dedicação e força.

Ao Tiago, pelo carinho, coragem e paciência ao longo da execução deste projeto.

A todos os amigos, pela amizade e palavras de incentivo.

A todos o meu muito obrigado.

Índice

Agradecimentos	
Resumo	I
Abstract	II
Lista de Abreviaturas	III
Lista de Figuras	V
Lista de Tabelas	VII
Lista de Gráficos	XI
Capítulo I – Introdução Geral	I
1 A pele	2
2 Tratamentos tópicos	3
2.1 Dor	3
2.2 Anestésicos Locais	3
2.2.1 Mistura Eutética de Anestésicos Locais (EMLA ®)	4
3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	6
3.1 Introdução	6
3.2 Fundamentos teóricos	6
3.3 Componentes de um sistema de HPLC	7
3.3.1 Componentes instrumentais	8
3.3.2 Componentes químicas	10
3.4 Interpretação de cromatogramas e principais definições	10
3.4.1 Tempo de retenção e volume de retenção	11
3.4.2 Fator de retenção (k')	11
3.4.3 Retenção Relativa (r)	12
3.4.4 Tempo de retenção relativo (RRT)	12
3.4.5 Número de pratos teóricos (N)	12
3.4.6 Fator de simetria (A_s)	13
3.4.7 Resolução (R_s)	13
3.4.8 Razão peak-to-valley (p/v)	14
3.4.9 Razão Sinal/Ruído (S/N)	14
4 Validação de métodos analíticos em HPLC	15
4.1 Introdução	15
4.2 Definição dos parâmetros analíticos de validação	16

4.2.1	Especificidade.....	16
4.2.2	Linearidade.....	16
4.2.3	Gama de trabalho	17
4.2.4	Precisão do método.....	17
4.2.5	Exatidão.....	19
4.2.5.1	Recuperação	19
4.2.6	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	20
4.2.7	Robustez.....	21
4.2.8	Estabilidade das soluções	22
4.2.9	Filtração	23
4.2.10	Teste de Conformidade do Sistema.....	23
4.3	Critérios de aceitação para os parâmetros de validação dos métodos analíticos	23
5	Desenho de Experiências – Metodologia de trabalho <i>Quality by Design (QbD)</i>	25
5.1	Introdução ao <i>QbD</i>	25
5.2	Princípios do <i>QbD</i>	25
5.2.1	Objetivos do <i>QbD</i>	26
5.2.1.1	Perfil do Produto Alvo (TPP).....	26
5.2.1.2	Perfil de Qualidade do Produto Alvo (TPQP)	26
5.2.1.3	Características Críticas de Qualidade (CQA)	26
5.3	<i>Quality by Design</i> : Ferramentas.....	27
5.3.1	Desenho de experiências (DoE)	27
5.4	<i>Quality by Design</i> e Métodos analíticos.....	27
5.5	Conclusões	28
Capítulo II – Objetivos da Tese.....		30
Capítulo III – Materiais e Métodos		33
1	Materiais e Equipamentos.....	34
1.1	Reagentes.....	34
1.2	Substâncias ativas / Impurezas.....	34
1.3	Equipamentos.....	35
1.4	Colunas Cromatográficas.....	35
1.5	Material Auxiliar	35
2	Métodos.....	36
2.1	Preparação da Fase móvel/Solvente.....	36

2.2	Preparação de soluções para os estudos preliminares de desenvolvimento.....	37
2.3	Preparação de soluções para desenvolvimento do método analítico de conteúdo .	37
2.4	Preparação de soluções para desenvolvimento do método analítico de impurezas	37
2.5	Preparação das amostras para o estudo de degradação forçada	39
2.6	Preparação de soluções para validação do método de conteúdo	40
2.7	Preparação de soluções para validação do método de impurezas	41
Capítulo IV – Desenvolvimento dos Métodos Analíticos.....		44
1	Metodologia de Trabalho.....	45
2	Estudos preliminares de desenvolvimento	46
3	Desenvolvimento do método analítico para determinação do conteúdo de duas substâncias ativas	47
3.1	Experiências com colunas cromatográficas e gradientes	47
3.2	Determinação da fase móvel com recurso ao DoE	49
3.3	Interpretação dos resultados do DoE.....	52
3.4	Condições cromatográficas	61
4	Desenvolvimento do método analítico para determinação do perfil de impurezas	63
4.1	Experiências com colunas cromatográficas e gradientes	63
4.2	Estudo de degradação forçada	69
4.3	Determinação das condições do método analítico com recurso ao DoE.....	70
4.4	Interpretação dos resultados do DoE.....	73
4.5	Condições cromatográficas	82
Capítulo V – Validação dos Métodos Analíticos.....		85
1	Validação do método analítico para quantificação de conteúdo da prilocaína e lidocaína	86
1.1	Testes de filtração.....	86
1.2	Especificidade	89
1.3	Linearidade	90
1.4	Precisão do sistema	92
1.5	Precisão do método	93
1.6	Exatidão.....	94
1.7	Estudo de Estabilidade das soluções	96
1.8	Robustez	98

2	Validação do método analítico para determinação do perfil de impurezas da prilocaína e lidocaína	109
2.1	Testes de filtração.....	109
2.2	Especificidade	113
2.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	115
2.4	Linearidade	117
2.5	Precisão do sistema	124
2.6	Precisão do método	125
2.7	Exatidão.....	126
2.8	Estudo da estabilidade das soluções	128
2.8.1	Estudo da estabilidade dos padrões.....	129
2.8.2	Estudo da estabilidade das amostras	130
	Capítulo VI – Conclusões e Perspetivas Futuras	129
	Capítulo VII – Referências Bibliográficas.....	131
	Capítulo VIII – Anexos	138
1	Cromatogramas do desenvolvimento dos métodos analíticos	144
1.1	Estudos preliminares de desenvolvimento de métodos analíticos.....	144
1.2	Desenvolvimento do método analítico para determinação do conteúdo.....	144
1.3	Desenvolvimento do método analítico para determinação do perfil de Impurezas	145
2	Cromatogramas da validação dos métodos analíticos	148
2.1	Validação do método analítico para quantificação de conteúdo	148
2.2	Validação do método analítico para determinação do perfil de impurezas.....	149

Resumo

O presente trabalho teve como objetivos desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação do conteúdo de dois princípios ativos numa formulação tópica e determinação do seu perfil de impurezas. Os métodos analíticos foram desenvolvidos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com recurso a um método estatístico, desenho de experiências.

O desenho de experiências permitiu estudar vários fatores em simultâneo, neste caso, as condições experimentais variáveis do método analítico, e respetivas interações entre esses fatores, bem como identificar os fatores ou interações de fatores que afetavam o cromatograma, facilitando a otimização do método analítico.

Os parâmetros avaliados na validação dos métodos analíticos foram a linearidade, especificidade, gama de trabalho, estabilidade das soluções, limites de deteção e quantificação, precisão, exatidão e recuperação.

Este trabalho permitirá, em análises futuras de Controlo de Qualidade, identificar e quantificar, simultaneamente, de forma exata e específica dois princípios ativos numa formulação tópica.

Abstract

The aim of this work was to develop and validate analytical methods for assay quantification of two active ingredients in a topical formulation and determination of the impurities profile. The analytical methods were developed in High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using a statistical method, the design of experiments.

The design of experiments allowed: a) the simultaneous study of the influence of several factors (the experimental conditions of the analytical method); b) the determination of the interactions between these factors allowing the identification of the factors or interactions that can affect the chromatogram, facilitating the optimization of the analytical method.

The parameters evaluated in the validation of the analytical methods were the linearity, specificity, range, stability of solutions, limits of detection and quantification, precision, accuracy and recovery.

This work will allow an accurate and selective identification of two different active ingredients as well as their quantification in a topical formulation, in future analysis of quality control.

Lista de Abreviaturas

ACN – Acetonitrilo

ANOVA – Análise de Variância (do inglês “*Analysis of Variance*”)

A_p – Área do pico da solução padrão

A_{RF} – Área da fórmula reconstituída

ATP – Perfil Analítico Alvo (do inglês “*Analytical Target Profile*”)

CI – Intervalo de confiança (do inglês “*Confidence Interval*”)

C_p – Concentração do padrão (mg/mL)

C_{RF} – Concentração da substância ativa na fórmula reconstituída (mg/mL)

CQA – Características Críticas de Qualidade (do inglês “*Critical Quality Attributes*”)

CV – Coeficiente de Variação

°C – graus Celsius

DoE – Desenho de Experiências (do inglês “*Design of Experiments*”)

EMLA – Mistura Eutética de Anestésicos Locais (do inglês “*Eutectic Mixture of Local Anesthetics*”)

FDA – do inglês “*Food and Drug Administration*”

FM – Fase móvel

h – tempo em horas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)

HPLC-PDA – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor de arranjo de díodos (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography - Photo Diode Array*”)

ICH – Conferência Internacional de Harmonização (do inglês “*International Conference on Harmonisation*”)

ISAP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês “*International Association for the Study of Pain*”)

K Prime (k') – fator de retenção ou de capacidade

LD – Limite de detecção

Lidocaína HCl – Hidrocloridrato de Lidocaína

LQ – Limite de quantificação

mg – miligrama

mL – mililitros

min – tempo em minutos

N – número de pratos teóricos

nm – nanómetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

p.a. – para análise

ppb – partes por bilião

ppm – partes por milhão

Prilocaina HCl – Hidrocloridrato de Prilocaina

QbD – do inglês “*Quality by Design*”

r – coeficiente de correlação

RF – fator de resposta (do inglês “*Response Factor*”)

RRF – fator de resposta relativo (do inglês “*Relative Response Factor*”)

RSD – desvio padrão relativo (do inglês “*relative standard deviation*”)

RT – tempo de retenção (do inglês “*Retention Time*”)

RTT – tempo de retenção relativo (do inglês “*Relative Retention Time*”)

$\frac{S}{R}$ – Razão Sinal/Ruído

SD ou *s* (símbolo σ) – desvio padrão (do inglês “*standard deviation*”)

SOP – Procedimento operacional padrão (do inglês “*Standard Operating Procedures*”)

TPP – Perfil de Produto Alvo (do inglês “*Target Product Profile*”)

TPQP – Perfil de Qualidade do Produto Alvo (do inglês “*Target Product Quality Profile*”)

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos da América (do inglês “*United States Pharmacopoeia*”)

WS – Padrão de trabalho (do inglês “*Working Standard*”)

λ – Comprimento de onda

μL – microlitros

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da pele humana. Adaptado de [5].	2
Figura 2. Representação esquemática dos anestésicos locais do tipo éster e amida, respectivamente. Adaptado de [16].	4
Figura 3. Representação esquemática dos componentes de um equipamento de HPLC. Adaptado de [30].	8
Figura 4. Tipos de ligantes de fases estacionárias. Adaptado da Ph. Eur. 7.0 <2.2.29> [29].	10
Figura 5. Representação esquemática de separação cromatográfica de duas substâncias ativas.	11
Figura 6. Pico cromatográfico assimétrico. Retirado da USP36-NF31 <624> [28].	13
Figura 7. Razão <i>peak-to-valley</i> . Retirado da USP36-NF31 <624> [28].	14
Figura 8. Determinação da razão S/N, pico cromatográfico e ruído. Retirado da Ph. Eur. 7.0 <2.2.46> [32].	14
Figura 9. Limites de aceitação para os parâmetros necessários à validação analítica.	24
Figura 10. Desenvolvimento analítico baseado no conceito de <i>QbD</i> . Adaptado de [50].	28
Figura 11. <i>Screening Design</i> : Introdução de fatores, respostas e objetivos no <i>software</i> JMP (método conteúdo).	50
Figura 12. <i>Design List</i> : escolha do tipo de desenho fatorial.	50
Figura 13. Tabela de <i>full factorial</i> com as experiências a realizar para desenvolvimento do método de conteúdo.	51
Figura 14. Influência dos fatores acetonitrilo e volume de injeção nas respostas. (a – <i>Screening</i> para a resolução entre os picos de Prilocaina HCl e Lidocaína HCl; b – <i>Screening</i> para a simetria da Prilocaina HCl; c – <i>Screening</i> para a simetria da Lidocaína HCl; d – <i>Screening</i> para o número de pratos teóricos da Prilocaina HCl; e – <i>Screening</i> para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl).	54
Figura 15. Gráfico de perfil da influência dos fatores (acetonitrilo e volume de injeção) nas respostas (resolução, simetria e nº de pratos teóricos para ambas as substâncias ativas).	57
Figura 16. Gráfico de perfil da influência dos fatores nas respostas com 28 % e 30 % de ACN, respectivamente (Experiência 9 e 12, da Tabela 16).	58
Figura 17. Gráfico de contorno para determinar proporção da fase móvel (tampão: acetonitrilo [72:28% V/V]).	59
Figura 18. Gráfico de contorno para determinar proporção da fase móvel (tampão: acetonitrilo [70:30% V/V]).	59
Figura 19. Gráfico de superfície representativa da zona de trabalho para o modelo matemático obtido (método conteúdo).	60
Figura 20. <i>Screening Design</i> : Introdução de fatores, respostas e objetivos no <i>software</i> JMP (método impurezas).	71
Figura 21. <i>Design List</i> : escolha do tipo de desenho fatorial em blocos.	71
Figura 22. Tabela de <i>full factorial</i> com as experiências a realizar (método impurezas).	72
Figura 23. Influência dos fatores fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna nas respostas em estudo. (a – <i>Screening</i> da resolução entre os picos de Prilocaina HCl e a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina; b – <i>Screening</i> para a simetria da Prilocaina HCl; c – <i>Screening</i> para a simetria da Lidocaína HCl; d – <i>Screening</i> para o número de pratos teóricos	

da Prilocaina HCl; e – <i>Screening</i> para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl; f – <i>Screening</i> para a % da impureza o-toluidina; g – <i>Screening</i> para a % da impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina; h - <i>Screening</i> para a % da impureza dimetilnilina; i - <i>Screening</i> para a % da impureza 2-dietilaminoaceto- 2,4 –xilidina).	77
Figura 24. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Temperatura da coluna versus Fluxo.	80
Figura 25. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Temperatura versus Volume de injeção.	81
Figura 26. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Fluxo versus Volume de injeção,	81
Figura 27. Perfil da influência dos fatores (fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna) nas condições SOP.	82
Figura 28. <i>Screening Design</i> : Introdução de fatores, respostas e objetivos no <i>software</i> JMP para avaliação da robustez do método de conteúdo.	100
Figura 29. Tabela de <i>full factorial</i> com as experiências a realizar para avaliar a robustez do método.	100
Figura 30. Influência dos fatores fluxo de trabalho, volume de injeção e temperatura da coluna nas respostas para avaliação da robustez (a - <i>Screening</i> para a simetria da Prilocaina HCl; b - <i>Screening</i> para a simetria da Lidocaína HCl; c – <i>Screening</i> para o número de pratos teóricos da Prilocaina HCl; d – <i>Screening</i> para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl; e – <i>Screening</i> para a % de recuperação da Prilocaina HCl; f – <i>Screening</i> para a % de recuperação da Lidocaína HCl).	104
Figura 31. Perfil da influência dos fatores nas respostas com <i>Maximize Desirabilities</i> para avaliar a robustez do método.	106
Figura 32. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Fluxo versus Volume de injeção (Robustez do método conteúdo).	106
Figura 33. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Fluxo versus Temperatura da coluna (Robustez do método conteúdo).	107
Figura 34. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Volume de injeção versus Temperatura (Robustez do método conteúdo).	107

Lista de Tabelas

Tabela 1. Anestésicos locais do tipo éster e amida, respetivamente. Adaptado de [17].	4
Tabela 2. Parâmetros de validação de acordo com o método analítico.	15
Tabela 3. Indicação dos <i>thresholds</i> a considerar com base na dose diária máxima. Adaptado de [41].	21
Tabela 4. Objetivos específicos para o desenvolvimento dos métodos analíticos.	30
Tabela 5. Objetivos específicos para a validação do método de conteúdo.	31
Tabela 6. Objetivos específicos para a validação do método de impurezas.	32
Tabela 7. Substâncias ativas e impurezas usadas no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos.	34
Tabela 8. Colunas cromatográficas testadas no desenvolvimento dos métodos analíticos.	35
Tabela 9. Preparação de soluções <i>stock</i> de impurezas para desenvolvimento e validação do método de impurezas.	38
Tabela 10. Preparação de amostras para o estudo de degradação forçada.	39
Tabela 11. Resumo das condições analíticas referidas na USP36-NF31 relativas à monografia “ <i>Lidocaine and Prilocaine Cream</i> ”.	45
Tabela 12. Composição da formulação tópica com as duas substâncias ativas.	46
Tabela 13. Experiências analíticas com diferentes colunas e gradientes (método de conteúdo).	47
Tabela 14. Resultados das experiências descritas na tabela 13 (método de conteúdo).	48
Tabela 15. Condições do sistema para realizar o DoE no desenvolvimento do método analítico de conteúdo.	51
Tabela 16. Resultados das experiências obtidas no DoE para o desenvolvimento do método de conteúdo.	52
Tabela 17. Avaliação estatística da influência dos fatores nas respostas em estudo (método de conteúdo).	55
Tabela 18. Resultados obtidos versus resultados previstos com base na avaliação estatística (método de conteúdo).	56
Tabela 19. Condições cromatográfica para a validação do método de conteúdo.	61
Tabela 20. Colunas cromatográficas escolhidas com base em referências bibliográficas.	63
Tabela 21. Condições das experiências analíticas com diferentes colunas cromatográficas e respetivos resultados (método de impurezas).	64
Tabela 22. Programa gradiente 1 com o canal C do HPLC em acetonitrilo.	65
Tabela 23. Programa gradiente 2 com o canal C do HPLC em acetonitrilo.	65
Tabela 24. Programa gradiente 3 (Desenvolvimento do método impurezas).	66
Tabela 25. Programa gradiente 4 (Desenvolvimento do método impurezas).	66
Tabela 26. Programa gradiente 5 (Desenvolvimento do método impurezas).	67
Tabela 27. Programa gradiente 6 para avaliar a resolução entre a substância ativa e a impureza.	67
Tabela 28. Programa gradiente 7 para avaliar a resolução entre a substância ativa e a impureza.	68
Tabela 29. Programa gradiente 8 para avaliar a resolução entre a substância ativa e a impureza.	68

Tabela 30. Condições de degradação forçada para as substâncias ativas.	69
Tabela 31. Resultados da degradação forçada por oxidação.	70
Tabela 32. Avaliação das impurezas em relação às condições SOP.	73
Tabela 33. Resultados do desenho de experiências do método de impurezas para a substância ativa Prilocaina HCl.	74
Tabela 34. Resultados do desenho de experiências do método de impurezas para a substância ativa Lidocaína HCl.	75
Tabela 35. Análise estatística da influência dos fatores nas respostas (método de impurezas).	79
Tabela 36. Resultados previstos com base na avaliação estatística (método de impurezas)...	79
Tabela 37. Condições cromatográficas para a validação do método de impurezas.	82
Tabela 38. Identificação, tempos de retenção e respectivos tempos de retenção relativos (método impurezas).	84
Tabela 39. Resultados dos testes de filtração para a substância ativa Prilocaina HCl (método conteúdo).	87
Tabela 40. Resultados dos testes de filtração para a substância ativa Lidocaína HCl (método conteúdo).	87
Tabela 41. Resumo com a avaliação dos resultados dos testes de filtração para as duas substâncias ativas	88
Tabela 42. Resultados obtidos para os parâmetros de conformidade a partir da solução de fórmula reconstituída (método conteúdo).	89
Tabela 43. Resultados da linearidade para Prilocaina HCl (método de conteúdo).	90
Tabela 44. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Prilocaina HCl (método de conteúdo).	91
Tabela 45. Resultados da linearidade da Lidocaína HCl (método de conteúdo).	91
Tabela 46. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Lidocaína HCl (método de conteúdo).	92
Tabela 47. Resultados da precisão do sistema para Prilocaina HCl.	92
Tabela 48. Resultados da precisão do sistema para Lidocaína HCl.	93
Tabela 49. Resultados da precisão do método para as duas substancias ativas.	94
Tabela 50. Resultados de recuperação para a Prilocaina HCl (método conteúdo).	95
Tabela 51. Resultados de recuperação para a Lidocaína HCl (método conteúdo).	95
Tabela 52. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para Prilocaina HCl (método conteúdo).	96
Tabela 53. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para Lidocaína HCl (método conteúdo).	97
Tabela 54. Avaliação dos desvios e do <i>p-value</i> para as soluções padrão (método conteúdo).	97
Tabela 55. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para Prilocaina HCl (método conteúdo).	97
Tabela 56. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para Lidocaína HCl (método conteúdo).	98
Tabela 57. Avaliação dos desvios e do <i>p-value</i> para as soluções amostra (método conteúdo).	98
Tabela 58. Resultados do DoE para o método de Conteúdo para a substância ativa Prilocaina HCl.	101

Tabela 59. Resultados do DoE para o método de Conteúdo para a substância ativa Lidocaína HCl.....	102
Tabela 60. Avaliação estatística da influência dos fatores nas respostas para avaliar a robustez do método.....	104
Tabela 61. Resultados obtidos versus resultados previstos para avaliar a robustez do método (método conteúdo).....	105
Tabela 62. Resultados dos testes de filtração para a Prilocaina HCl (método impurezas)....	110
Tabela 63. Resultados dos testes de filtração para a Lidocaína HCl (método impurezas)....	110
Tabela 64. Resultados dos testes de filtração para a impureza o-toluidina (método impurezas).....	111
Tabela 65. Resultados dos testes de filtração para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina (método impurezas).....	111
Tabela 66. Resultados dos testes de filtração para a impureza dimetilanilina (método impurezas).....	112
Tabela 67. Resultados dos testes de filtração para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina (método impurezas).....	112
Tabela 68. Resumo com a avaliação dos resultados dos testes de filtração para as duas substâncias ativas e impurezas (método impurezas).....	113
Tabela 69. Avaliação dos parâmetros de conformidade para solução de fórmula reconstituída com impurezas.	114
Tabela 70. Limite de detecção e limite de quantificação calculados através da razão sinal/ruído (S/R) retirados do cromatograma 21 (Consultar Anexos).	115
Tabela 71. Recuperação e precisão para as duas substâncias ativas no limite de quantificação.	116
Tabela 72. Recuperação e precisão para as impurezas no limite de quantificação.....	116
Tabela 73. Resultados da linearidade para a substância ativa Prilocaina HCl (método de impurezas).....	117
Tabela 74. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Prilocaina HCl (método de impurezas).....	118
Tabela 75. Resultados da linearidade para a substância ativa Lidocaína HCl (método de impurezas).....	118
Tabela 76. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Lidocaína HCl (método de impurezas).....	119
Tabela 77. Resultados da linearidade para a impureza o-toluidina.....	119
Tabela 78. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza o-toluidina.	120
Tabela 79. Resultados da linearidade para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.....	120
Tabela 80. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.....	121
Tabela 81. Resultados da linearidade para a impureza dimetilanilina.....	121
Tabela 82. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza dimetilanilina.	122
Tabela 83. Resultados da Linearidade para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.	122
Tabela 84. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.....	123

Tabela 85. Determinação dos fatores de respostas de relativos (RRF).....	123
Tabela 86. Avaliação da precisão do sistema para a solução padrão das substâncias ativas (método de impurezas).....	124
Tabela 87. Avaliação da precisão do sistema para as impurezas (método de impurezas).	124
Tabela 88. Resultados da precisão do método para as impurezas (método impurezas).	125
Tabela 89. Resultados de recuperação para a impureza o-toluidina.....	127
Tabela 90. Resultados de recuperação para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.....	127
Tabela 91. Resultados de recuperação para a impureza dimetilnilina.....	127
Tabela 92. Resultados de recuperação para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.	128
Tabela 93. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para a Prilocaína HCl (método impurezas).....	129
Tabela 94. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para a Lidocaína HCl (método impurezas).....	129
Tabela 95. Avaliação das % de alteração em relação ao t=0h e do <i>p-value</i> para as soluções padrão de ambas as substâncias ativas (método impurezas).	130
Tabela 96. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza o-toluidina (limite de especificação 2,0%).....	130
Tabela 97. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina (limite de especificação 0,1%).....	131
Tabela 98. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza dimetilnilina (limite de especificação 0,1%).....	131
Tabela 99. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina (limite de especificação 0,1%).....	132
Tabela 100. Avaliação das % de alteração em relação ao t=0h e do <i>p-value</i> para as impurezas.	132

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Curva de linearidade da Prilocaína HCl (método de conteúdo).....	90
Gráfico 2. Curva de linearidade Lidocaína HCl (método de conteúdo).....	91
Gráfico 3. Curva de linearidade Prilocaína HCl (método de impurezas).....	117
Gráfico 4. Curva de linearidade Lidocaína HCl (método de impurezas).....	118
Gráfico 5. Curva de linearidade da impureza o-toluidina.....	119
Gráfico 6. Curva de linearidade da impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.....	120
Gráfico 7. Curva de linearidade da impureza dimetilnilina.....	121
Gráfico 8. Curva de linearidade da impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.....	122

Capítulo I – Introdução Geral

I A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, ocupa uma área aproximada de 1,5-2 m² e representa cerca de 16% da massa total do corpo [1-3]. A sua espessura média é de 0,5 mm, mas varia consoante a localização e a idade do indivíduo [1].

A pele é um órgão complexo, que contém muitas células e estruturas diferenciadas e especializadas [2-4]. Como se pode ver na Figura 1 [5], a pele é constituída por três camadas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo ou hipoderme. Existem também vários apêndices e glândulas associadas [3,6].

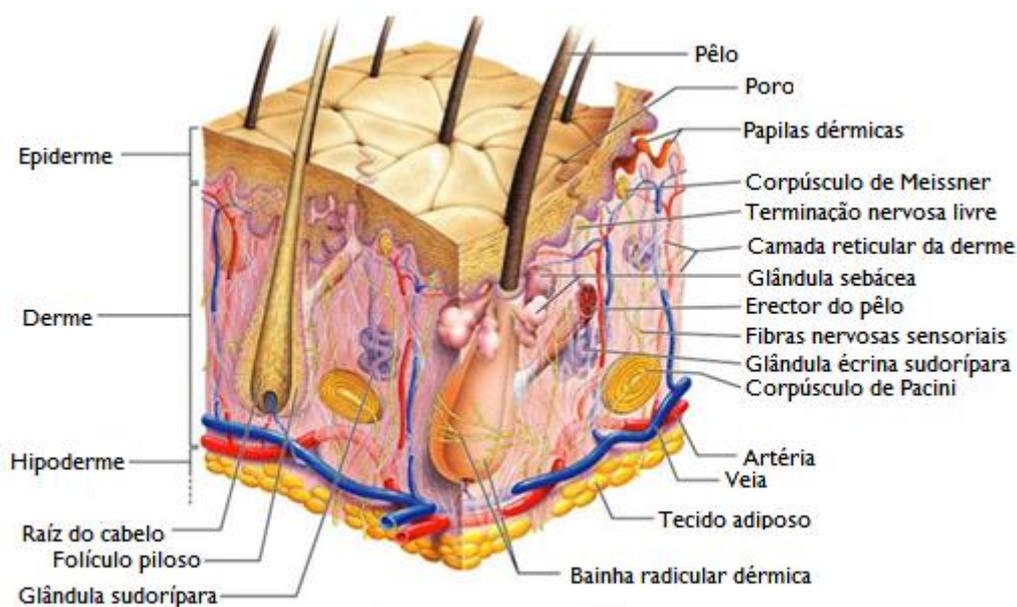


Figura 1. Representação esquemática da pele humana. Adaptado de [5].

A pele é um órgão dinâmico em constante estado de mudança, regeneração e reparação [3]. É fundamental conhecer a estrutura anatômica da pele para compreender as suas funções [3]. As principais funções da pele são de proteção (barreira entre o organismo e o meio externo), regulação (perda de água, nutrientes e regulação da temperatura corporal) e sensorial (percepção de sensações, como a dor e o toque) [2,3,7].

A pele desempenha também um papel muito importante na proteção contra a radiação ultravioleta (UV). Contudo a radiação UV é necessária para que haja síntese da vitamina D. Esta atua como uma hormona que estimula a absorção do cálcio e de fosfatos no trato gastrointestinal sendo fundamental para o metabolismo ósseo normal e é ainda indispensável para o sistema nervoso e muscular [3,7,8].

2 Tratamentos tópicos

2.1 Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência multidimensional desagradável, envolvendo não só um componente sensorial mas também um componente emocional, e que se associa a uma lesão tecidual concreta ou potencial, ou é descrita em função dessa lesão” [9]. A patogênese da dor envolve fundamentalmente três aspetos: fatores nociceptivos, emocionais (medo e depressão) e comportamentais [10].

Os neurónios sensoriais, também designados por nociceptores, encontram-se localizados na pele e mucosas, bem como nos órgãos internos. A perceção de dor ocorre quando os nociceptores são estimulados e transmitem sinais através dos neurónios sensoriais da medula espinhal. Os sinais são posteriormente enviados para o hipotálamo, a nível cerebral, onde ocorre a perceção de dor. A partir do tálamo, os sinais são transmitidos às estruturas subcorticais, provocando a sensação de dor [6].

Existem várias vias de entrega de fármacos que têm como objetivo bloquear a dor. Neste sentido tem surgido o uso de formulações tópicas, em que se pretende a ação terapêutica local de um ou mais princípios ativos anestésicos, com o mínimo de efeitos sistémicos [10].

Os anestésicos locais são fármacos usados para o alívio da dor após uma lesão ou para diminuir o desconforto durante alguns tratamentos. Estes são eficazes no alívio da dor em intervenções cutâneas, procedimentos a laser ou cirúrgicos [10-12].

Os anestésicos locais têm como mecanismo de ação bloquear reversivelmente a condução do impulso nervoso através do bloqueio dos canais de sódio inibindo assim o potencial de ação [13-15].

2.2 Anestésicos Locais

Os anestésicos tópicos encontram-se disponíveis comercialmente na forma de líquidos, géis, cremes, pomadas, emulsões ou adesivos que contêm uma ou mais substâncias ativas que têm um efeito anestésico local quando aplicados topicamente sobre ou em torno do local da dor [10,11].

Os anestésicos tópicos são geralmente bases fracas e são constituídos por três componentes importantes: um anel aromático, um ligante intermediário e uma amina terciária [11,12,16]. Os anestésicos locais do tipo éster têm um ligante éster e os anestésicos do tipo amida têm um ligante amida, como se pode ver na Figura 2 [16].

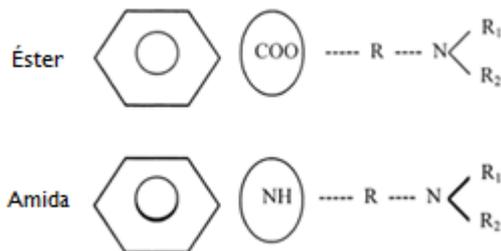


Figura 2. Representação esquemática dos anestésicos locais do tipo éster e amida, respetivamente. Adaptado de [16].

Assim, estes dividem-se em duas classes (ver Tabela 1): amidas (ex: lidocaína, mepivacaína, bupivacaína, prilocaína) e ésteres (ex: cocaína, procaína, tetracaína, benzocaína) [12].

Tabela 1. Anestésicos locais do tipo éster e amida, respetivamente. Adaptado de [17].

Ésteres	Amidas
Benzocaína	Articaína
Cloroprocaína	Bupivacaína
Cocaína	Dibucaína
Procaína	Etidocaína
Proparacaína	Lidocaína
Tetracaína	Levobupivacaína
	Mepivacaína
	Prilocaína
	Ropivacaína

Todos estes anestésicos locais têm efeitos vasodilatadores, com exceção da cocaína que é um vasoconstritor potente [18].

2.2.1 Mistura Eutética de Anestésicos Locais (EMLA®)

O EMLA® é uma mistura eutética de dois anestésicos locais conhecidos, a lidocaína e a prilocaína [19].

Designa-se por mistura eutética, todas as misturas de componentes que numa determinada proporção o seu ponto de fusão é menor que o ponto de fusão de qualquer um dos seus componentes isolados [20,21].

O EMLA ® é uma emulsão óleo/água, comercializada pela AstraZeneca Produtos Farmacêuticos, Lda na forma de bisnaga e penso impregnado, na dosagem de 25 mg/g de lidocaína e 25 mg/g de prilocaína (ambas as substâncias ativas na forma de base) [22].

A lidocaína e prilocaína são anestésicos tópicos do tipo amida. Estes estabilizam as membranas neuronais inibindo os fluxos iónicos necessários para o início e a condução de impulsos, produzindo assim uma anestesia local.

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) o EMLA ® deve ser aplicado sobre a pele intacta sob um penso oclusivo [23].

O EMLA ® tem como indicações terapêuticas a anestesia local [23]:

- 1) da pele, prévia à:
 - inserção de uma agulha (ex: cateteres intravenosos ou colheita de sangue);
 - intervenções cirúrgicas superficiais;
- 2) da mucosa genital em adultos (ex: antes de intervenções cirúrgicas superficiais ou anestesia de infiltração);
- 3) de úlceras de perna em adultos, prévia à limpeza/desbridamento das mesmas.

O tempo necessário para atingir um efeito anestésico fiável na pele intata varia entre 1-2 horas, dependendo do tipo de intervenção e a duração da anestesia após a sua aplicação é de pelo menos 2 horas [23].

A utilização do EMLA ® está contra-indicada nos seguintes casos:

- Hipersensibilidade a anestésicos locais do tipo amida ou a qualquer outro componente do produto;
- Crianças com idade compreendida entre os 0 e 12 meses em tratamento com agentes indutores de meta-hemoglobinémia;
- Doentes com deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase ou meta-hemoglobinémia congénita ou idiopática.

3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3.1 Introdução

A cromatografia é um método de separação de componentes de uma mistura em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase móvel e uma fase estacionária [24,25]. A fase móvel (eluente) pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico ao passo que a fase estacionária pode ser líquida ou sólida [24].

O processo de eluição define-se como a passagem através da fase estacionária por ação da fase móvel [25].

A classificação dos métodos cromatográficos pode ser feita da seguinte forma [26,27]:

- quanto à forma do suporte, dividindo-se em cromatografia de coluna e cromatografia planar (camada fina ou papel);
- quanto aos processos físico-químicos (partição, adsorção e troca iónica);
- quanto à natureza da fase móvel, que pode ser gasosa (GC), líquida (HPLC) ou fluido supercrítico (SFC).

A cromatografia é uma técnica que permite análises qualitativas e quantitativas, sendo hoje uma das técnicas mais aplicadas na Indústria Farmacêutica [28].

3.2 Fundamentos teóricos

A cromatografia foi inventada por Mikhail Twett, um botânico russo, no início do século XX, em 1906. Este descreveu a experiência de separação de componentes de extrato de folhas, em que conseguiu separar pigmentos de cloroplastos em folhas. A técnica de cromatografia sofreu variadíssimos avanços tecnológicos e começou a ser amplamente usada nos anos 60 século XX [24,25].

A técnica de HPLC começou por se denominar por Cromatografia Líquida de Alta Pressão mas no final dos anos 70 com as melhorias de materiais e instrumentação evoluiu então para a abreviatura que conhecemos hoje de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência [24].

A técnica de HPLC pode ser classificada como cromatografia de fase normal ou cromatografia de fase reversa [28,29]:

a. Cromatografia de fase normal

A cromatografia de fase normal caracteriza-se pelo uso de fases estacionárias polares e fases móveis não polares (por exemplo hexano) e é usada quando o componente a separar é equitativamente polar.

Quanto maior a polaridade de um componente, maior a força de adsorção e consequentemente, maior o tempo de retenção, por isso nesta cromatografia as moléculas menos polares eluem primeiro.

Esta técnica é usada para separar isómeros estereoquímicos, diastêromos, compostos aromáticos com baixos pesos moleculares e compostos com longas cadeias alifáticas.

b. Cromatografia de fase reversa

A cromatografia de fase reversa é muito utilizada na indústria farmacêutica. Este método cromatográfico utiliza fases estacionárias não polares e fases móveis polares (soluções tamponadas, soluções aquosas miscíveis com solventes orgânicos como metanol ou acetonitrilo, etc.). Nesta cromatografia as moléculas polares eluem primeiro, ou seja o tempo de retenção destas é menor, enquanto que as moléculas de natureza não polar são mais retidas.

Quanto à eluição a metodologia de HPLC, pode-se efetuar em eluição isocrática ou eluição em gradiente [28]. Um método analítico com eluição isocrática consiste em trabalhar com uma composição de fase móvel constante ao longo do tempo. Um método de eluição gradiente consiste em ter duas ou mais fases móveis cuja proporção de eluição varia ao longo do tempo.

3.3 Componentes de um sistema de HPLC

Um sistema de HPLC é constituído por componentes instrumentais e componentes químicos. Os componentes instrumentais são a bomba, o sistema de injeção, a coluna cromatográfica, o forno, o detetor e o sistema de processamento de dados. Enquanto os componentes químicos são as fases móveis e as fases estacionárias (enchimento das colunas cromatográficas) como se pode ver na Figura 3 [24-26].

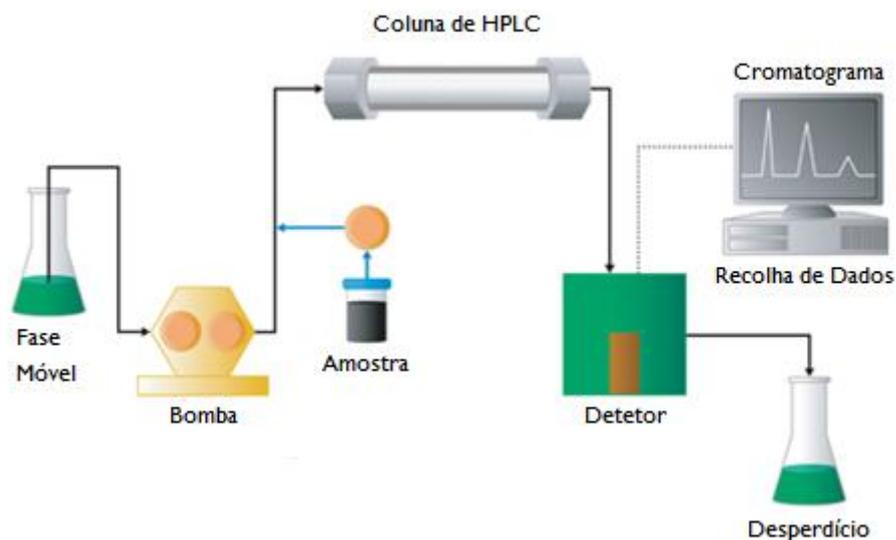


Figura 3. Representação esquemática dos componentes de um equipamento de HPLC. Adaptado de [30].

3.3.1 Componentes instrumentais

a. Bomba

A bomba força a passagem da fase móvel (líquido) ao longo da coluna cromatográfica, fornecendo assim um fluxo específico, que se expressa em mL/min. As bombas são compostas por êmbolos com válvulas que permitem o controlo do fluxo [26,31].

b. Injetor

O injetor serve para introduzir a amostra dissolvida num solvente na corrente de fluxo da fase móvel entrando depois na coluna cromatográfica. O injetor deve ser capaz de suportar as altas pressões do sistema líquido [25].

c. Coluna cromatográfica e forno

As colunas são empacotadas com partículas de fase estacionária específicas e bem caracterizadas, permitindo assim interações dos compostos em análise entre a fase móvel e a fase estacionária [26,28].

O comprimento e o diâmetro interno das colunas influenciam a separação dos compostos em análise. As dimensões típicas das colunas variam entre 5 a 25 cm em

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
Capítulo I
comprimento, com um diâmetro interno de 2 a 5 mm. O enchimento da coluna (fase estacionária) contém micropartículas que podem ter de 3 a 10 μm .

O forno da coluna é onde esta é mantida a uma temperatura constante definida, funcionando como uma câmara termostática [24].

d. Pré-coluna

A pré-coluna é colocada antes da coluna e contém um enchimento com a mesma fase estacionária que a coluna, permitindo assim a remoção de partículas e contaminantes dos solventes. O uso de pré-colunas proporciona um aumento de vida das colunas sem alterar os resultados cromatográficos.

e. Detetor

Os detetores permitem visualizar a separação dos componentes eluídos da coluna e enviam o sinal a um sistema de recolha de dados [25].

Existem diversos tipos de detetores, como por exemplo [24,26,31]:

a. Detetores de Ultravioleta-Visível

Os detetores de UV- visível foram os primeiros a serem usados em cromatografia líquida e são os mais comuns. O detetor de UV – visível mais usado é o que possui um sistema de rede de díodos “*photodiode-array*”, pois permite o varrimento num intervalo de comprimento de onda.

b. Detetores de Índice de Refração

c. Detetores de Fluorescência

Existem ainda outros detetores, como os detetores eletroquímicos de feixe simples ou duplo, os de comprimento de onda fixo (monocromático) ou variável e os detetores de condutividade [31].

f. Recolha de dados

O sistema de recolha de dados é normalmente um computador com um *software* específico, ligado ao HPLC [25].

3.3.2 Componentes químicas

a. Fases móveis

A fase móvel é um líquido que é bombeado para a coluna e efetua o transporte da amostra. A composição das fases móveis são determinantes para a separação cromatográfica e migração de compostos devido às interações químicas [28,29].

b. Fases estacionárias

As fases estacionárias são suportes de pequenas partículas porosas que diferem no seu tamanho, distribuição do tamanho, tipo e quantidade de ligantes [28,29]. Existem vários tipos de fases estacionárias em HPLC, as mais comuns são as de sílica. Em cromatografia de fase normal, a sílica apresenta ligantes de cadeias carbonatadas, como C8 e C18 ou fenil enquanto que em cromatografia de fase reversa, a sílica está ligada a cadeias com grupos ciano, aminas ou dióis (ver Figura 4) [29].

Octil	=Si-[CH ₂] ₇ -CH ₃	C ₈
Octadecil	=Si-[CH ₂] ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Fenil	=Si-[CH ₂] _n -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Cianopropil	=Si-[CH ₂] ₃ -CN	CN
Aminopropil	=Si-[CH ₂] ₃ -NH ₂	NH ₂
Diol	=Si-[CH ₂] ₃ -O-CH(OH)-CH ₂ -OH	

Figura 4. Tipos de ligantes de fases estacionárias. Adaptado da Ph. Eur. 7.0 <2.2.29> [29].

3.4 Interpretação de cromatogramas e principais definições

Um cromatograma é a representação gráfica da resposta do detetor, representando a concentração do analito em função do tempo ou do volume de eluição (ver Figura 5) [28].

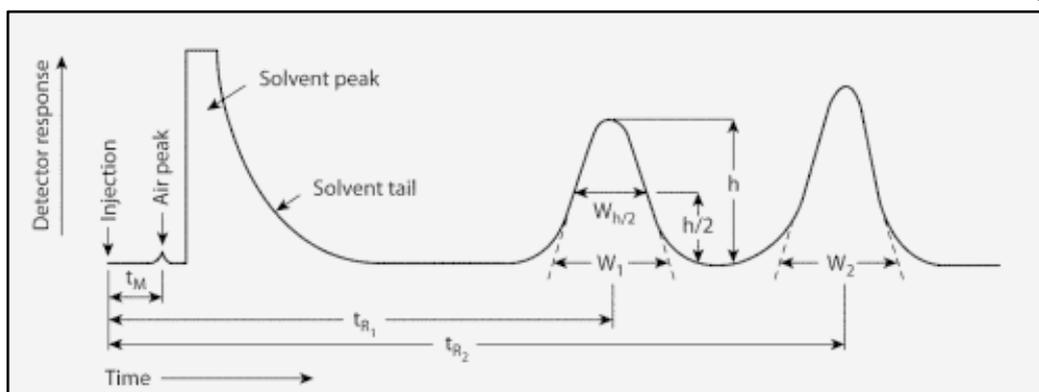


Figura 5. Representação esquemática de separação cromatográfica de duas substâncias ativas.

Retirado da USP36-NF31 <624> [28]. Ver texto abaixo para significado dos símbolos apresentados na Figura.

t_M (tempo morto) – tempo necessário a partir do ponto de injeção para eluir um pico de um componente não retido na coluna;

t_R (tempo de retenção) – tempo que decorre desde a injeção até meia eluição;

h – altura do pico;

$h/2$ – meia-altura do pico;

W – largura do pico na linha de base;

$W_{h/2}$ – largura a meia-altura do pico.

3.4.1 Tempo de retenção e volume de retenção

O tempo de retenção (t_R) é definido como o tempo decorrido entre a injeção da amostra e o aparecimento da resposta de pico máximo do componente; o t_R pode ser usado como um parâmetro de identificação [28].

O volume de retenção (V_R) é o volume de fase móvel necessária para eluir o componente [28]. Este parâmetro depende do tempo de retenção e do fluxo de fase móvel (F) em mL/min, e é calculado através da Equação 1 [28,32]:

$$V_R = t_R \times F \quad (\text{Equação 1})$$

3.4.2 Fator de retenção (k')

O fator de retenção (também conhecido por fator de capacidade) define-se como uma medida de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária, como se pode ver pela Equação 2 [28]:

$$k' = \left(\frac{\text{quantidade de substância na fase estacionária}}{\text{quantidade de substância na fase móvel}} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Este parâmetro cromatográfico calcula-se através da Equação 3 [28]:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{Equação 3})$$

3.4.3 Retenção Relativa (r)

A retenção relativa é a razão entre o tempo de retenção ajustado de um componente em relação à de outro componente, nas mesmas condições analíticas. Este parâmetro é calculado através a seguinte expressão (Equação 4) [28]:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (\text{Equação 4})$$

onde o t_{R2} é o tempo de retenção medido a partir do ponto de injeção do componente de interesse; t_{R1} é o tempo de retenção medido a partir do ponto de injeção do componente de referência.

3.4.4 Tempo de retenção relativo (RRT)

O tempo de retenção relativo calcula-se segundo a seguinte fórmula (Equação 5) e permite ver a relação entre dois picos [28,32].

$$\text{RRT} = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (\text{Equação 5})$$

3.4.5 Número de pratos teóricos (N)

O número de pratos teóricos avalia a eficiência da coluna. Este parâmetro é calculado através da seguinte fórmula (Equação 6) [24]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (\text{Equação 6})$$

onde o t_R é o tempo de retenção da substância, o W é a largura do pico na linha de base e $W_{h/2}$ é largura do pico a meia altura.

O valor de N depende do analito mas também das condições cromatográficas, como o fluxo da fase móvel, da viscosidade da fase móvel, da temperatura da coluna, do seu enchimento e capilaridade, bem como do seu comprimento e diâmetro interno [28].

3.4.6 Fator de simetria (A_S)

O fator de simetria (ou *tailing factor*) é calculado através da Equação 7 [28]:

$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (\text{Equação 7})$$

onde $W_{0,05}$ é largura do pico a uma altura de 5% e f é a distância do pico da linha central ao início do pico, como se pode ver na Figura 6.

Segundo a Farmacopeia Europeia, o valor de 1,0 significa a simetria ideal de um pico [32].

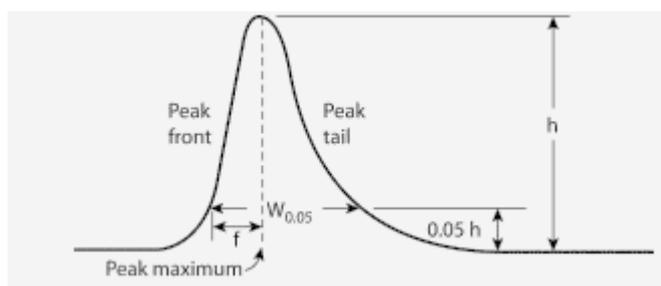


Figura 6. Pico cromatográfico assimétrico. Retirado da USP36-NF31 <624> [28].

3.4.7 Resolução (R_S)

A resolução (R_S) é a separação entre dois picos, e é calculada pela expressão (Equação 8) [24]:

$$R_S = 1.18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{1, \frac{h}{2}} - W_{2, \frac{h}{2}}} \right) \quad (\text{Equação 8})$$

onde o t_{R2} tem de ser maior que t_{R1} ; $W_{1, \frac{h}{2}}$ e $W_{2, \frac{h}{2}}$ correspondem à largura do pico a meia altura de cada componente.

É recomendado pela Farmacopeia Europeia, que a resolução seja superior a 1,5 [32].

3.4.8 Razão *peak-to-valley* (p/v)

A razão *peak-to-valley* pode ser usada no teste de substâncias relacionadas quando a separação da linha de base entre dois picos não é conseguida (ver Figura 7) [28,32].

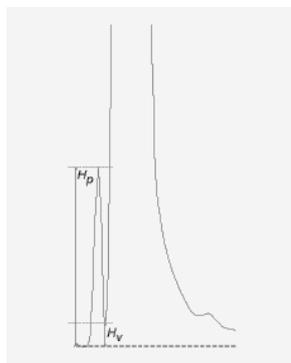


Figura 7. Razão *peak-to-valley*. Retirado da USP36-NF31 <624> [28].

Este parâmetro é calculado pela seguinte fórmula (Equação 9):

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (\text{Equação 9})$$

onde H_p é a altura extrapolada desde a linha de base do pico menor; e H_v é a altura extrapolada a partir da linha de base até ao ponto que separa o pico menor do maior.

3.4.9 Razão Sinal/Ruído (S/N)

A razão sinal-ruído é um parâmetro muito importante na avaliação da conformidade do sistema [28]. Este parâmetro é calculado pela equação 10 [28,32]:

$$\frac{S}{N} = \left(\frac{2H}{h} \right) \quad (\text{Equação 10})$$

onde H é a altura do pico medido a partir do máximo do pico à linha de base, e h é a diferença entre os valores de maior e menor ruído (amplitude do ruído), (ver na Figura 8).

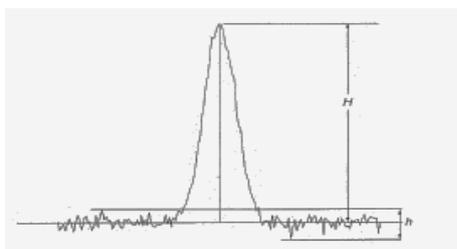


Figura 8. Determinação da razão S/N, pico cromatográfico e ruído. Retirado da Ph. Eur. 7.0 <2.2.46> [32].

4 Validação de métodos analíticos em HPLC

4.1 Introdução

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que ele é adequado para a finalidade proposta (metodologia). Por isso, antes de um método analítico poder ser implementado para ser usado em rotina, o método tem de ser validado [33-35].

O processo de validação é moroso mas vital e fundamental para dar credibilidade ao método analítico desenvolvido [33].

A ICH (*International Conference on Harmonisation*) é uma iniciativa conjunta envolvendo ambos os órgãos reguladores e de pesquisa farmacêutica baseada na indústria (Europa, o Japão e os Estados Unidos da América), como parceiros iguais nas discussões científicas e técnicas sobre os procedimentos de testes que são necessários para garantir e avaliar a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos [36].

Segundo a ICH, consoante o método analítico a ser validado existe uma série de parâmetros que têm que ser avaliados, como se pode ver na Tabela 2 [35,36].

Tabela 2. Parâmetros de validação de acordo com o método analítico.

Parâmetros \ Metodologia	Identificação	Teste de Impurezas		Conteúdo
		Quantificação	Limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão Intermédia	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidade (2)	+	+	+	+
Limite de deteção	-	- (3)	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Gama de trabalho	-	+	-	+

- Característica normalmente não avaliada;

+ Característica normalmente avaliada;

(1) Nos casos em que a reprodutibilidade foi avaliada, não é necessário determinar a precisão intermédia;

(2) A falta de especificidade de um procedimento analítico pode ser compensada por outro procedimento analítico de suporte;

(3) Pode ser necessário em alguns casos.

A validação de um método confere confiança nos procedimentos analíticos e garante assim que os resultados obtidos são fiáveis [33,37].

Por vezes quando ocorrem alterações no procedimento analítico, é necessário efetuar a sua revalidação. Existem diferentes tipos e graus de revalidação consoante a alteração introduzida ao método [38].

4.2 Definição dos parâmetros analíticos de validação

4.2.1 Especificidade

Segundo a ICH, a especificidade de um método é a capacidade para avaliar de forma inequívoca o analito em estudo na presença de componentes que possam estar presentes na amostra. Estes componentes podem ser impurezas, produtos de degradação ou matriz [36].

Como se pode verificar na Tabela 2, a especificidade é parâmetro comum a todos os métodos analíticos, pelo que [36]:

- para o método de identificação: tem que ser assegurada a identificação do analito;
- para o teste de impurezas: tem que se determinar as impurezas do analito;
- para o método de conteúdo: tem que se determinar o conteúdo exato do analito.

Em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), este parâmetro é avaliado em termos de resolução, simetria do pico, número de pratos teóricos e k' .

4.2.2 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra dentro de uma determinada gama de trabalho [36].

A linearidade deve ser estabelecida usando no mínimo cinco concentrações distintas de trabalho [36,39].

Em termos estatísticos, este parâmetro é avaliado através do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. São calculados o declive, a ordenada na origem, o coeficiente de correlação (r) e a soma dos quadrados dos resíduos [39].

Para calcular a percentagem de desvio da ordenada na origem usa-se a seguinte fórmula (Equação 11):

$$\text{desvio \%} = \frac{\text{Ord.Origem}}{\text{Abs}_{100\%}} \times 100, \text{ onde: (Equação 11)}$$

Ord. Origem = ordenada na origem obtida pelo método dos mínimos quadrados (regressão linear);

$\text{Abs}_{100\%}$ = Absorvância média da solução a 100% (conteúdo) ou da solução ao nível da especificação (impurezas).

4.2.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre as concentrações máximas e mínimas do analito na amostra que se podem quantificar com um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade [39].

Segundo a ICH, são especificados os seguintes intervalos mínimos para os diferentes estudos [36]:

- Conteúdo da substância ativa ou do produto acabado: 80-120% da concentração da amostra;
- Uniformidade de conteúdo: entre 70% e 130% da concentração da amostra, ou uma gama mais ampliada caso se justifique;
- Dissoluções: $\pm 20\%$ do intervalo especificado;
- Impurezas: desde o nível reportado da impureza até 120% da especificação.

4.2.4 Precisão do método

Segundo a ICH Q2 (R1), a precisão de um método analítico expressa o grau de concordância dos resultados obtidos em ensaios independentes de uma amostra em condições definidas [36,39,40]. A precisão deve ser avaliada em amostras homogêneas e autênticas do produto para o qual o método irá ser validado [36].

A precisão é expressa como desvio padrão (s), desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) [36,39].

A expressão de desvio padrão é dada pela equação 12 e o RSD (%) pela equação 13:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 12})$$

$$\text{RSD}\% \text{ ou CV} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100, \text{ onde (Equação 13)}$$

x_i , são os valores individuais de uma medição, \bar{x} é a média dos valores individuais e n é o número de valores individuais.

O intervalo de confiança deve ser indicado neste parâmetro de validação [39,40]. Este é calculado através da seguinte fórmula (Equação 14):

$$\text{IC95\%} = R \pm \frac{s \times 4,302653}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde,

IC95% = Intervalo de confiança a 95%;

R = Recuperação (%);

s = desvio padrão;

4,302653 = valor de *t-Student* a um nível de probabilidade de 5% (bi-caudal) com 2 (n-1) graus de liberdade para n=3 ou;

2,570582 = valor de *t-Student* para n=6;

n = número de amostras.

A precisão mede o erro aleatório associado ao procedimento analítico, ou seja, a dispersão dos resultados em torno do seu valor médio [41].

A precisão pode ser avaliada a três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade [36].

a. Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições operacionais num curto intervalo de tempo, com o mesmo analista e equipamento.

A repetibilidade deve ser demonstrada de uma das seguintes formas [36]:

-com um mínimo de nove determinações dentro da gama de trabalho do método analítico, por exemplo três concentrações diferentes/três replicações de cada concentração;

ou

-mínimo de seis determinações a 100%.

b. Precisão Intermédia

A precisão intermédia expressa a variação dentro do mesmo laboratório entre os resultados obtidos em diferentes dias, por diferentes analistas e em diferentes equipamentos [36,39].

c. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade expressa a precisão em laboratórios diferentes (ex: estudos colaborativos) [36,39].

4.2.5 Exatidão

Segundo a ICH Q2 (R1), a exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor que é aceite como um valor verdadeiro ou um valor de referência aceite e o valor encontrado [36].

Este parâmetro é normalmente avaliado a partir da percentagem de recuperação [39].

4.2.5.1 Recuperação

A recuperação deve ser estudada em pelo menos três concentrações diferentes dentro da gama de trabalho, com três replicações por cada concentração [39].

Consoante o método analítico, a recuperação efetua-se da seguinte forma:

- Conteúdo de substância ativa: deve analisar-se o analito de pureza conhecida aplicando o procedimento analítico;
- Conteúdo de produto acabado: deve analisar-se a mistura de excipientes da formulação com adição da(s) substância(s) ativa(s) em causa (fórmula reconstituída);
- Análise de Impurezas: esta análise deve ser feita através do processo de adição das impurezas disponíveis à amostra.

A recuperação é calculada através da seguinte fórmula (Equação 15):

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{calc}}{C_{real}} \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

Onde,

C_{calc} = Concentração de cada amostra obtida através do método analítico (mg/mL);

C_{real} = Concentração real obtida pela pesagem efetuada (mg/mL).

Neste parâmetro os intervalos de confiança devem ser indicados [39,40].

4.2.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito que é possível detetar numa amostra mas não é necessário quantificar com um valor exato.

O limite de quantificação de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito que é possível quantificar numa amostra com precisão e exatidão [36,39].

Estes limites podem ser determinados a partir de vários tipos de modelos, são eles [36]:

a. Baseados numa avaliação visual

Para o limite de detecção consiste na análise visual de uma amostra de concentração conhecida e na determinação do menor nível de concentração no qual se consegue detetar o analito com segurança, enquanto que para o limite de quantificação consiste na análise visual e na determinação do menor nível de concentração no qual se consegue quantificar o analito com precisão e exatidão, para uma amostra de concentração conhecida [36,39].

b. Baseados na razão sinal/ruído

Este parâmetro, em métodos analíticos cromatográficos é determinado com base no ruído da linha de base. A razão sinal/ruído é determinada por comparação de amostras de baixas concentrações de analito com o branco e estabelece-se qual a concentração mínima em que o analito pode ser detetado e quantificado.

Segundo a ICH, para o limite de detecção a razão sinal/ruído é de 3 ou 2:1 e para o limite de quantificação a razão sinal/ruído é de 10:1 [35,36,39].

c. Baseados no desvio padrão de resposta e no declive

Segundo a USP, os limites de detecção e quantificação podem ser determinados com base no desvio padrão (s ou símbolo σ) e no declive (S), com bases nas seguintes equações, respectivamente (Equação 16 e 17) [40]:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (\text{Equação 16})$$

$$QL = \frac{10\sigma}{S} \quad (\text{Equação 17})$$

Onde,

σ = desvio padrão da resposta;

S = declive da curva de calibração.

Independentemente do método usado para determinar o limite de quantificação, este deve ser validado com um número de amostras nas condições de concentração do limite de quantificação [39].

Um fator muito importante na validação de métodos analíticos de impurezas é que o limite de quantificação tem que ser menor ou igual que o *Reporting Threshold* [41]. Pelo que a determinação do *reporting threshold* é feita com base na dose diária máxima do produto, como se pode ver na Tabela 3 [41].

Tabela 3. Indicação dos *thresholds* a considerar com base na dose diária máxima. Adaptado de [41].

Dose Diária Máxima ¹	Reporting Threshold ^{2,3}
$\leq 1 \text{ g}$	0,1%
$> 1 \text{ g}$	0,05%

Nota: 1. A quantidade de fármaco administrado por dia.

2. Limites expressos em percentagem ou em função da dose diária máxima; Limites mais baixos podem ser apropriados se a impureza for extremamente tóxica.

3. Limites reportados mais elevados devem ser justificados cientificamente.

4.2.7 Robustez

A robustez de um método analítico é uma medida que permite verificar que variações pequenas e deliberadas nos parâmetros do método não afetam o método [36].

Este parâmetro deve ser avaliado durante a fase de desenvolvimento e deve demonstrar a confiança no método analítico [36].

Em HPLC, pode-se estudar a influência do pH na fase móvel, de variações na composição da fase móvel, diferentes colunas, temperatura e fluxo do método [35,39].

4.2.8 Estabilidade das soluções

O objetivo do estudo da estabilidade das soluções padrão e amostras é estabelecer um período de tempo e condições de armazenamento que garantam que as soluções não sofrem alterações ou degradações [42].

Na análise de conteúdo, a estabilidade das soluções deve ser determinada com base na percentagem de alteração do RF, através da seguinte fórmula (Equação 18):

$$\% \text{ alteração} = \left(\frac{RF_{t=x}}{RF_{t=0}} \times 100 \right) - 100, \text{ onde:} \quad (\text{Equação 18})$$

$RF_{t=x}$ = Fator de resposta em cada tempo t ($RF = \text{Área}/\text{Concentração}$);

$RF_{t=0}$ = Fator de resposta no tempo inicial – imediatamente após preparação ($RF = \text{Área}/\text{Concentração}$).

Deve avaliar-se o valor médio de RF's em cada tempo relativamente ao $t=0h$, através do teste *t-student* para um nível de confiança de 95%.

Na análise de impurezas, para a solução amostra deve calcular-se a percentagem de alteração no conteúdo das impurezas, com base na seguinte equação (Equação 19):

$$\% \text{ aumento de impureza} = \frac{Imp_{t=x} - Imp_{t=0}}{Esp.} \times 100, \text{ onde:} \quad (\text{Equação 19})$$

$Imp_{t=x}$ – conteúdo de impureza calculado, de acordo com o protocolo analítico, em cada tempo, em %;

$Imp_{t=0}$ – conteúdo de impureza no $t=0$, em %;

$Esp.$ – limite da especificação para a respetiva impureza, em %.

Deve comparar-se o conteúdo de impureza em cada tempo relativamente ao $t=0$, através do teste *t-student* para um nível de confiança de 95% e avaliar o aumento de impurezas.

4.2.9 Filtração

Os testes de filtração consistem no estudo da influência que a filtração poderá ter na quantificação da amostra.

Os filtros usados não devem alterar a solução em análise e não devem ocorrer aumentos ou diminuições de áreas das substâncias ativas e impurezas.

Os resultados devem ser avaliados para cada tipo de filtro com base na avaliação da diferença das médias obtidas entre a solução não filtrada e cada solução filtrada usando o teste *t-student* para um intervalo de confiança de 95%.

Para cada tipo de filtro, tem de se quantificar o desvio da resposta da solução filtrada relativamente à da solução não filtrada, através da seguinte equação (Equação 20):

$$\% \text{ Desvio} = \frac{RF_{nf} - RF_f}{\left(\frac{RF_{nf} + RF_f}{2}\right)} \times 100, \text{ onde: (Equação 20)}$$

RF_f = fator de resposta da solução filtrada ($RF = \text{Área}/\text{Concentração}$);

RF_{nf} = fator de resposta da solução não filtrada ($RF = \text{Área}/\text{Concentração}$).

4.2.10 Teste de Conformidade do Sistema

O teste de conformidade de sistema é parte integral de muitos dos métodos analíticos. Estes testes são baseados no conceito de que o equipamento, as operações analíticas e as amostras a serem analisadas constituem um sistema integral podendo assim ser avaliadas como tal [35,39].

4.3 Critérios de aceitação para os parâmetros de validação dos métodos analíticos

A Figura 9 apresenta os limites de aceitação para cada um dos parâmetros que constituem a validação de métodos analíticos.

No caso dos presentes métodos analíticos, a primeira linha diz respeito aos limites a considerar para a validação do método de conteúdo (substâncias ativas a 100 %) e a quinta linha representa os limites a considerar para a validação do método de impurezas (solução amostra de 0,2 mg/mL corresponde a 0,02%).

Nível de Concentração (Substância Ativa)	Limites Recuperação (%)		RSD Recuperação ou resultados de conteúdo (%)		RSD Precisão do Sistema (%)		RSD Repetibilidade (%)	
	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
100%	97 – 103	98 – 102	≤ 3	≤ 1,34	≤ 2	≤ 0,85	≤ 3	≤ 1,34
> 1% – 10%	96 – 104		≤ 3		≤ 2		≤ 3	
> 0,5% – 1%	95 – 105		≤ 3		≤ 3		≤ 3	
> 0,1% – 0,5%	90 – 110		≤ 7		≤ 5		≤ 7	
> 100ppm – 0,1%	90 – 110		≤ 10		≤ 5		≤ 10	
> 10ppm – 100ppm	85 – 115		≤ 10		≤ 5		≤ 10	
> 1ppm – 10ppm	80 – 120		≤ 20		≤ 10		≤ 20	
> 100ppb – 1ppm	80 – 120		≤ 20		≤ 10		≤ 20	
> 10ppb – 100ppb	80 – 120		≤ 20		≤ 10		≤ 20	
> 1ppb – 10ppb	70 – 130		≤ 20		≤ 10		≤ 20	
≤ 1ppb	60 – 140		≤ 20		≤ 10		≤ 20	

Figura 9. Limites de aceitação para os parâmetros necessários à validação analítica.

Adaptado da norma interna de validação analítica da empresa com base na ICH Q2 (R1) [36].

Legenda:

PA: Produto acabado;

SA: Substância ativa.

5 Desenho de Experiências – Metodologia de trabalho *Quality by Design* (QbD)

5.1 Introdução ao QbD

Antes de introduzir o conceito de *Quality by Design* (QbD) é importante perceber o que é a qualidade farmacêutica. Em 2004, Janet Woodcock, Diretor do “*Center for Drug Evaluation and Research*” definiu qualidade farmacêutica como um produto livre de contaminação e com efeito terapêutico comprovado [43,44].

O conceito de QbD foi introduzido pela FDA (*Food and Drug Administration*) e foram publicadas algumas *Guidelines* por parte da ICH tais como a ICH Q8 (R2) Desenvolvimento Farmacêutico, ICH Q9 Gestão de Risco, ICH Q10 Sistema de Qualidade Farmacêutica [45,46].

O *Quality by Design* é uma abordagem sistemática ao desenvolvimento farmacêutico, que enfatiza o conhecimento do produto e do processo, baseada em ciência e na análise de risco [47].

O QbD permite uma visão científica pró-ativa em que durante a fase de *design*, são identificadas e monitorizadas as etapas do processo e as fontes críticas de variabilidade que podem originar falhas na obtenção dos objetivos predefinidos. É importante conhecer o impacto das matérias-primas e dos parâmetros do processo na qualidade final do produto pelo que o processo é controlado, avaliado e atualizado para permitir uma qualidade consistente ao longo do ciclo de vida do medicamento [47,48].

O conceito de QbD não diz respeito apenas ao desenvolvimento farmacêutico pode ser estendido ao desenvolvimento de métodos analíticos [48].

5.2 Princípios do QbD

De forma a perceber e a implementar o *Quality by Design* é necessário introduzir dois conceitos: o de “*design space*” e o de “*control strategy*” [47].

A ICH Q8 (R2) define *design space* como uma combinação multidimensional e de interação de variáveis de entrada e parâmetros do processo que foram demonstrados para proporcionar uma garantia de qualidade do produto. Esta metodologia traz flexibilidade ao processo pelo que trabalhar dentro do *design space* não é considerado uma alteração e por isso não é necessário uma pós aprovação regulamentar [44,47].

Segundo a ICH Q10, o conceito de *Control Strategy* consiste em definir um conjunto de fatores de controlo consoante o produto em causa e na compreensão do processo para que o desempenho deste e a qualidade do produto sejam garantidas. O controlo pode incluir parâmetros e atributos relacionados com a substância ativa, materiais, componentes, instalações, equipamentos e condições do seu funcionamento, controlos em processo, especificações do produto [49].

5.2.1 Objetivos do QbD

5.2.1.1 Perfil do Produto Alvo (TPP)

O perfil do produto alvo é definido como um sumário dinâmico e prospetivo das características do produto que idealmente irá ter uma qualidade, segurança e eficácia desejadas. Este conceito engloba a forma farmacêutica, a via de administração, as características farmacocinéticas, entre outros [45,48].

5.2.1.2 Perfil de Qualidade do Produto Alvo (TPQP)

O perfil de Qualidade do Produto Alvo está relacionado com a identificação, conteúdo, dosagem, pureza e estabilidade.

Este consiste num resumo prospetivo das características de qualidade de um medicamento que, idealmente serão alcançadas para assegurar a qualidade desejada, tendo em conta a segurança e eficácia do mesmo [44,47,48].

5.2.1.3 Características Críticas de Qualidade (CQA)

A ICH Q8 (R2) define CQA como um atributo de qualidade, quer física, química, biológica ou microbiológica que tem que ser controlado para garantir que o produto tem a segurança, eficácia, estabilidade e performance desejadas.

Segundo esta nova perspetiva o produto é desenvolvido com as características adequadas para cumprir com as necessidades do doente, sendo fundamental garantir a qualidade do produto e proteger a segurança do doente [44,47].

5.3 *Quality by Design*: Ferramentas

5.3.1 Desenho de experiências (DoE)

O desenho de experiências é um método organizado e estruturado que permite determinar a influência dos fatores nos *outputs* do processo. O uso de desenho de experiências é uma ferramenta fundamental do *QbD* [50].

Quando efetuamos um DoE temos de saber exatamente quais são os fatores (variáveis independentes), isto é quais os parâmetros que se pretende saber se influenciam as respostas (variáveis dependentes). O DoE permite obter resultados de forma eficaz uma vez que permite estudar não só a variação de fatores como também as interações entre eles [50,51].

Em termos de DoE podem escolher-se dois tipos de desenho, o desenho fatorial completo ou o desenho fatorial fracionado [51].

Um desenho fatorial completo consiste na combinação de todos os fatores em todos os níveis, em todas as combinações possíveis. Este desenho pode-se designar pela expressão L^k , onde k são os fatores e L os diferentes níveis estudados.

Um desenho fatorial fracionado consiste na avaliação apenas de um subconjunto de todas as combinações possíveis dos fatores. Neste desenho de experiências, o estudo das interações entre fatores é limitado, pois este é usado para reduzir o número de experiências [51].

Os desenhos experimentais são normalmente escritos em codificação de variáveis. Assim se o desenho de experiências for composto por dois níveis, o nível mais alto é codificado com (+1) e o mais baixo com (-1) [51].

Para efetuar os desenhos experimentais existem vários *softwares*, o *software* usado neste trabalho foi o JMP (SAS Institute Inc.).

5.4 *Quality by Design* e Métodos analíticos

As ferramentas do *QbD*, como por exemplo, a avaliação do risco e o desenho de experiências, permitem reforçar a qualidade dos métodos analíticos através da identificação e conhecimento prévio das variáveis que influenciam a *performance* do método analítico [50].

Em termos analíticos a aplicação do *QbD* pode ser realizada em várias metodologias analíticas durante o desenvolvimento analítico, tais como em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), análise de impurezas, determinações de água, entre outros [50,52].

Neste âmbito é necessário introduzir outro conceito, o de *Analytical Target Profile* (ATP). Este conceito define-se como um resumo prospetivo dos requisitos de medição (por exemplo, precisão e recuperação) para assegurar que o método está "apto para o efeito" [50,52].

Como se pode verificar pela Figura 10, os conceitos de *Quality by Design* enquadram-se no desenvolvimento dos métodos analíticos e pode-se constatar também como o recurso a esta metodologia estatística permite desenvolver métodos robustos, seletivos e precisos adequados às QTPP e às CQAs do produto [50].

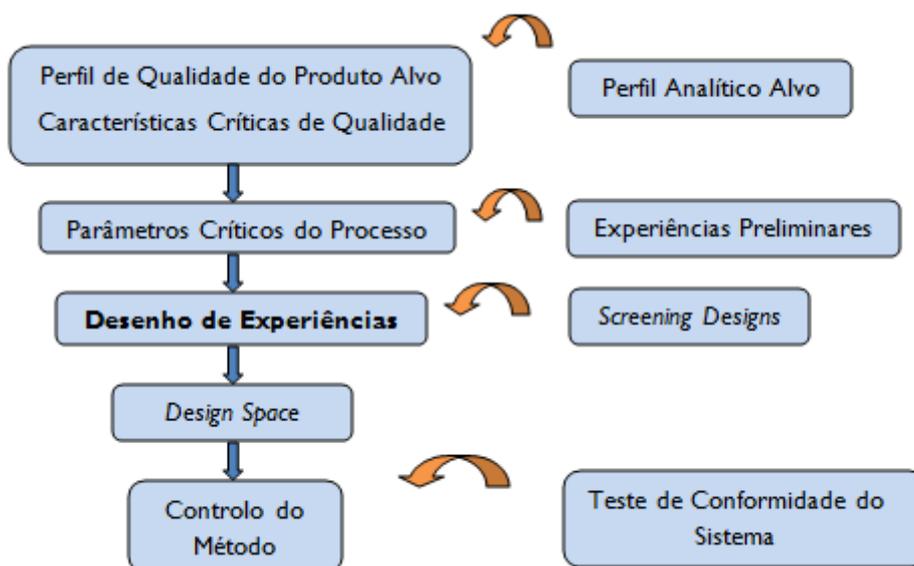


Figura 10. Desenvolvimento analítico baseado no conceito de *QbD*. Adaptado de [50].

5.5 Conclusões

O *Quality by Design* é parte essencial da abordagem moderna ao desenvolvimento farmacêutico que promove o conhecimento científico e traz flexibilidade.

Compreender e implementar o *QbD* irá promover e modernizar a produção farmacêutica e a qualidade do produto, sendo esta qualidade assegurada pelo conhecimento e controlo das variáveis de formulação e produtivas.

O entendimento completo de como os atributos do produto e do processo estão relacionados com o desempenho do produto permitem garantir a sua qualidade durante o ciclo de vida deste.

O *Quality by Design* envolve assim decisões tomadas com base na ciência e não em informação empírica, permitindo uma redução de custos e uma melhoria na informação fornecida às entidades regulamentares.

Capítulo II – Objetivos da Tese

Pretendeu-se com esta tese desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação do conteúdo e determinação do perfil de impurezas de uma formulação tópica.

A formulação a analisar é uma formulação com dois anestésicos locais para aplicação tópica em que as duas substâncias ativas em questão são o Hidrocloridrato de Prilocaina e o Hidrocloridrato de Lidocaína.

Para tal, começou-se por desenvolver os métodos analíticos com base em várias experiências efetuadas e com recurso a um método estatístico, tirando o máximo de partido do desenho de experiências.

Por fim, procedeu-se à validação desses métodos analíticos, de acordo com os vários parâmetros definidos pela ICH de modo a obter resultados fiáveis.

Este projeto laboratorial foi desenvolvido na Bluepharma, Indústria, mais precisamente no laboratório de Controlo de Qualidade.

Os objetivos específicos que se pretendem alcançar nesta tese no desenvolvimento dos métodos analíticos e respetivos critérios de avaliação encontram-se descritos em detalhe na Tabela 4.

Tabela 4. Objetivos específicos para o desenvolvimento dos métodos analíticos.

Desenvolvimento dos métodos analíticos		Objetivos	Critérios de avaliação
Conteúdo	Testes (colunas e gradientes)	Desenvolver um método curto para dar auxílio ao desenvolvimento galénico.	<p>Critérios de Avaliação:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Simetria (A_s) – deve ser o mais próximo possível de 1 [32]; • Nº de pratos teóricos (N) – $N > 2000$ (Requisito interno da empresa); • Resolução (R_s) – $R_s \geq 1,5$ [32]; • Fator de capacidade (k') ≥ 2 (Requisito interno da empresa); • Tempo de corrida ≤ 10 minutos.
Impurezas	Testes (colunas e gradientes)	Desenvolver um método para quantificar as impurezas de preferência em que a amostra seja a mesma do método de conteúdo.	<p>Critérios de Avaliação:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Simetria (A_s) – deve ser o mais próximo possível de 1 (avaliar na solução padrão) [32]; • Nº de pratos teóricos (N) – $N > 2000$ (avaliar na solução padrão) (Requisito interno da empresa); • Resolução (R_s) – $R_s \geq 1,5$ (avaliar na solução amostra) [32]; • % de impurezas: pode variar no máximo 5% da especificação de cada uma das impurezas (avaliar na solução amostra) (Requisito interno da empresa).

Nas Tabelas 5 e 6 encontram-se os objetivos específicos que se pretendem alcançar nesta tese na validação dos métodos analíticos (conteúdo e impurezas, respetivamente).

Tabela 5. Objetivos específicos para a validação do método de conteúdo.

Validação do método de conteúdo			
Parâmetros	Objetivos (Critérios de aceitação)		Descrição
Teste de Filtração	% Desvio para cada filtro (relativo à solução não filtrada) $\leq 2\%$; $p\text{-value} \geq 0,05$ (grau de confiança de 95%).		Requisito interno da empresa (este teste não é referido nas <i>Guidelines</i>).
Especificidade	<p>Não haver interferência</p> <p>Avaliar parâmetros de conformidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Simetria (A_s) – deve ser o mais próximo possível de 1; • N° de pratos teóricos (N) – $N > 2000$ • Fator de capacidade (k') ≥ 2; 		<p>ICH Q2 (R1) [36].</p> <p>Requisito interno da empresa (os parâmetros de conformidade não são referidos nas <i>Guidelines</i>).</p>
Linearidade	<p>$r \geq 0,997$</p> <p>% Desvio à ordenada na origem $\leq \pm 3\%$</p>		ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a norma interna de validação analítica).
Precisão do sistema	RSD $\leq 2\%$		Requisito interno da empresa. (critérios de acordo com a Figura 9).
Precisão do método (Repetibilidade)	% Conteúdo: 97 – 103% RSD $\leq 3\%$		ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a Figura 9).
Exatidão	Recuperação: 97 – 103% RSD $\leq 3\%$		ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a Figura 9).
Estudo de estabilidade das soluções	% Desvio em relação ao $t=0h$ ($\leq 2\%$); $p\text{-value} \geq 0,05$ (grau de confiança de 95%).		Requisito interno da empresa (este teste não é referido nas <i>Guidelines</i>).
Robustez	Fluxo de trabalho (1,2 – 1,8 mL/min)	<p>Avaliar a simetria e o n° de pratos teóricos na solução padrão:</p> <ul style="list-style-type: none"> • A_s – deve ser o mais próximo possível de 1; • $N > 2000$. 	<p>Teste adicional à ICH Q2 (R1) (variações testadas de acordo com a norma de validação analítica da empresa).</p>
	Volume de injeção (5 – 15 μ L)		
	Temperatura da coluna (36 – 44 °C)		

Tabela 6. Objetivos específicos para a validação do método de impurezas.

Validação do método de impurezas		
Parâmetros	Objetivos (Critérios de aceitação)	Descrição
Teste de Filtração	% Desvio para cada filtro (relativo à solução não filtrada) $\leq 10\%$; $p\text{-value} \geq 0,05$ (grau de confiança de 95%).	Requisito interno da empresa (este teste não é referido nas <i>Guidelines</i>).
Especificidade	Não haver interferência Avaliar parâmetros de conformidade: <ul style="list-style-type: none"> • Simetria (A_s) – deve ser o mais próximo possível de 1; • N° de pratos teóricos (N) – $N > 2000$; • Resolução (R_s) – $R_s \geq 1,5$; • Fator de capacidade (k') ≥ 2; 	ICH Q2 (R1) [36]. Requisito interno da empresa (os parâmetros de conformidade não são referidos nas <i>Guidelines</i>).
LQ e LD	LD razão Sinal/Ruído ≥ 3 LQ razão Sinal/Ruído ≥ 10	ICH Q2 (R1) [36] / USP 36-NF31 [39].
	LQ $\leq 0,1\%$ (<i>reporting threshold</i>) Recuperação: 90 – 110% RSD $\leq 10\%$	ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a Figura 9).
Linearidade	$r \geq 0,99$ % Desvio à ordenada na origem $\leq \pm 10\%$	ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a norma interna de validação analítica).
Precisão do sistema	RSD $\leq 5\%$	Requisito interno da empresa. (critérios de acordo com a Figura 9).
Precisão do método (Repetibilidade)	% Impurezas: 90 – 110 % RSD $\leq 10\%$	ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a Figura 9).
Exatidão	Recuperação: 90 – 110 % RSD $\leq 10\%$	ICH Q2 (R1) [36]. (critérios de acordo com a Figura 9).
Estudo de estabilidade das soluções	% Desvio em relação ao $t=0h$ ($\leq 10\%$); $p\text{-value} \geq 0,05$ (grau de confiança de 95%).	Requisito interno da empresa (este teste não é referido nas <i>Guidelines</i>).

Capítulo III – Materiais e Métodos

I Materiais e Equipamentos

I.1 Reagentes

Água ultrapura, qualidade para HPLC;

Acetonitrilo, qualidade para HPLC (Marca VWR);

Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), qualidade p.a. (Marca Panreac);

Hidróxido de sódio, qualidade p.a. (Marca Fisher);

Ácido clorídrico (HCl), 37% p.a. (Marca Fisher).

- Precauções:

Acetonitrilo – altamente inflamável, altamente tóxico por inalação, contato com a pele e ingestão.

Hidróxido de sódio – corrosivo, provoca queimaduras graves em contato com a pele e olhos.

Ácido clorídrico 37% – corrosivo e irritante, provoca queimaduras graves em contato com a pele.

- Equipamentos de proteção:

Manusear os produtos e reagentes com luvas e óculos de proteção; Usar máscara para gases e vapores quando manusear acetonitrilo ou misturas que contenham este reagente; Usar máscara de pó durante a manipulação com as substâncias ativas.

I.2 Substâncias ativas / Impurezas

As substâncias ativas e impurezas usadas encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Substâncias ativas e impurezas usadas no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos.

Substâncias ativas / Impurezas	Conteúdo (%)	Fornecedor
Prilocaina HCl <i>Working Standard</i>	99,8	Moehs Ibérica S.L.
Lidocaína HCl <i>Working Standard</i>	93,91	Moehs Ibérica S.L.
Prilocaina HCl	100,8	Moehs Ibérica S.L.
Lidocaína HCl	93,96	Moehs Ibérica S.L.
o-toluidina	99,5	Sigma-Aldrich
N-cloroacetil-2,6-xilidina	98,9	Sigma-Aldrich
Dimetilanilina	99,8	Merck Millipore
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina	100,0	Moehs Ibérica S.L.

I.3 Equipamentos

- ✓ Balança analítica, com resolução 0,1 mg (Mettler Toledo);
- ✓ HPLC *Waters Alliance*, com auto-injetor, com forno térmico para a coluna e detetor PDA (modelo W2690/5);
- ✓ Banho ultrassons e agitador mecânico;
- ✓ Potenciômetro, medidor de pH.

I.4 Colunas Cromatográficas

No desenvolvimento dos métodos analíticos testaram-se várias colunas cromatográficas (ver Tabela 8).

Tabela 8. Colunas cromatográficas testadas no desenvolvimento dos métodos analíticos.

Colunas Cromatográficas	Fabricante
Luna C18 (2) 100Å (50 x 3,0mm; 3µm)	<i>Phenomenex</i>
Luna C18 (2) 100Å (100 x 4,6mm; 3µm)	<i>Phenomenex</i>
BDS Hypersil C18 (100 x 4,6mm; 3µm)	<i>THERMO Scientific</i>
Zorbax RX C8 (250 x 4,6mm; 5µm)	<i>Agilent Technologies</i>
Inertsil ODS-3V (250 x 4,6mm; 5µm)	<i>GL Sciences Inc.</i>

I.5 Material Auxiliar

- ✓ Material de pesagem (espátula e pesa);
- ✓ Balões volumétricos de 10 mL, 50 mL e 100 mL;
- ✓ Pipetas volumétricas de 1 e 2 mL;
- ✓ Vials e septos para HPLC (≈1,5 mL);
- ✓ Filtros para seringas com membrana de:
 - Nylon VWR 0,2 µm;
 - PVDF (membrana de fluoreto de polivinilidene) Millipore 0,22 µm;
 - Nylon VWR 0,45 µm;
 - GHP (membrana hidrofílica de polipropileno) Pall 0,45 µm;
 - PP (membrana de polipropileno) VWR 0,45 µm.
- ✓ Luvas;

- ✓ Óculos de proteção;
- ✓ Máscara de pó;
- ✓ Máscara de gases semi-panorâmica.

2 Métodos

2.1 Preparação da Fase móvel/Solvente

- Solução de NaOH 5N (solvente de extração): dissolver 42 g de hidróxido de sódio em água descarbonatada* e perfazer o volume num balão volumétrico de 200 mL.
*água descarbonatada – água livre de dióxido de carbono.
- Solução de HCl 5N (solvente de neutralização): a partir da solução *stock* existente no laboratório de HCl 37% (densidade = 1,19), diluir 83 mL para um balão volumétrico de 200 mL com água ultrapura.
- Solução tampão KH_2PO_4 4,33 g/L: dissolver 4,33 g KH_2PO_4 em cerca de 500 mL de água ultrapura num balão volumétrico de 1000 mL, perfazer o volume com água e ajustar o pH a $7,20 \pm 0,02$ com NaOH 5N.
 - ✓ Fase móvel A: solução tampão KH_2PO_4 4,33 g/L: ACN (63:37% V/V).
- Solução tampão KH_2PO_4 3,03 g/L: dissolver 3,03 g KH_2PO_4 em cerca de 500 mL de água ultrapura num balão volumétrico de 1000 mL, perfazer o volume com água e ajustar o pH a $7,20 \pm 0,02$ com NaOH 5N.
 - ✓ Fase móvel B: solução tampão KH_2PO_4 3,03 g/L: ACN (90:10% V/V).
- Solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L: dissolver 3,79 g KH_2PO_4 em cerca de 500 mL de água ultrapura num balão volumétrico de 1000 mL, perfazer o volume com água e ajustar o pH a $7,20 \pm 0,02$ com NaOH 5N.
 - ✓ Solvente teste: Solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L:ACN (50:50% V/V);
 - ✓ Fase móvel/Solvente: Solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L:ACN (70:30% V/V) – proporção determinada a partir do DoE.

2.2 Preparação de soluções para os estudos preliminares de desenvolvimento

- a. Solução com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,2 mg/mL.

Pesar cerca de 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 50 mL de solvente (fase móvel A), levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente.

2.3 Preparação de soluções para desenvolvimento do método analítico de conteúdo

- a. Solução com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,2 mg/mL para testes de colunas cromatográficas/programas de gradiente.

Solução descrita no ponto 2.2.a.

- b. Solução padrão com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,04 mg/mL para realizar o desenho de experiências.

Pesar cerca de 10 mg de cada substância ativa WS para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 25 mL de solvente (solvente teste [50:50 % V/V]), levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. De seguida, diluir 2 mL da solução anterior (C= 0,2 mg/mL) para um balão volumétrico de 10 mL com solvente.

Nota: a concentração desta solução é cinco vezes mais diluída que a solução anterior, visto que a ordem de grandeza das áreas obtidas foi muito grande, optando-se assim por efetuar uma diluição.

2.4 Preparação de soluções para desenvolvimento do método analítico de impurezas

- a. Solução de fórmula reconstituída (substâncias ativas + excipientes) a uma concentração de 0,2 mg/mL de cada substância ativa.

Pesar cerca de 650 mg de placebo (porção equivalente a 20 mg de cada substância ativa) e 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente (fase móvel A). Filtrar a

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
Capítulo III
solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de Nylon 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL.

b. Solução amostra de excipientes.

As amostras de excipientes foram preparadas para um balão volumétrico de 100 mL com base na quantidade que estavam presentes em 100 g da microemulsão.

✓ Solução de tween 80:

Pesar cerca de 130 mg de tween 80 para um balão volumétrico de 100 mL; adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente (fase móvel A). Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de Nylon 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL.

✓ Solução de propilenoglicol:

Pesar cerca de 65 mg de propilenoglicol para um balão volumétrico de 100 mL; Preparar do mesmo modo que a solução de tween 80.

✓ Solução de oleato de etilo:

Pesar cerca de 39 mg de oleato de etilo para um balão volumétrico de 100 mL; Preparar do mesmo modo que a solução de tween 80.

c. Solução stock de impurezas.

Preparar duas soluções stock para cada impureza (de acordo com as quantidades disponíveis) para um balão volumétrico de 100 mL e perfazer o volume com acetonitrilo (ver Tabela 9).

Tabela 9. Preparação de soluções stock de impurezas para desenvolvimento e validação do método de impurezas.

Impurezas / Stocks		Massa pesada (mg)	Concentração final (mg/mL)
o-toluidina	Stock 1	26,85	2,672E-01
	Stock 2	24,10	2,398E-01
N-cloroacetil-2,6-xilidina	Stock 1	4,14	4,094E-02
	Stock 2	4,04	3,996E-02
dimetilnilina	Stock 1	5,50	5,495E-02
	Stock 2	5,41	5,405E-02
2-dietilaminoaceto 2,4-xilidina	Stock 1	5,05	5,050E-02
	Stock 2	5,10	5,100E-02

- d. Solução padrão com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,002 mg/mL para realizar o desenho de experiências.

Pesar cerca de 10 mg de cada substância ativa WS para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 25 mL de solvente (fase móvel do método de conteúdo), levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. De seguida, diluir 1 mL da solução anterior (C=0,2 mg/mL) para um balão volumétrico de 100 mL com solvente.

- e. Solução de fórmula reconstituída (substâncias ativas + excipientes) a uma concentração de 0,2 mg/mL com adição da impurezas ao nível de especificação para realizar o desenho de experiências.

Pesar cerca de 650 mg de placebo e 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente (fase móvel do método de conteúdo). Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de Nylon 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL. Adicionar as impurezas de acordo com as especificações (monografia da USP36-NF21 [53]) de cada uma delas a partir das concentrações soluções stock preparadas (Tabela 9):

- Solução de o-toluidina a C=0,004 mg/mL (especificação 2,0%);
- Solução de N-cloroacetil-2,6-xilidina a C=0,0002 mg/mL (especificação 0,1%);
- Solução de dimetilnilina a C=0,0002 mg/mL (especificação 0,1%);
- Solução de 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina a C=0,0002 mg/mL (especificação 0,1%).

2.5 Preparação das amostras para o estudo de degradação forçada

As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10. Preparação de amostras para o estudo de degradação forçada.

Hidrólise ácida	Hidrólise básica	Oxidação
Pesar cerca de 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 200 µL de solvente para dissolve-las e adicionar 1 mL de HCl 10N; colocar os balões a 80°C numa estufa durante 1 hora e de seguida perfazer o volume com solvente.	Pesar cerca de 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 200 µL de solvente para dissolve-las e adicionar 1 mL de NaOH 10N; colocar os balões a 80°C numa estufa durante 1 hora e de seguida perfazer o volume com solvente.	Pesar cerca de 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 200 µL de solvente para dissolve-las e adicionar 1 mL de H ₂ O ₂ a 5%; colocar os balões a 80°C numa estufa durante o tempo indicado na Tabela 30 para cada substância ativa e de seguida perfazer o volume com solvente.

2.6 Preparação de soluções para validação do método de conteúdo

- a. Solução padrão com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,04 mg/mL para os testes de filtração, especificidade, linearidade, precisão do sistema, precisão do método, exatidão, estudo da estabilidade das soluções padrão e robustez.

Pesar cerca de 10 mg de cada substância ativa WS para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 25 mL de solvente (fase móvel), levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. De seguida, diluir 2 mL da solução anterior (C=0,2 mg/mL) para um balão volumétrico de 10 mL com solvente.

Para o linearidade preparar cinco soluções padrão independentes com as duas substâncias ativas a 60%, 80%, 100%, 120% e 140%.

- b. Solução placebo para estudo da especificidade.

Pesar cerca de 690 mg de placebo para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente (fase móvel). Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL e diluir 2 mL da solução filtrada para um balão volumétrico de 10 mL com solvente.

- c. Solução de fórmula reconstituída (substâncias ativas + excipientes) a uma concentração de 0,04 mg/mL para o estudo da especificidade, precisão do sistema, exatidão, estudo da estabilidade das soluções amostra e robustez.

Pesar cerca de 650 mg de placebo e 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente (fase móvel). Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL e diluir 2 mL da solução filtrada para um balão volumétrico de 10 mL com solvente.

- d. Solução de amostra real a uma concentração de 0,04 mg/mL para estudo da precisão do método.

Pesar cerca de 690 mg da microemulsão para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
Capítulo III
mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente (fase móvel). Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL e diluir 2 mL da solução filtrada para um balão volumétrico de 10 mL com solvente.

2.7 Preparação de soluções para validação do método de impurezas

As soluções para validação deste método foram preparadas usando como solvente a fase móvel do método de conteúdo:

✓ Solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L:ACN (70:30% V/V)

a. Solução padrão com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,002 mg/mL com adição das impurezas a metade do nível de especificação para os testes de filtração.

Pesar cerca de 10 mg de cada substância ativa WS para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 25 mL de solvente, levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. De seguida, diluir 1 mL da solução anterior ($C=0,2$ mg/mL) para um balão volumétrico de 100 mL com solvente.

Por fim, adicionar as impurezas a metade da concentração da especificação de cada uma delas com a partir das concentrações *stock* preparadas (Tabela 9):

- Solução de o-toluidina a $C=0,002$ mg/mL;
- Solução de N-cloroacetil-2,6-xilidina a $C=0,0001$ mg/mL;
- Solução de dimetilanilina a $C=0,0001$ mg/mL;
- Solução de 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina a $C=0,0001$ mg/mL.

b. Solução padrão com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,002 mg/mL para o estudo da especificidade, limite de quantificação, precisão do sistema, precisão do método, exatidão e estudo da estabilidade das soluções padrão.

Pesar cerca de 10 mg de cada substância ativa WS para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 25 mL de solvente, levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. De seguida, diluir 1 mL da solução anterior ($C=0,2$ mg/mL) para um balão volumétrico de 100 mL com solvente.

- c. Solução de substâncias ativas a uma concentração de 0,2 mg/mL com adição das impurezas ao nível de especificação para o estudo da especificidade.

Pesar cerca de 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 50 mL de solvente, levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. Adicionar as impurezas de acordo com as especificações destas a partir das concentrações *stock* preparadas (Tabela 9).

- d. Solução placebo para o estudo da especificidade.

Pesar cerca de 690 mg de placebo para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente. Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL.

- e. Solução de fórmula reconstituída (substâncias ativas + excipientes) com as duas substâncias ativas a uma concentração de 0,2 mg/mL com adição das impurezas ao nível da especificação para o estudo da especificidade, precisão do sistema e estudo da estabilidade das soluções amostra.

Pesar cerca de 650 mg de placebo e 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente. Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de 0,2 µm, rejeitar os primeiros 2 mL.

- f. Soluções de substâncias ativas e impurezas para determinar os limites de deteção e quantificação.

Pesar cerca de 20 mg de cada substância ativa para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 50 mL de solvente, levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. Efetuar várias diluições e analisar no HPLC de acordo com o método analítico.

Para as impurezas, efetuar várias diluições das soluções *stock* (Tabela 9) e analisar.

Teste de recuperação ao nível do limite de quantificação:

- Nível mais baixo de recuperação:
 - Solução de fórmula reconstituída (substâncias ativas + excipientes) + impurezas ao nível do limite de quantificação.

g. Soluções padrão para o estudo da linearidade (dois stocks independentes).

Pesar cerca de 10 mg de cada substância ativa WS para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 25 mL de solvente, levar ao ultrassons até dissolver e perfazer o volume do balão com solvente. De seguida, diluir 4 mL da solução anterior ($C=0,2$ mg/mL) para um balão volumétrico de 50 mL com solvente.

Por fim, diluir as soluções padrão para obter cinco concentrações de substâncias ativas a 0,09% (limite de quantificação), 0,8%, 1,5%, 2,0% (100% da especificação da impureza mais alta) e 2,4% (120% da especificação da impureza mais alta) e adicionar as impurezas em concentrações definidas desde LQ até 2,4%.

h. Solução de amostra real a uma concentração de 0,2 mg/mL com adição das impurezas ao nível da especificação para estudo da precisão do método.

Pesar cerca de 690 mg da microemulsão para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar de seguida 5 mL de NaOH 5N para dispersar a amostra e agitar no agitador mecânico; adicionar 5 mL de HCl 5N e perfazer o volume com solvente. Filtrar a solução resultante com uma seringa de 10 mL usando filtro com membrana de 0,2 μ m, rejeitar os primeiros 2 mL.

i. Solução placebo com adição de impurezas para determinar a exatidão.

Preparar três soluções independentes nos seguintes níveis de concentração:

- Nível intermédio de recuperação:
 - Solução de placebo (excipientes) + impureza o-toluidina ao nível do *reporting threshold* (0,1%) a $C=0,0002$ mg/mL e para as outras três impurezas (0,08%) a $C=0,00016$ mg/mL;
- Nível mais alto de recuperação:
 - Solução de placebo (excipientes) + impurezas com concentração ao nível da especificação.

Capítulo IV – Desenvolvimento dos Métodos Analíticos

I Metodologia de Trabalho

No desenvolvimento das metodologias analíticas, para quantificação do conteúdo e determinação do perfil de impurezas, foram realizadas diversas experiências até se definirem os procedimentos analíticos que iriam ser validados para análise da formulação tópica. Para tal, efetuaram-se diversos estudos, com diferentes colunas, fases móveis e solventes, que serão descritos neste capítulo.

Os estudos que se seguem foram realizados em HPLC *Waters Alliance*, com detetor PDA (modelo W2690/5), e o *software* usado foi o *Empower 3*. Para desenvolver os métodos analíticos recorreu-se a um método estatístico, denominado por desenho de experiências (DOE) com auxílio do *software* JMP (SAS Institute Inc.).

As condições inicialmente testadas (Tabela II) estão descritas na monografia “*Lidocaine and Prilocaine Cream*” da USP36-NF31” [53].

Tabela II. Resumo das condições analíticas referidas na USP36-NF31 relativas à monografia “*Lidocaine and Prilocaine Cream*”.

Condições do sistema			
Coluna HPLC:	C18 100 x 4,6mm, 3µm (% de carbono de 17,5%).		
Fases móveis:	<p><u>Fase móvel A</u>: dissolver 2,73 g KH₂PO₄ em 630mL em água, ajustar o pH 7,20±0,02 com NaOH 5N. Diluir com acetonitrilo para 1L.</p> <p><u>Fase móvel B</u>: dissolver 2,73 g KH₂PO₄ em 900mL em água, ajustar o pH 7,20±0,02 com NaOH 5N. Diluir com acetonitrilo para 1L.</p>		
Fluxo:	1,5mL/min		
Gradiente:	Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)
	0	67	33
	11	67	33
	22	100	0
	32	100	0
Temperatura:	40 °C		
Deteção:	UV 232 nm		
Volume de injeção:	50 µL		
Solventes:	NaOH 5N HCl 5N Fase móvel A		

A composição da formulação tópica para a qual foram desenvolvidos estes métodos analíticos encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12. Composição da formulação tópica com as duas substâncias ativas.

Formulação para aplicação tópica	
Substâncias ativas *	Prilocaina HCl
	Lidocaína HCl
Excipientes	Água ultrapura
	Tween 80
	Propilenoglicol
	Oleato de etilo
	Trietanolamina
	Carbómero

*As substâncias ativas não estão incluídas na mistura de excipientes (placebo).

2 Estudos preliminares de desenvolvimento

Inicialmente procedeu-se à alteração do método de preparação das fases móveis A e B descritas na USP36-NF31 [53]. O objetivo da alteração da preparação das fases móveis foi facilitar a sua preparação e uniformiza-la com os procedimentos analíticos desenvolvidos na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, visto que o procedimento mais comum é preparar soluções tampão (solução com um pH definido), perfazer o volume com água num balão volumétrico de 1L e só depois efetuar a proporção com um solvente orgânico. No caso da monografia que está descrita na USP [53], as fases móveis consistiam em dissolver uma quantidade de sais em água, acertar o pH e perfazer o volume num balão volumétrico de 1L com solvente orgânico. A preparação das fases móveis está descrita no ponto 2.1 do Capítulo III.

De seguida, depois de se otimizarem as fases móveis descritas na Tabela 11, realizou-se uma análise com a coluna cromatográfica e gradiente descritos na USP [53]. Os tempos de retenção obtidos foram de aproximadamente 9,0 min para a Prilocaina HCl e 19,8 min para a Lidocaína HCl, como se pode ver no Cromatograma 1 (Consultar Anexos).

3 Desenvolvimento do método analítico para determinação do conteúdo de duas substâncias ativas

O método analítico de conteúdo foi o primeiro a ser desenvolvido, o objetivo foi desenvolver um método para quantificação do conteúdo das substâncias ativas aquando do desenvolvimento galénico da formulação. Pretendia-se deste modo, que o método fosse eficaz e rápido para que fosse possível apresentar resultados num curto espaço de tempo para dar auxílio ao desenvolvimento galénico. Para desenvolver este método analítico foram realizadas várias experiências visto que o método descrito na USP [53] seria de pelo menos 32 min (mais o tempo de estabilização para voltar às condições de gradiente iniciais) e o que se pretendia era um método mais rápido.

3.1 Experiências com colunas cromatográficas e gradientes

Inicialmente testaram-se duas colunas com o gradiente definido pela USP [53] (Gradiente 1) e experimentou-se outro gradiente (Gradiente 2), como se pode ver na Tabela 13.

Tabela 13. Experiências analíticas com diferentes colunas e gradientes (método de conteúdo).

Experiências	Condições Cromatográficas	Programas Gradiente					
		Gradiente 1			Gradiente 2		
		Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)	Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)
<u>Experiência 1</u> BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 3µm), (Fabricante) THERMO Scientific	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50uL	0	67	33	0	75	25
		11	67	33	11	75	25
		22	100	0	22	100	0
		32	100	0	32	100	0
<u>Experiência 2</u> Luna C18 (2) 100Å (50 x 3,0 mm; 3µm), (Fabricante) Phenomenex	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50uL	0	67	33	0	75	25
		11	67	33	11	75	25
		22	100	0	22	100	0
		32	100	0	32	100	0

Estas experiências (gradiente 1 e 2) descritas na Tabela 13 foram realizadas com as fases móveis otimizadas. A diferença entre os dois gradientes, é que o gradiente 1 é o que

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
 Capítulo IV
 está descrito na USP e o gradiente 2 alterou-se o programa de gradiente aumentando o gradiente da FM A (aumento da quantidade de acetonitrilo no sistema porque a fase móvel A tem mais acetonitrilo que a fase móvel B) no t=0 e 11 min.

Quanto às características das colunas, foram testadas estas colunas, pelos seguintes motivos:

- a coluna referida na experiência 1 tem as mesmas dimensões e tamanho de partícula da coluna do método descrito na USP e uma % de carbono de 11%;
- a coluna referida na experiência 2 tem uma % de carbono muito semelhante (17,2%) à coluna mencionada no método da USP.

Quanto às condições cromatográficas, nomeadamente o comprimento de onda de detecção, o fluxo de trabalho, a temperatura da coluna e o volume de injeção foram mantidos ao longo das experiências e são as condições cromatográficas descritas na monografia da USP (Tabela 11).

Os resultados destas experiências estão reportados na Tabela 14:

Tabela 14. Resultados das experiências descritas na tabela 13 (método de conteúdo).

Experiências	Condições Cromatográficas	Tempos de retenção (t_R) das substâncias ativas	
		Gradiente 1	Gradiente 2
<u>Experiência 1</u> BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 3 μ m)	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50uL	Prilocaína HCl: 5,904 min Lidocaína HCl: 14,250 min (Consultar Anexos – Cromatograma 2)	Prilocaína HCl: 5,069 min Lidocaína HCl: 11,538 min (Consultar Anexos – Cromatograma 3)
<u>Experiência 2</u> Luna C18 (2) 100Å (50 x 3,0 mm; 3 μ m)	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50uL	Prilocaína HCl: 2,037 min Lidocaína HCl: 5,211 min (Consultar Anexos – Cromatograma 4)	Prilocaína HCl: 1,774 min Lidocaína HCl: 4,206 min (Consultar Anexos – Cromatograma 5)

Como se pode verificar na Tabela 14, o teste com o gradiente 2 permitiu que as substâncias ativas eluíssem mais depressa que no gradiente 1, tanto na experiência 1 como na 2. Isto deve-se ao fato de no gradiente 2 a quantidade de solvente orgânico (acetonitrilo) ser maior e assim os picos eluem mais depressa.

Relativamente às colunas cromatográficas usadas, verificou-se que a coluna usada na experiência 2 é a que permite que os picos tenham menor tempo de retenção porque é a coluna que tem menor comprimento (50mm) e diâmetro (3,0mm).

Como o objetivo era desenvolver um método analítico rápido, a coluna escolhida foi a coluna da experiência 2, coluna Luna C18 (2) 100Å (50 x 3,0mm; 3µm).

Contudo, visto que na experiência 2, tanto no gradiente 1 como no 2, os picos das substâncias ativas eluíam numa fase inicial do cromatograma (antes dos 11min), pensou-se que o método de conteúdo em vez de ser um método de gradiente poderia ser um método isocrático, isto é, um método em que os picos eluissem com uma única fase móvel.

Assim preparou-se um novo tampão com uma concentração intermédia entre as soluções tampão usadas nas fases móveis A e B (Solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L).

Desta forma, tornou-se necessário perceber qual a proporção entre este tampão e o acetonitrilo (solvente orgânico) para que as substâncias ativas eluissem, para tal recorreu-se a um método estatístico, o desenho de experiências.

3.2 Determinação da fase móvel com recurso ao DoE

Após a seleção preliminar da solução tampão a usar fez-se um desenho de experiências que ajudasse a definir as seguintes condições:

- 1) Proporção entre o tampão e o solvente orgânico (acetonitrilo);
- 2) Volume de injeção.

Neste desenho de experiências estudaram-se condições dentro dos seguintes limites: 20 a 80% de acetonitrilo e 10 a 50 µL de volume de injeção (ver Figura 11). O tempo de corrida foi definido como 10 minutos.

Com base na alteração destes dois parâmetros (fatores), foram avaliadas as respostas: a simetria, o número de pratos teóricos, a resolução, o K prime das substâncias ativas e o tempo de corrida.

Os fatores, as respostas descritas em cima e os respetivos objetivos a atingir para cada resposta estudada (ver objetivos descritos no Capítulo II) foram introduzidos no software de DoE (programa JMP) e realizou-se um *Screening Design* (ver Figura 11).

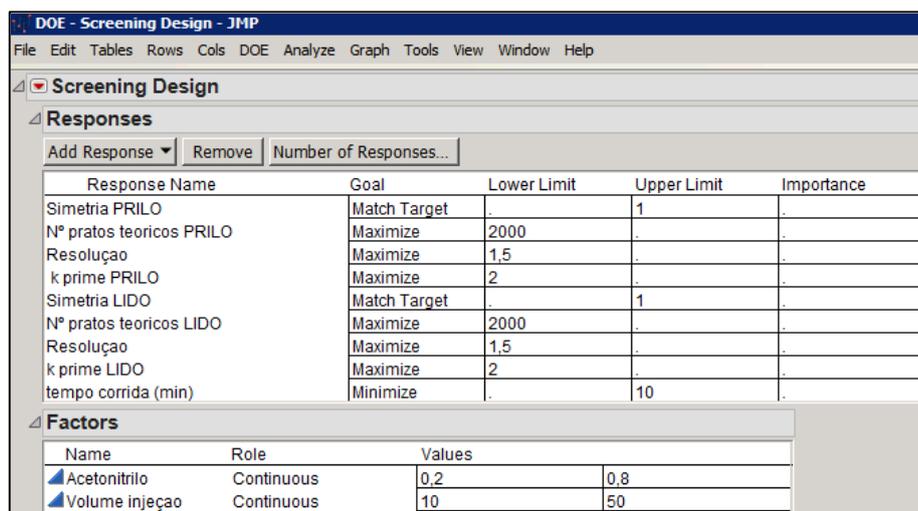


Figura 11. *Screening Design*: Introdução de fatores, respostas e objetivos no *software* JMP (método conteúdo).

O tipo de desenho escolhido foi um desenho completo (*Full Factorial*) num único bloco, como se pode ver na Figura 12.

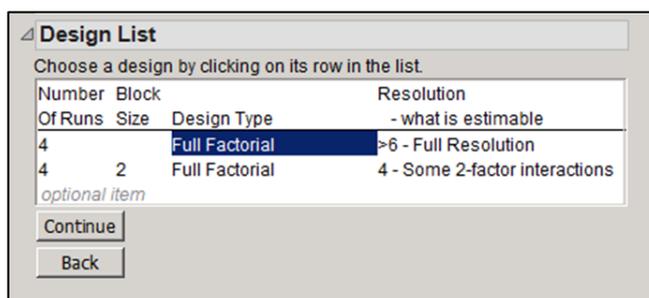


Figura 12. *Design List*: escolha do tipo de desenho fatorial.

Depois de introduzidas estas informações no *software* e depois de escolhido o tipo de desenho fatorial a efetuar, o *software* forneceu a lista de experiências a realizar. Essa lista consistia em seis experiências (ver Figura 13 – primeiras seis experiências), apesar de todas estas experiências terem sido realizadas, nem todas tiveram resultados positivos porque o tempo de corrida foi estabelecido para 10 minutos, pelo que quando a proporção de acetonitrilo era de 20% não dava tempo dos picos das duas substâncias ativas eluírem e quando a proporção de acetonitrilo era de 80% não se conseguiam distinguir os dois picos. Assim, com base nos resultados obtidos a esta lista de experiências a realizar, foram acrescentadas mais dez experiências com pontos intermédios para determinar a proporção de tampão:acetonitrilo correta para a eluição das duas substâncias ativas. Contudo as primeiras seis experiências voltaram a ser realizadas para que na mesma sequência de análise se pudessem avaliar todas as experiências.

	Acetonitrilo	Volume de injeção
1	0,8	50
2	0,2	10
3	0,8	10
4	0,5	30
5	0,2	50
6	0,5	30
7	0,7	50
8	0,7	10
9	0,3	10
10	0,3	50
11	0,28	30
12	0,28	10
13	0,25	10
14	0,25	30
15	0,4	10
16	0,4	30

Experiências introduzidas manualmente no software

Figura 13. Tabela de *full factorial* com as experiências a realizar para desenvolvimento do método de conteúdo.

O planeamento no *Sample set* do *Empower* para realização das experiências descritas na Figura 13, foram realizadas de acordo com a % de modificação de acetonitrilo para que as respostas fossem fiáveis (estabilização da coluna), pelo que se agruparam as experiências pela % de acetonitrilo.

Como se pretendia desenvolver um método eficaz e rápido, em termos de preparação de soluções padrão e amostra, seria vantajoso que a composição da fase móvel, em % V/V determinada com recurso ao DoE, fosse usada como solvente. Contudo, ao alterar-se o método analítico de gradiente para isocrático, não se sabia qual era a proporção (% V/V) entre a nova solução tampão e o acetonitrilo. Assim, preparou-se uma solução (solvente teste) de proporção 50:50% (% V/V) entre a solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L e o acetonitrilo. As condições analíticas usadas para realizar o DoE encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Condições do sistema para realizar o DoE no desenvolvimento do método analítico de conteúdo.

Condições do sistema	
Coluna cromatográfica:	Luna C18 (2) 100Å (50 x 3,0mm; 3µm)
Fluxo:	1,5 mL/min
Temperatura da coluna:	40°C
Deteção:	232 nm
Volume de injeção:	Variável de acordo com o DoE (injeção dupla)
Tempo de corrida:	Máximo 17 min (consoante % de ACN)

Para realizar este DoE, colocou-se no canal A do HPLC a solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L e no canal B do HPLC o acetonitrilo. De seguida, definiu-se programas que misturassem o tampão e o acetonitrilo nas proporções pretendidas (Figura 13).

3.3 Interpretação dos resultados do DoE

As experiências foram realizadas conforme descrito e na Tabela 16 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 16. Resultados das experiências obtidas no DoE para o desenvolvimento do método de conteúdo.

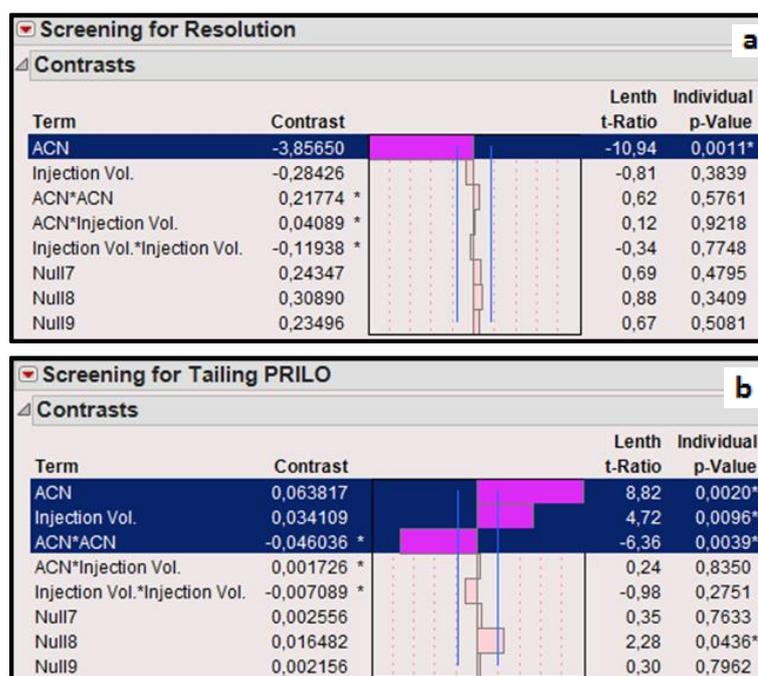
N ^a da experiência	Fatores		Respostas		Respostas Prilocaína HCl			Respostas Lidocaína HCl		
	Acetonitrilo (% V/V)	Volume de Injeção (µL)	Tempo de corrida (min)	Resolução (entre as duas substâncias ativas)	Simetria	N ^o pratos teóricos	k'	Simetria	N ^o pratos teóricos	k'
1	0,8	10	Não foi possível obter resultados experimentais com estas condições.							
2	0,5	30	2	2,77	1,16	741	0,29	1,13	1303	0,84
3	0,5	30	2	2,70	1,23	712	0,31	1,18	1266	0,85
4	0,2	50	17	14,26	1,08	2307	8,29	1,04	3287	28,36
5	0,2	10	17	15,56	1,03	3572	8,36	1,01	3582	28,55
6	0,8	50	Não foi possível obter resultados experimentais com estas condições.							
7	0,7	50	Não foi possível obter resultados experimentais com estas condições.							
8	0,7	10	Não foi possível obter resultados experimentais com estas condições.							
9	0,3	10	6	10,99	1,17	2510	2,76	1,04	3443	7,64
10	0,3	50	6	9,61	1,26	1608	2,75	1,11	2902	7,60
11	0,28	30	7	11,33	1,20	2220	3,38	1,07	3278	9,70
12	0,28	10	7	11,95	1,15	2736	3,38	1,03	3468	9,71
13	0,25	10	10	13,48	1,11	3125	4,68	1,02	3589	14,26
14	0,25	30	10	12,82	1,17	2517	4,67	1,05	3406	14,22
15	0,4	10	4	5,82	1,27	1294	0,99	1,16	2324	2,47
16	0,4	30	4	5,50	1,34	1144	1,00	1,21	2115	2,48

Com base na Tabela 16, verifica-se que em algumas experiências (linhas a cinzento 1; 6; 7; 8) não se conseguiu avaliar as respostas propostas. Isto deve-se ao fato dos fatores não serem favoráveis, nomeadamente uma proporção muito elevada de acetonitrilo que não permitiu a separação dos picos das substâncias ativas.

Depois de obtidos os resultados para as respostas em estudo e de introduzidos no *software*, foi feita a análise estatística com o programa JMP, através da qual se obteve uma equação de resposta para avaliar o modo como os fatores influenciam cada uma das respostas. Através dessa equação, avaliaram-se os valores de R^2 , R^2 ajustado e *p-value* para perceber se o modelo obtido é robusto ou não. Os valores de R^2 e R^2 ajustado convêm que sejam semelhantes e que tenham um valor próximo de 1 para que o modelo seja fiável; o *p-value* resulta da análise de variância (ANOVA) e deve ser $<0,05$, para que os valores sejam estatisticamente significativos ou seja, que haja 95% de probabilidade do modelo estatístico estar correto. Com base nas equações obtidas para cada uma das respostas, através do modelo matemático, são obtidos os resultados previstos e é a partir destes que se desenham os gráficos de perfil, contorno e superfície.

Inicialmente, começou-se por estudar de que forma os fatores (acetonitrilo e volume de injeção) influenciavam as respostas, através do *screening* para cada resposta (ver Figura 14).

Os gráficos foram analisados tendo em conta as barras a rosa em relação aos limites (linhas azuis) e quanto ao valor de *p-value* ($<0,05$ * no valor individual de *p*).



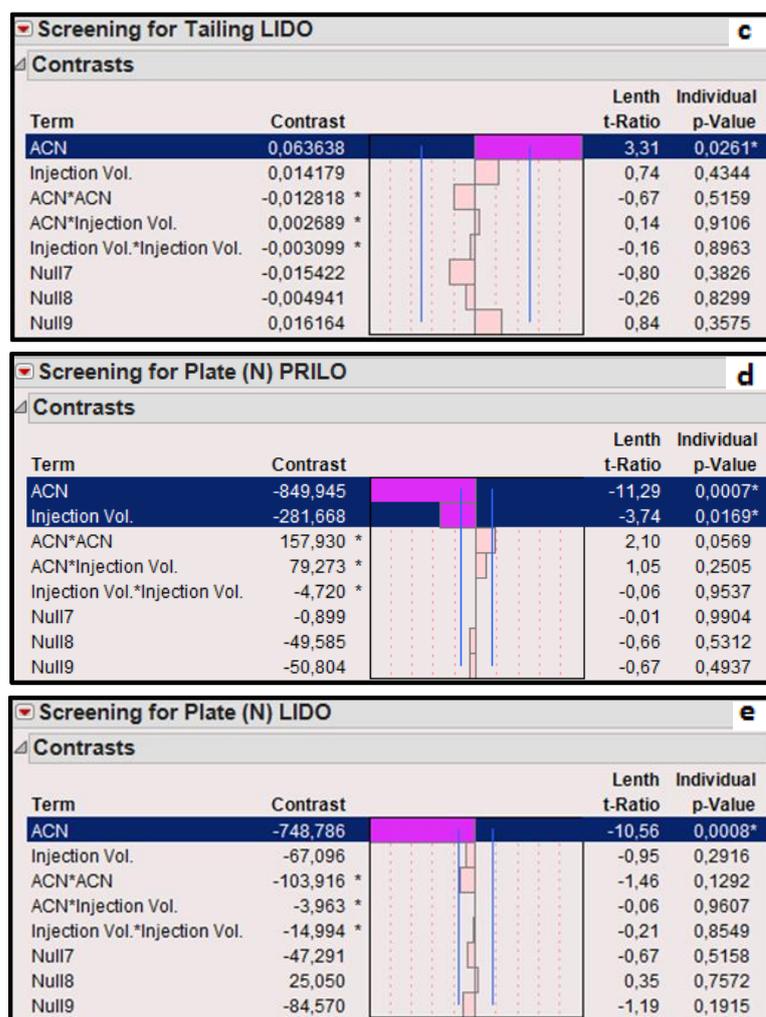


Figura 14. Influência dos fatores acetonitrilo e volume de injeção nas respostas. (a – *Screening* para a resolução entre os picos de Prilocaína HCl e Lidocaína HCl; b – *Screening* para a simetria da Prilocaína HCl; c – *Screening* para a simetria da Lidocaína HCl; d – *Screening* para o número de pratos teóricos da Prilocaína HCl; e – *Screening* para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl).

A primeira conclusão que se tira da análise da Figura 14 é que o acetonitrilo afeta de forma estatisticamente significativa todas as respostas estudadas. Pela análise da Figura 14 a, verifica-se que o fator acetonitrilo influencia de forma negativa a resolução (valor negativo na coluna *Contrast*), visto que o valor de *p-value* é $<0,05$ (* no valor individual de *p*) e a barra do ACN (a rosa) está fora dos limites (linhas azuis).

Comparando a influência dos diferentes fatores na simetria dos picos, verifica-se que a simetria do pico da Prilocaína HCl (Figura 14 b) é influenciada por todos os fatores (acetonitrilo e volume de injeção) e pelo acetonitrilo de forma quadrática, isto é o acetonitrilo induz alterações à simetria do pico desta substância ativa de forma não linear. Pelo contrário, a simetria do pico da Lidocaína HCl (Figura 14 c) é influenciada apenas pelo fator acetonitrilo e de forma linear.

Na alínea b, temos um fator nulo (Null 8) que apresenta significado estatístico (p -value <0,05), contudo este não foi considerado pois representa um fator desconhecido (não estudado).

Quanto ao número de pratos teóricos (Figura 14 d e 14 e), verifica-se que ambas as substâncias ativas são influenciadas pelo acetonitrilo da mesma forma, pelo que o aumento do acetonitrilo induz a diminuição dos pratos teóricos (coluna *Contrast* apresenta um valor negativo). Verifica-se também (Figura 14 d), que o número de pratos teóricos da Prilocaina HCl é influenciado pelo volume de injeção, sendo que o seu aumento conduz à diminuição do número de pratos teóricos desta substância ativa.

Depois de serem identificados os fatores que influenciam as respostas e de obtidos os gráficos acima representados (Figura 14) foi feita a sua avaliação estatística (ver Tabela 17).

Tabela 17. Avaliação estatística da influência dos fatores nas respostas em estudo (método de conteúdo).

Análise estatística Respostas	R²	R² ajustado	Analysis of Variance Prob>F (p -value <0,05)
Resolução	0,976748	0,973427	<0,0001
Simetria Prilocaina HCl	0,956303	0,930085	0,0008
Simetria Lidocaína HCl	0,817231	0,791121	0,0008
Nº pratos teóricos (N) Prilocaina HCl	0,956698	0,942264	<0,0001
Nº pratos teóricos (N) Lidocaína HCl	0,956405	0,950177	<0,0001

Com base na análise estatística, conclui-se que os modelos obtidos para a resolução entre as duas substâncias ativas, para a simetria da Prilocaina HCl e para o número de pratos teóricos de ambas as substâncias ativas são bons modelos estatísticos, visto que os valores de R² e R² ajustado são semelhantes e próximos de 1. Contudo, verifica-se que o modelo obtido para a simetria da Lidocaína HCl é menos robusto pois o valor de R² (0,81) está mais afastado de 1.

Para cada uma das respostas presentes na Tabela 17, foram determinados os valores de p -value obtidos através da ANOVA e estes são <0,05, ou seja, são estatisticamente significativos.

Através das equações de resposta obtidas a partir da análise estatística, foram calculados os valores previstos para cada uma das respostas que sofrem influência dos fatores estudados (ver Tabela 18).

Tabela 18. Resultados obtidos versus resultados previstos com base na avaliação estatística (método de conteúdo).

Nº Exp	Resultados Obtidos					Resultados Previstos				
	Resol.	Simetria Priloc. HCl	Simetria Lidoc. HCl	N Priloc. HCl	N Lidoc. HCl	Resol.	Simetria Priloc. HCl	Simetria Lidoc. HCl	N Priloc. HCl	N Lidoc. HCl
2	2,77	1,16	1,13	741	1303	1,94	1,21	1,22	806	1366
3	2,70	1,23	1,18	712	1266	1,95	1,24	1,22	372	1366
4	14,26	1,08	1,04	2307	3287	14,80	1,08	1,01	2550	3861
5	15,56	1,03	1,01	3572	3582	14,80	1,01	1,01	3418	3861
9	10,99	1,17	1,04	2510	3443	10,51	1,20	1,08	2547	3029
10	9,61	1,26	1,11	1608	2902	10,51	1,27	1,08	1679	3029
11	11,33	1,20	1,07	2220	3278	11,37	1,21	1,07	2287	3195
12	11,95	1,15	1,03	2736	3468	11,37	1,17	1,07	2721	3195
13	13,48	1,11	1,02	3125	3589	12,66	1,12	1,05	2983	3445
14	12,82	1,17	1,05	2517	3406	12,66	1,16	1,05	2549	3445
15	5,82	1,27	1,16	1294	2324	6,23	1,27	1,15	1677	2197
16	5,50	1,34	1,21	1144	2115	6,23	1,30	1,15	1243	2197

Os resultados previstos (Tabela 18) foram determinados através do modelo matemático e das equações de resposta, pelo que se verifica que estes são semelhantes aos resultados obtidos experimentalmente, mesmo para a simetria da Lidocaína HCl que apresentava resultados menos robustos em termos de R^2 .

Com base nos valores previstos traçaram-se gráficos de perfil, de contorno e de superfície. Estes gráficos permitem observar a forma como cada fator influência cada resposta e também retirar algumas informações:

- ✓ Gráfico de Perfil: determinar as condições ideais de trabalho com base na maximização (valores ideais) das respostas;
- ✓ Gráfico de contorno: mostrar em 2D a superfície de resposta (zona de trabalho);
- ✓ Gráfico de superfície: mostrar em 3D a superfície de resposta.

De seguida, encontram-se representados os gráficos de perfil obtidos a partir dos resultados previstos (Figuras 15 e 16).

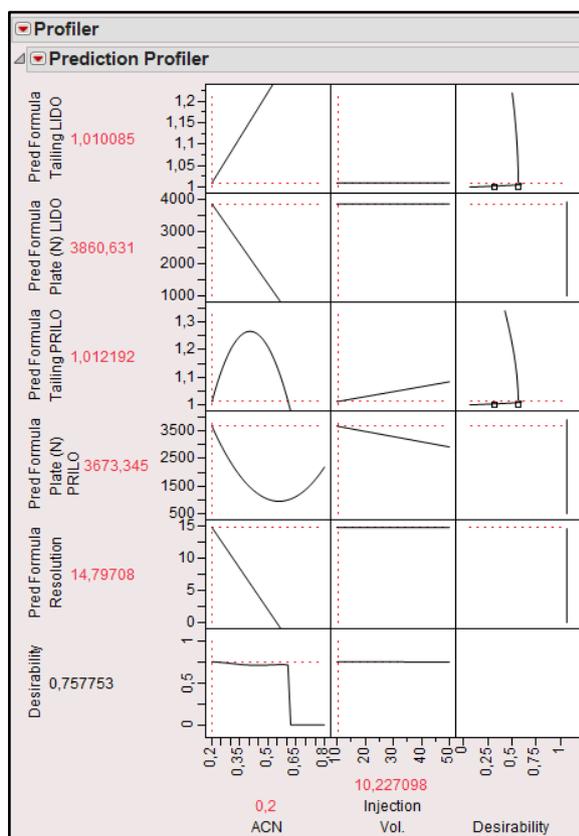


Figura 15. Gráfico de perfil da influência dos fatores (acetoneitrilo e volume de injeção) nas respostas (resolução, simetria e nº de pratos teóricos para ambas as substâncias ativas).

Segundo o modelo matemático, a Figura 15 representa a forma como os fatores influenciam as respostas, isto é, os valores que se encontram em baixo no acetoneitrilo (0,2%) e no volume de injeção (10,2 µL) são os valores fornecidos pelo *software* para que se consigam alcançar os critérios de avaliação descritos na Tabela 4 do Capítulo II. Estes valores foram calculados com as condições desejadas maximizadas (“*Maximize Desirabilities*”), isto é, com as condições o mais próximo possível do considerado ideal. O valor ideal para a *Desirability* é de 1, contudo o valor obtido foi de 0,75 (ver Figura 15), isto pode ser explicado pelo facto de estarmos a estudar muitas respostas em simultâneo.

Assim, através da conjugação da influência dos fatores em análise, nas respostas estudadas e nos valores de respostas previstos, a percentagem de acetoneitrilo determinada com as *Maximize Desirabilities* seria de 0,2%, o que significa que a fase móvel teria a proporção de solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L:ACN (80:20 % V/V).

Contudo, observando a Tabela 16 verifica-se que ao avançar com esta fase móvel, os tempos de corrida seriam de 17 min, e o que se pretendia era desenvolver um método

curto. Assim, traçaram-se os gráficos de perfil (Figura 16) para duas condições (ACN a 28% e 30%) que pareciam favoráveis devido aos tempos de corrida obtidos (Experiências 9 e 12 a verde, na Tabela 16) e um volume de injeção de 10 μL (obtido pelas *Maximize Desirabilities* como se pode ver na Figura 15).

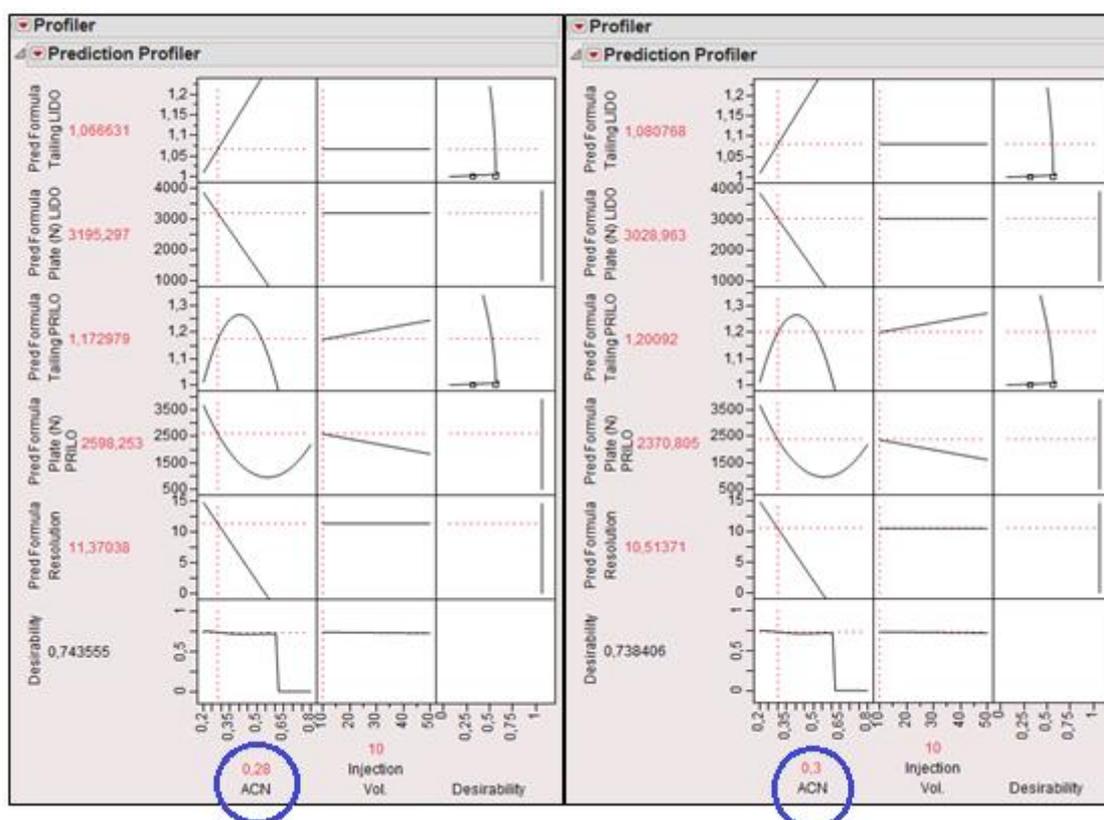


Figura 16. Gráfico de perfil da influência dos fatores nas respostas com 28% e 30% de ACN, respetivamente (Experiência 9 e 12, da Tabela 16).

Apesar de, na Tabela 16 se apresentarem outras condições de acetonitrilo e volume de injeção onde se obteriam tempos de corrida mais curtos, essas condições não foram estudadas pois o critério de número de pratos teóricos superior a 2000 não era cumprido e os valores de simetria encontravam-se um pouco afastados de 1 (Experiências 2, 3, 15 e 16 da Tabela 16).

De seguida, traçaram-se os gráficos de contorno para as condições de acetonitrilo a 28% e 30% (ver Figuras 17 e 18, respetivamente).

Este tipo de gráfico serve para visualização da zona de trabalho (zona onde se encontram preenchidos os requisitos introduzidos no *software*), que no *software* em questão é representado a branco ao passo que as linhas e sombreados a cores representam as respostas em estudo.

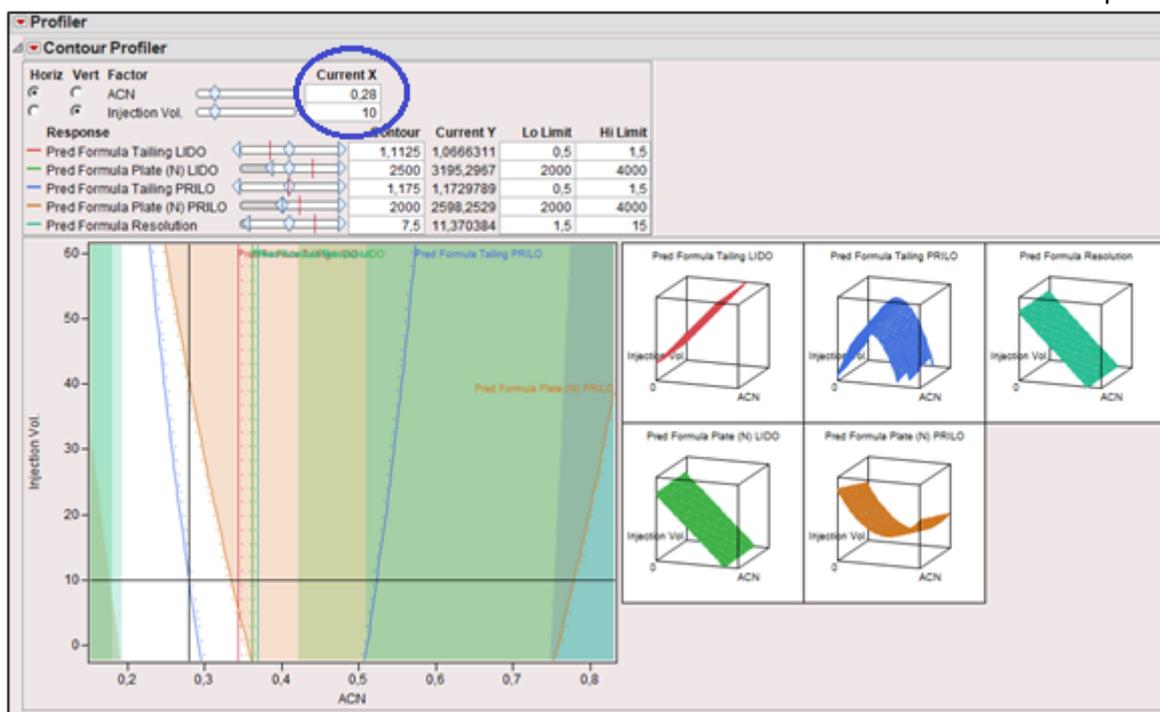


Figura 17. Gráfico de contorno para determinar proporção da fase móvel (tampão: acetonitrilo [72:28% V/V]).

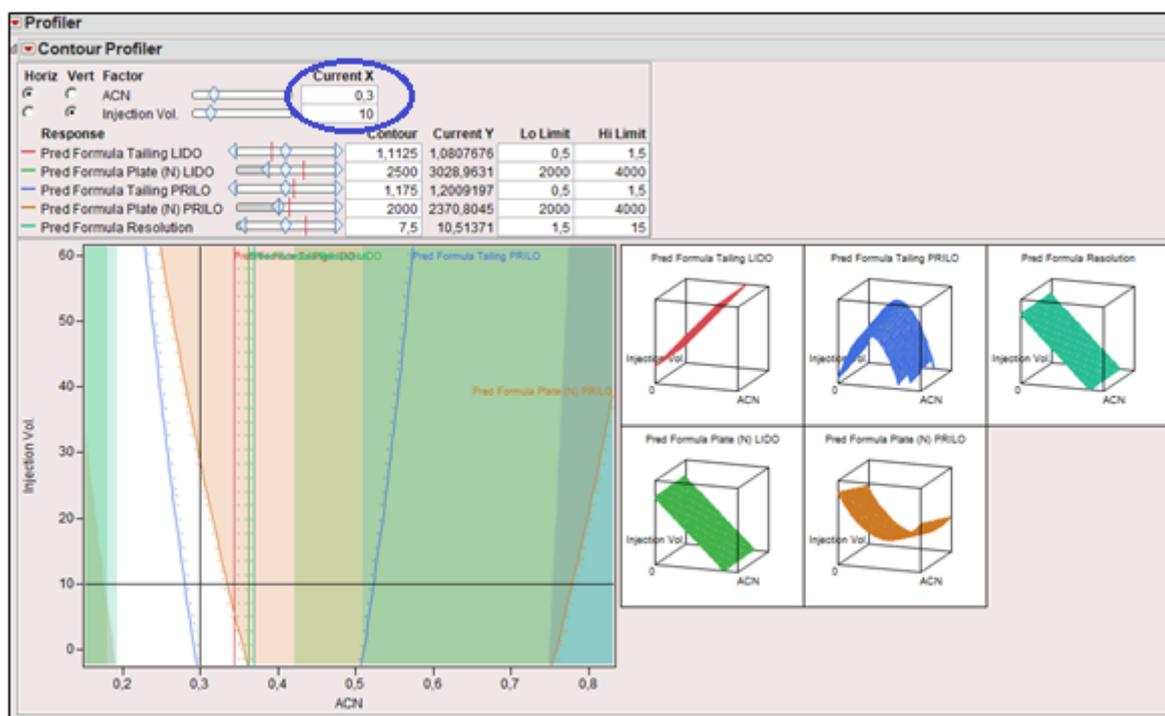


Figura 18. Gráfico de contorno para determinar proporção da fase móvel (tampão: acetonitrilo [70:30% V/V]).

Interpretando os gráficos de contorno obtidos, através da interseção das linhas a preto de acetonitrilo (eixo horizontal) e volume de injeção (eixo vertical) verifica-se que ambas as percentagens de acetonitrilo de 28% e 30% colocados nos valores de *Current X* (a azul) estão na zona branca dos gráficos, logo pertencem à zona de trabalho. Assim, decidiu-

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
Capítulo IV
se avançar com a fase móvel de composição tampão:acetoneitrilo (70:30 % V/V), devido ao tempo de corrida ser o mais vantajoso (6 minutos).

Por último, foi traçado o gráfico de superfície a partir dos resultados previstos (Figura 19).

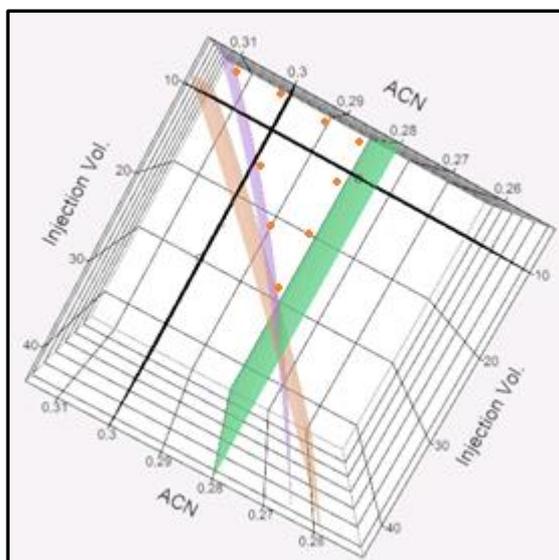


Figura 19. Gráfico de superfície representativa da zona de trabalho para o modelo matemático obtido (método conteúdo).

Legendas a cores:

- verde: simetria da Lidocaína HCl;
- lilás: simetria da Prilocaina HCl;
- rosa: número de pratos teóricos da Prilocaina HCl;
- pontos a laranja: limites da zona de trabalho.

Através do gráfico de superfície de resposta do modelo obtido (Figura 19), visualiza-se por interseção das linhas a preto que com uma proporção de 30% de acetoneitrilo na fase móvel e um volume de injeção de 10 µL, estamos na zona de trabalho (delimitada pelos pontos a laranja).

Com base nos resultados e gráficos obtidos, a proporção determinada para a fase móvel foi a de proporção tampão:acetoneitrilo (70:30% V/V) e o solvente que irá ser posteriormente usado também será este, visto que se verificou que não havia alterações cromatográficas relativamente ao solvente teste (50:50% V/V) usado no desenho de experiências.

3.4 Condições cromatográficas

Assim, as condições cromatográficas para avançar com a validação do método de conteúdo são as seguintes (Tabela 19).

Tabela 19. Condições cromatográfica para a validação do método de conteúdo.

Condições do sistema	
Coluna HPLC:	Luna C18 (2) 100Å 50 x 3,0mm, 3µm
Fase móvel:	Solução tampão KH ₂ PO ₄ 3,79 g/L:ACN (70:30% V/V)
Fluxo:	1,5 mL/min
Temperatura:	40 °C
Deteção:	UV 232 nm
Volume de injeção:	10 µL
Tempo de corrida:	6 min
Solventes:	NaOH 5N HCl 5N Fase móvel: Solução tampão KH ₂ PO ₄ 3,79 g/L:ACN (70:30% V/V).

- a. Sequência de análise de acordo com na norma interna da empresa:
- Branco (fase móvel): 10 µL (2 injeções ou até o cromatograma estabilizar);
 - Calibração com duas soluções padrão independentes:
 - Padrão #1: 10 µL (3 injeções);
 - Padrão #2: 10 µL (3 injeções);
 - Amostras (máximo 6): 10 µL (injeção simples);
 - Padrão #1 ou #2 (controle): 10 µL (injeção simples).
- b. Teste de conformidade do sistema

Para as soluções padrão, efetuar a seguinte avaliação:

- 1) Calcular o fator de resposta (RF) para cada substância ativa (Equação 21):

$$RF = \frac{A}{C_p}; \text{ (Equação 21)}$$

RF = fator de resposta de cada substância ativa;

A = área do pico da substância ativa na solução padrão;

C_p = concentração de cada substância ativa na solução padrão (mg/mL). Onde,

$$C_p = \frac{M_p \times C_p \text{ teórica}}{50 \times 100} \times \frac{2}{10}; \text{ (Equação 22)}$$

C_p = concentração da solução padrão preparada (mg/mL);

M_p = massa pesada do padrão (mg);

C_p teórica = concentração teórica do padrão (%);

50 = corresponde ao volume do balão volumétrico para preparar a solução (mL);

2/10 = corresponde à diluição a partir da solução *stock*.

2) Calcular o *RSD* de seis *RF* obtidos nas injeções das soluções padrão #1 e #2.

RSD (n=6) ≤ 2,0%.

3) Calcular o *RF1* e *RF2* obtidos das três injeções de cada solução padrão, para cada substancia ativa.

4) Calcular a relação dos fatores de resposta (Equação 23), que tem de estar entre 98,0 e 102,0%.

$$R = \frac{RF1}{RF2} \times 100; \text{ (Equação 23)}$$

5) Calcular a média dos *RF* (Equação 24):

$$MRF = \frac{RF1+RF2}{2}; \text{ (Equação 24)}$$

4 Desenvolvimento do método analítico para determinação do perfil de impurezas

Depois de desenvolvido o método de conteúdo procedeu-se ao desenvolvimento do método para determinação do perfil de impurezas da formulação.

4.1 Experiências com colunas cromatográficas e gradientes

Inicialmente realizou-se uma experiência com as condições cromatográficas descritas na USP36-NF31 [53] (nomeadamente comprimento de onda de deteção, fluxo, temperatura da coluna e volume de injeção) e usou-se a coluna recomendada pela USP, coluna cromatográfica Luna C18 (2) 100Å (100 x 4,6mm; 3µm); usaram-se as fases móveis otimizadas A e B e o gradiente definido na monografia da USP [53]. Verificou-se que ao injetar seis vezes consecutivas a amostra descrita no ponto 2.4.a do Cap. III, havia alteração do perfil cromatográfico. Isto é, após a segunda injeção consecutiva algum dos excipientes parecia ficar retido na coluna e aparecia uma lomba no cromatograma por volta dos 25 min (Consultar Anexos – Cromatograma 6). Assim, decidiu-se analisar os excipientes que estavam em maior quantidade na formulação e efetuar três injeções consecutivas. Os excipientes analisados foram o tween 80, o propilenoglicol e o oleato de etilo. Como se pode ver no Cromatograma 7 (Consultar Anexos), na segunda injeção consecutiva do excipiente tween 80, o cromatograma apresenta uma lomba por volta dos 32 min, enquanto o perfil cromatográfico dos Cromatogramas 8 e 9 (Consultar Anexos) da solução de propilenoglicol e oleato de etilo, respetivamente mantêm-se constantes ao longo das injeções.

Para resolver este problema efetuaram-se várias experiências com diferentes colunas e gradientes que vão ser descritos de seguida. As colunas cromatográficas foram escolhidas com base em pesquisa bibliográfica (consultar Tabela 20).

Tabela 20. Colunas cromatográficas escolhidas com base em referências bibliográficas.

Colunas Cromatográficas	Fabricante	Justificação / Referência Bibliográfica
BDS Hypersil C18 (100 x 4,6mm; 3µm)	<i>THERMO Scientific</i>	Coluna testada para um anestésico local do tipo amida (bupivacaína) – da mesma família que as substâncias ativas em estudo [54].
Zorbax RX C8 (250 x 4,6mm; 5 µm)	<i>Agilent Technologies</i>	Coluna testada para a Lidocaína HCl numa formulação oral [55].
Inertsil ODS-3V (250 x 4,6mm; 5µm)	<i>GL Sciences Inc.</i>	Coluna testada para a Lidocaína HCl [56].

Com base nestas informações realizaram-se algumas experiências cujas condições experimentais e respectivos resultados encontram-se descritos na Tabela 21.

Tabela 21. Condições das experiências analíticas com diferentes colunas cromatográficas e respectivos resultados (método de impurezas).

Experiências	Condições Cromatográficas	Programas Gradiente			Resultados
		Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)	
<u>Experiência 1</u> BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 3µm)	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50µL Tempo de corrida: 37 min (5 min para voltar ao gradiente inicial)	Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)	t_R Prilocaína HCl \approx 8,6 min t_R Lidocaína HCl \approx 18,6 min Efetuaram-se seis injeções de uma amostra de fórmula reconstituída e a partir da 2ª injeção começou a aparecer uma lomba aos 33 min. (Consultar Anexos – Cromatograma 10)
		0	67	33	
		11	67	33	
		22	100	0	
		32	100	0	
<u>Experiência 2</u> Zorbax RX C8 (250 x 4,6mm, 5 µm)	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50µL Tempo de corrida: 37 min (5 min para voltar ao gradiente inicial)	Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)	t_R Prilocaína HCl \approx 17,4 min t_R Lidocaína HCl \approx 27,4 min Efetuaram-se três injeções de uma amostra de fórmula reconstituída, mas como a coluna é grande a frente de solvente não era constante. (Consultar Anexos – Cromatograma 11)
		0	67	33	
		11	67	33	
		22	100	0	
		32	100	0	
<u>Experiência 3</u> Inertsil ODS-3V (250 x 4,6mm, 5 µm)	Deteção: 232nm Fluxo: 1,5mL/min Temperatura coluna: 40°C Volume injeção: 50µL Tempo de corrida: 37 min (5 min para voltar ao gradiente inicial)	Tempo (min)	FM A (%V/V)	FM B (%V/V)	t_R Prilocaína HCl \approx 16,1 min t_R Lidocaína HCl \approx 27,1 min Efetuaram-se 6 injeções de uma amostra de fórmula reconstituída, e o resultado observado foi muito semelhante ao da experiência 2 com a desvantagem de que o perfil cromatográfico tinha oscilações. (Consultar Anexos – Cromatograma 12)
		0	67	33	
		11	67	33	
		22	100	0	
		32	100	0	

Como podemos ver pelos resultados obtidos com as diferentes colunas testadas (Tabela 21), o problema de retenção do tween 80 na coluna não ficou resolvido.

Assim, decidiu-se prosseguir as experiências com a coluna recomendada pela USP, coluna cromatográfica Luna C18 (2) 100Å (100 x 4,6 mm; 3µm), coluna esta inicialmente testada.

De acordo, com alguns procedimentos usados em rotina no laboratório de Controlo de Qualidade, algumas análises de HPLC são feitas com lavagens intermédias, assim decidiu-se experimentar um programa de gradiente com um solvente orgânico (acetonitrilo) no canal C do HPLC que por volta dos 30 minutos obrigasse o tween 80 a sair todo da coluna.

Tendo em conta este teste, ao colocar o acetonitrilo no canal C do HPLC, foi necessário aumentar o tempo de corrida da análise, para que as condições analíticas iniciais fossem retomadas no final do programa de gradiente.

Os programas de gradiente testados no canal C encontram-se nas Tabelas 22 e 23.

Tabela 22. Programa gradiente 1 com o canal C do HPLC em acetonitrilo.

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	67	33	0
11	67	33	0
22	100	0	0
32	100	0	0
35	60	0	40
40	40	0	60
42	67	33	0
55	67	33	0

Tabela 23. Programa gradiente 2 com o canal C do HPLC em acetonitrilo.

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	67	33	0
11	67	33	0
22	100	0	0
32	100	0	0
35	40	0	60
40	30	0	70
42	67	33	0
55	67	33	0

Com base nestes dois testes e injetando uma solução do excipiente tween 80, verificou-se que o método no segundo programa de gradiente era capaz de eluir este excipiente na totalidade e assim deixaram de ocorrer alterações no perfil cromatográfico.

Um fator muito importante é que até aqui os testes tinham sido realizados usando como solvente a fase móvel A, tal como descrito na monografia da USP, contudo em termos de trabalho laboratorial é muito vantajoso quando se consegue preparar uma amostra que possa ser a mesma para análise de conteúdo e impurezas, apesar de muitas vezes os métodos analíticos serem diferentes. Assim testou-se uma amostra com o solvente sendo a fase móvel A e outra com o solvente do método de conteúdo (solução tampão KH_2PO_4 3,79 g/L:ACN 70:30% V/V). Verificou-se que não havia alterações cromatográficas, pelo que o solvente passou a ser o mesmo do usado no método de conteúdo.

De seguida, realizaram-se alguns testes de programas de gradiente (ver Tabelas 24, 25 e 26) com o gradiente de lavagem no canal C referido na Tabela 22 em que se alterou a proporção inicial das fases móveis, nomeadamente da Fase móvel A de 67% para 60%, 55% e 50% (diminuir a % de ACN no sistema). O objetivo de alterar o programa de gradiente foi melhorar a linha de base do cromatograma e a resolução entre a substância ativa de Prilocaína HCl e a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.

Tabela 24. Programa gradiente 3 (Desenvolvimento do método impurezas).

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	60	40	0
15	60	40	0
22	100	0	0
32	100	0	0
34	40	0	60
36	30	0	70
38	60	40	0
45	60	40	0

Tabela 25. Programa gradiente 4 (Desenvolvimento do método impurezas).

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	55	45	0
15	55	45	0
22	100	0	0
32	100	0	0
34	40	0	60
36	30	0	70
38	55	45	0
45	55	45	0

Tabela 26. Programa gradiente 5 (Desenvolvimento do método impurezas).

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	50	50	0
15	50	50	0
22	100	0	0
32	100	0	0
34	40	0	60
36	30	0	70
38	50	50	0
45	50	50	0

Com estas três experiências de programas de gradiente (gradientes 3, 4, 5), verificou-se que o gradiente que possibilitava uma melhor linha da base foi o programa de gradiente 3. Assim realizaram-se mais três experiências (programas de gradiente 6, 7, 8) em que a condição no tempo inicial seria 60 % da fase móvel A e 40 % da fase móvel B. Esta foi a condição inicial escolhida porque a fase móvel A tem mais acetonitrilo que a fase móvel B e então verificou-se que diminuindo ligeiramente a percentagem de orgânico (acetonitrilo) a resolução entre a Prilocaina HCl e a impureza iria melhorar.

Os programas de gradientes testados foram os seguintes (ver Tabelas 27, 28 e 29):

Tabela 27. Programa gradiente 6 para avaliar a resolução entre a substância ativa e a impureza.

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	60	40	0
15	60	40	0
27	100	0	0
37	100	0	0
39	40	0	60
41	30	0	70
43	60	40	0
47	60	40	0

No programa de gradiente 6, aumentou-se os tempos do gradiente de 22 min para 27 min de modo a que a % de ACN aumentasse de forma gradual no sistema. A resolução da impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina em relação à substância ativa Prilocaina HCl obtida foi de 2,91.

Tabela 28. Programa gradiente 7 para avaliar a resolução entre a substância ativa e a impureza.

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	60	40	0
15	60	40	0
22	90	10	0
32	90	10	0
34	40	0	60
36	30	0	70
38	60	40	0
42	60	40	0

Nesta experiência (programa de gradiente 7), modificou-se a % de Fase móvel A aos 22 min de 100% para 90% de forma a perceber qual a sua influência na resolução. Apesar da resolução da impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina em relação à substância ativa Prilocaína HCl ter aumentado de 2,91 para 3,07 relativamente ao programa de gradiente 6, verificou-se que este gradiente não era favorável pois haviam picos de placebo que ficavam sobrepostos aos picos das substâncias ativas e isso não é viável quando se desenvolve um método de impurezas.

Conclui-se assim que este gradiente não era o indicado para se obterem resultados positivos.

Tabela 29. Programa gradiente 8 para avaliar a resolução entre a substância ativa e a impureza.

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V) Canal A do HPLC	Fase móvel B (% V/V) Canal B do HPLC	Canal C do HPLC (Acetonitrilo)
0	60	40	0
15	60	40	0
30	100	0	0
40	100	0	0
42	40	0	60
44	30	0	70
46	60	40	0
50	60	40	0

O programa de gradiente 8 foi testado com base no gradiente 6 mas aumentou-se os tempos de gradiente de 27 min para 30 min e assim sucessivamente até aos 50 min, porque verificou-se ao longo dos testes de gradiente que diminuindo a quantidade de ACN no sistema melhorava-se a resolução.

A resolução da impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina em relação à substância ativa Prilocaina HCl a partir deste teste foi de 3,12.

O programa de gradiente 8 foi o escolhido para prosseguir o desenvolvimento analítico do método, visto ser o que proporcionava uma melhor linha de base e uma melhor resolução.

4.2 Estudo de degradação forçada

Quando se desenvolve um método de impurezas é necessário mostrar que este é “*stability indicating*”, isto é provar que o método permite detetar todos os possíveis produtos de degradação formados durante os estudos de envelhecimento acelerado e de estabilidade em condições normais. Para tal, é preciso realizar testes de degradação forçada nas substâncias ativas para induzir de forma artificial a formação de todos os possíveis produtos de degradação / impurezas / substâncias relacionadas [57,58].

De um modo geral, as condições de degradação forçada incluem, reações de hidrólise ácida (HCl), hidrólise básica (NaOH) e oxidação (H₂O₂) [57,58].

O objetivo das condições de degradação é atingir 10 a 20% de degradação das substâncias ativas, porque abaixo dos 10% de degradação podemos não obter níveis suficientes de produtos de degradação para que estes possam ser detetados e acima dos 20% podemos degradar demasiado as substâncias ativas e produzir resultados não realistas [57].

Neste trabalho experimental as substâncias ativas foram sujeitas às condições de degradação descritas na Tabela 30.

Tabela 30. Condições de degradação forçada para as substâncias ativas.

Substâncias ativas	Condições de degradação	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Prilocaina HCl	HCl 10N	60	80
	NaOH 10N	60	80
	H ₂ O ₂ 5%	60	80
Lidocaína HCl	HCl 10N	60	80
	NaOH 10N	60	80
	H ₂ O ₂ 5%	5	80

O estudo de degradação forçada foi realizado com as condições cromatográficas definidas, com a coluna cromatográfica escolhida e o programa de gradiente 8.

Foram analisadas uma solução de Prilocaina HCl e outra de Lidocaína HCl (C= 0,2 mg/mL) em condições normais para verificar se as substâncias ativas tinham impurezas e de seguida sujeitaram-se as substâncias ativas às condições de *stress* para verificar o aparecimento de produtos de degradação. Estas amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 10 (ver ponto 2.5 do Capítulo III).

Estes estudos foram efetuados com as substâncias ativas em separado, mas cada solução tinha uma concentração de C= 0,2 mg/mL para que as áreas fossem comparáveis. Até determinar quais os tempos de exposição ao calor foram realizados vários testes, os mais relevantes estão descritos na Tabela 30.

Os resultados obtidos neste estudo foram que as substâncias ativas não sofrem hidrólise ácida nem básica. Verificou-se sim, que estas sofrem degradação forçada por oxidação através do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 5%. Um fator relevante que se verificou foi que a substância ativa Lidocaína HCl degradava por completo por oxidação quando em contacto com o H₂O₂ durante 60 minutos, então foi-se diminuindo o tempo de exposição até obter um valor de degradação aceitável (entre 10 a 20%).

Os resultados de degradação forçada por oxidação encontram-se na Tabela 31.

Tabela 31. Resultados da degradação forçada por oxidação.

Substâncias ativas	Áreas (dos cromatogramas obtidos)		% de degradação
	Condições normais	Condições de degradação	
Prilocaina HCl	8897429	7596482	14,6%
Lidocaína HCl	4232809	3526206	16,7%

4.3 Determinação das condições do método analítico com recurso ao DoE

Depois de selecionada a coluna cromatográfica e o gradiente para o método analítico, fez-se um desenho de experiências para verificar a influência do fluxo de trabalho (mL/min), o volume de injeção (µL) e a temperatura da coluna (°C) no método analítico, nomeadamente nas respostas que pretendíamos avaliar, tais como a resolução, a simetria, o número de pratos teóricos e a % de impurezas.

No desenho de experiências que se segue estabeleceram-se as seguintes variações:

- Fluxo: entre 1,2 e 1,8 mL/min (ponto central 1,5 mL/min);
- Volume de injeção: entre 25 e 75 μ L (ponto central 50 μ L);
- Temperatura da coluna: 36 e 44 $^{\circ}$ C (ponto central 40 $^{\circ}$ C).

Estas variações foram selecionadas de acordo com a norma usada para validação de método analíticos da empresa, assim variou-se o fluxo \pm 20%, o volume de injeção \pm 50% e a temperatura da coluna \pm 4 $^{\circ}$ C a partir do ponto central.

Estes fatores e respostas em estudo foram colocados no *software* de desenho de experiências (programa JMP) e realizou-se um *Screening Design* (ver Figura 20).

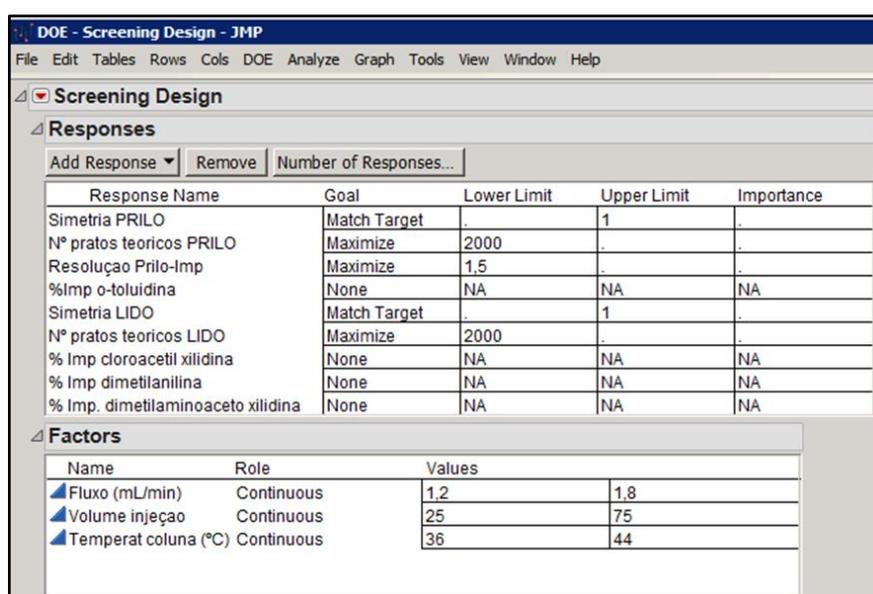


Figura 20. *Screening Design*: Introdução de fatores, respostas e objetivos no *software* JMP (método impurezas).

Como os tempos de corrida para cada injeção eram de 50 min, verificou-se que o tempo para realização destas experiências iria ser longo, pelo que se optou por escolher um desenho completo (*Full Factorial*) separado em dois blocos (como se pode ver na Figura 21) para que as experiências pudessem ser realizadas em dias diferentes.

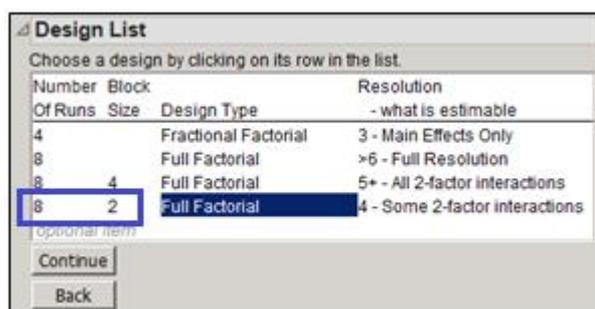


Figura 21. *Design List*: escolha do tipo de desenho fatorial em blocos.

Pelo *software* obteve-se a seguinte lista de experiências a realizar, que foram realizadas pela ordem aleatória desciminada por este (Figura 22).

	Pattern	Fluxo (mL/min)	Tempert coluna (°C)	Volume injeção	
Bloco 1	1	1,8	36	75	
	2	1,2	44	75	
	3	1,8	44	25	
	4	000	1,5	40	50
	5	---	1,2	36	25
Bloco 2	6	1,2	44	25	
	7	000	1,5	40	50
	8	---	1,2	36	75
	9	---	1,8	44	75
	10	---	1,8	36	25

Figura 22. Tabela de *full factorial* com as experiências a realizar (método impurezas).

Como se pode ver na Figura 22, cada bloco de experiências tem uma experiência que representa o ponto central (experiência 4 e 7), para que se possa analisar o ponto central em cada bloco.

Os critérios de avaliação a serem estudados estão descritos na Tabela 4 do Capítulo II com a particularidade que as % de impurezas são avaliadas com base no SOP (*Standard Operating Procedures*), isto é com base no procedimento padrão definido. No desenvolvimento do método em questão, as condições SOP são as referidas na USP [53], tais como o fluxo de trabalho de 1,5 mL/min, volume de injeção de 50 µL e a temperatura da coluna a 40 °C. Assim, as % de impurezas são calculadas da seguinte forma:

- % de impurezas: pode variar no máximo 5% da especificação relativamente à % de impurezas obtidas experimentalmente nas condições SOP.

Quanto à variação da % de impurezas, tendo em conta a especificação de cada impureza e as condições SOP é necessário calcular qual a variação permitida (ver Tabela 32).

Tabela 32. Avaliação das impurezas em relação às condições SOP.

Impurezas	Limites	Variações (Intervalo de % das impurezas em relação ao SOP)		
		% Min.	SOP (%)	% Máx.
o-toluidina	≤ 2,0% (5% de 2,0 é 0,1)	6,74%	6,84% (6,84 ± 0,1)	6,94%
N-cloroacetil-2,6-xilidina	≤ 0,1% (5% de 0,1 é 0,005)	0,180%	0,185% (0,185 ± 0,005)	0,190%
Dimetilnilina	≤ 0,1%	0,790%	0,795% (0,795 ± 0,005)	0,800%
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina	≤ 0,1%	0,500%	0,505% (0,505 ± 0,005)	0,510%

Os valores indicados na Tabela 32 a negrito são a média dos valores obtidos experimentalmente das experiências das linhas 4 e 7. A partir destes valores, foram determinados os valores mínimos e máximos para a % de variação de cada impureza, com base na subtração e soma do valor de 5% da especificação de cada impureza.

4.4 Interpretação dos resultados do DoE

Antes de iniciar o desenho de experiências como sabíamos que a sua duração iria ser longa foi necessário efetuar o estudo da estabilidade das soluções, isto é das soluções padrão e amostra (ver ponto 2.8 do Capítulo V).

As experiências foram realizadas conforme descrito e nas Tabelas 33 e 34 encontram-se os resultados obtidos para cada substância ativa conforme indicado.

Tabela 33. Resultados do desenho de experiências do método de impurezas para a substância ativa Prilocaina HCl.

N° da experiência	Fatores			Respostas Prilocaina HCl				
	Fluxo mL/min	Volume de Injeção (µL)	Temperatura coluna (°C)	Resolução (da impureza 2-dietilaminoaceto 2,4-xilidina em relação ao HCl Prilocaina)	Simetria	N° pratos teóricos	Tempo Retenção	% Imp. o-toluidina
1	1,8	75	36	3,21	1,01	10499	8,93	8,71
2	1,2	75	44	3,02	1,01	9865	14,82	8,70
3	1,8	25	44	3,04	1,05	10319	9,80	6,41
4	1,5	50	40	3,12	1,00	10609	11,29	6,84
5	1,2	25	36	3,24	1,02	11025	13,47	6,75
6	1,2	25	44	3,13	0,98	10074	15,48	6,79
7	1,5	50	40	3,23	1,00	10082	11,80	6,84
8	1,2	75	36	3,32	1,02	9687	14,12	6,78
9	1,8	75	44	3,05	0,99	9287	10,19	6,99
10	1,8	25	36	3,33	1,01	10024	9,32	6,84

Tabela 34. Resultados do desenho de experiências do método de impurezas para a substância ativa Lidocaína HCl.

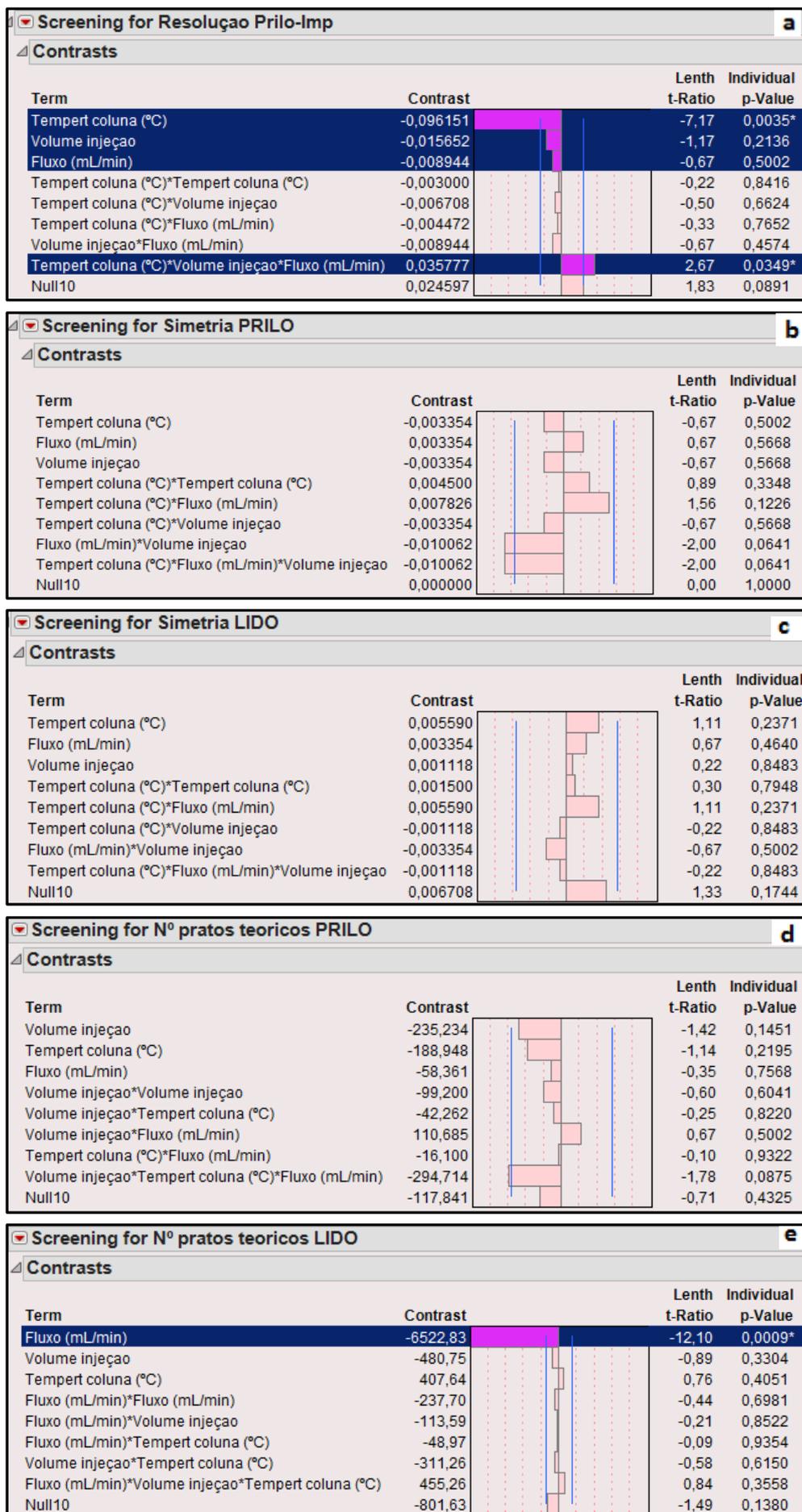
N° Exp.	Fatores			Respostas Lidocaína HCl					
	Fluxo mL/min	Volume de Injeção (µL)	Temperatura coluna (°C)	Simetria	N° pratos teóricos	Tempo Retenção	% Imp. N-cloro acetil-2,6-xilidina	% Imp. Dimetilanilina	% Imp. 2-dietilaminoaceto 2,4-xilidina
1	1,8	75	36	0,97	21782	22,28	0,18	0,93	0,52
2	1,2	75	44	0,98	36837	28,89	0,19	0,82	0,49
3	1,8	25	44	1,00	23913	22,90	0,20	0,84	0,49
4	1,5	50	40	0,99	29103	25,34	0,19	0,84	0,51
5	1,2	25	36	0,97	36637	28,41	0,20	0,88	0,49
6	1,2	25	44	0,97	39372	29,50	0,18	0,74	0,54
7	1,5	50	40	0,96	32688	26,02	0,18	0,75	0,50
8	1,2	75	36	0,98	37530	29,06	0,18	0,89	0,51
9	1,8	75	44	0,99	22906	23,57	0,18	0,85	0,58
10	1,8	25	36	0,97	23433	23,00	0,20	0,92	0,52

Nota: Nas Tabelas 33 e 34, as linhas a azul indicam os resultados obtidos nas condições SOP para cada substância ativa, respetivamente.

Os tempos de retenção para ambas as substâncias ativas são meramente indicativos, estes não foram avaliados estatisticamente.

Para cada experiência, é necessário efetuar uma calibração e analisar três amostras de fórmula reconstituída com adição de cada uma das impurezas em concentrações conhecidas.

De seguida, traçaram-se os gráficos de Screening (Figura 23):



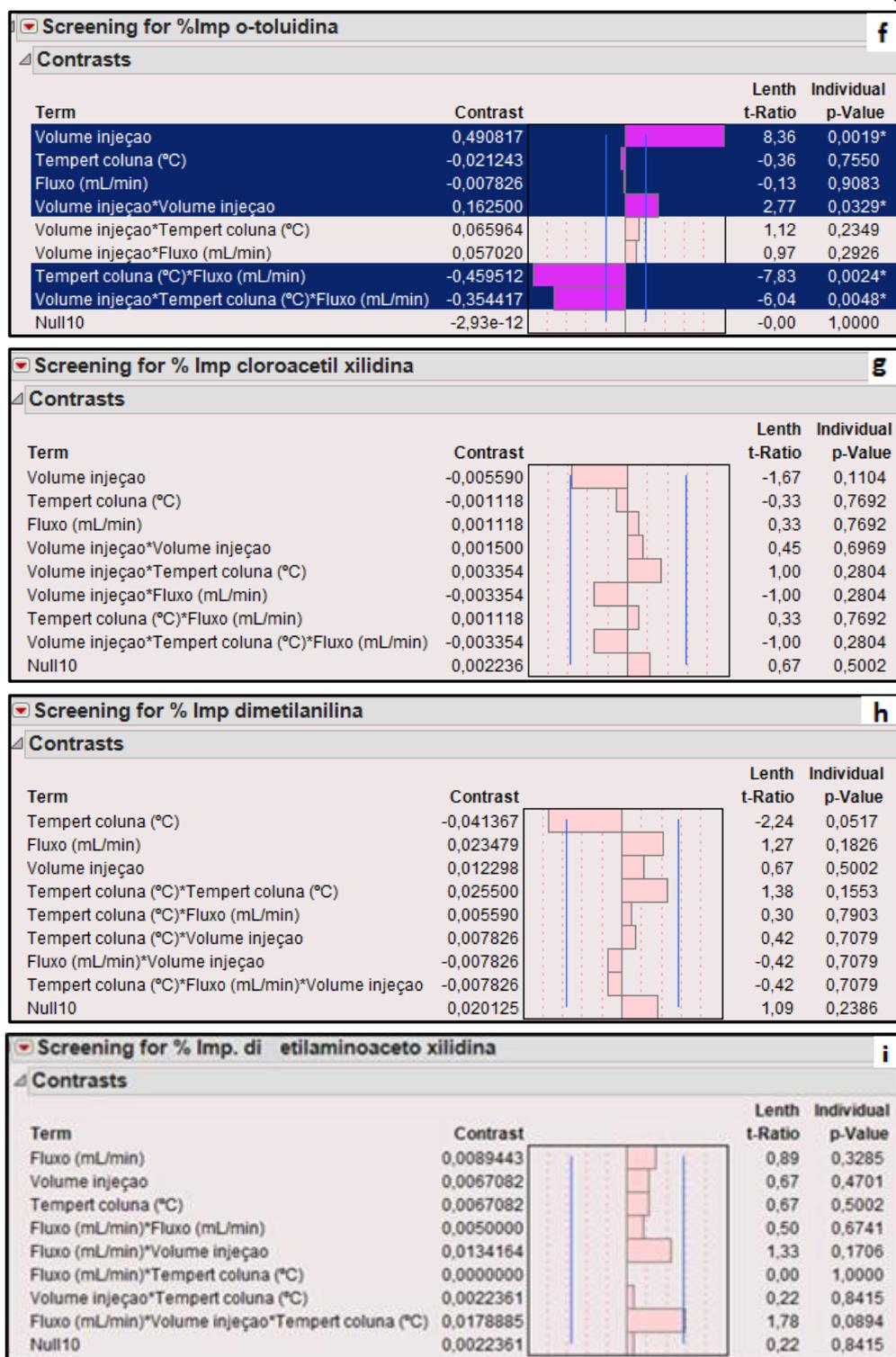


Figura 23. Influência dos fatores fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna nas respostas em estudo. (a – Screening da resolução entre os picos de Prilocaína HCl e a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina; b – Screening para a simetria da Prilocaína HCl; c – Screening para a simetria da Lidocaína HCl; d – Screening para o número de pratos teóricos da Prilocaína HCl; e – Screening para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl; f – Screening para a % da impureza o-toluidina; g – Screening para a % da impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina; h – Screening para a % da impureza dimetilaniлина; i – Screening para a % da impureza 2-dietilaminoaceto- 2,4 –xilidina).

A partir da Figura 23 a, observando o *screening* da resolução verifica-se que os fatores de temperatura e a interação temperatura, volume de injeção e fluxo influenciam esta resposta, pois os valores de *p-value* são $<0,05$ (* no valor individual de *p*) e as barras destes fatores (a rosa) estão fora dos limites (linhas azuis). Os fatores individuais de volume de injeção e fluxo apesar de não apresentarem um *p-value* $<0,05$ foram considerados por causa da interação, visto que quando se analisa uma interação os fatores individuais têm de estar contemplados no *screening*. Quanto aos valores na coluna *Contrast*, para os fatores individuais, verifica-se uma influência negativa na resposta da resolução, isto é o aumento da temperatura da coluna leva a uma diminuição da resolução.

Quanto à influência dos fatores na resposta da simetria da Prilocaína HCl (Figura 23 b) e da Lidocaína HCl (Figura 23 c) verifica-se que nenhum dos fatores influenciava significativamente estas respostas (não há nenhum *p-value* $<0,05$).

Em relação ao número de pratos teóricos para a Prilocaína HCl verifica-se que nenhum dos fatores afeta esta resposta (Figura 23 d). Quanto ao nº de pratos teóricos para a Lidocaína HCl (Figura 23 e), verifica-se que o fator fluxo influencia de forma negativa (valor na coluna *Contrast* negativo) esta resposta, visto que o *p-value* é $<0,05$ e a barra deste fator (a rosa) está fora dos limites (linhas azuis).

Quanto à influência dos fatores em relação à % de impurezas, verifica-se que a resposta % de impureza o-toluidina (Figura 23 f) é influenciada pelos fatores volume de injeção e pelas interações *volume de injeção x volume de injeção*, *temperatura x fluxo* e *volume de injeção x temperatura x fluxo*, pois os valores de *p-value* são $<0,05$ (* no valor individual de *p*) e as barras destes (a rosa) estão fora dos limites (linhas azuis). Quanto aos valores na coluna *Contrast*, o volume de injeção apresenta um valor positivo, o que significa que um aumento deste fator aumenta a % da impureza em questão.

Em relação às outras impurezas (Figura 23 g, h, i) verifica-se que nenhum fator estudado influencia de forma estatisticamente significativa a % de impurezas. Contudo, verifica-se que os resultados obtidos experimentalmente para estas impurezas descritos nas Tabelas 33 e 34 ultrapassam os limites mínimos e máximos permitidos (Tabela 32), e isto pode ser devido realmente à influência de outros fatores que não foram estudados e são por isso fatores desconhecidos.

De seguida (ver Tabela 35), encontram-se os valores da avaliação estatística das respostas influenciadas pelos fatores em estudo (determinado a partir do *screening*), com base no R^2 , no R^2 ajustado e na ANOVA obtidos através das equações de respostas.

Tabela 35. Análise estatística da influência dos fatores nas respostas (método de impurezas).

Análise estatística Respostas	R²	R² ajustado	Analysis of Variance Prob>F (p-value <0,05)
Resolução	0,939815	0,891666	0,0030
% Imp. o-toluidina	0,992632	0,977896	0,0027
Nº pratos teóricos Lidocaína HCl	0,967795	0,963769	<0,001

Com base na análise estatística obtida, conclui-se que estamos na presença de um bom modelo estatístico para a % da impureza o-toluidina e para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl, visto que os valores de R² e R² ajustado são próximos entre si e próximos de 1, e os valores obtidos na ANOVA são estatisticamente significativos (p-values <0,05). Contudo, para a resposta resolução entre os picos de Prilocaína HCl e a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina o modelo é menos robusto visto que os valores de R² e R² ajustado estão afastados entre si e mais afastados de 1.

De seguida, a partir da análise estatística foram determinados os resultados previstos para as respostas cuja avaliação estatística foi realizada (ver Tabela 36).

Tabela 36. Resultados previstos com base na avaliação estatística (método de impurezas).

Nº da experiência	Resultados Obtidos			Resultados Previstos		
	Resolução	Nº pratos teóricos HCl Lidocaína	% Imp. o-toluidina	Resolução	Nº pratos teóricos HCl Lidocaína	% Imp. o-toluidina
1	3,21	21782	8,71	3,20	23127	8,77
2	3,02	36837	8,70	3,02	377123	8,64
3	3,04	23913	6,41	3,03	23127	6,50
4	3,12	29103	6,84	3,17	30420	6,84
5	3,24	36637	6,75	3,26	37712	6,66
6	3,13	39372	6,79	3,12	37713	6,85
7	3,23	32688	6,84	3,17	30420	6,84
8	3,32	37530	6,78	3,31	37713	6,87
9	3,05	22906	6,99	3,07	23127	6,90
10	3,33	23433	6,84	3,33	23127	6,78

Na Tabela 36 estão representados os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos dados pelo modelo matemático. Como se pode ver na Tabela 36, os resultados obtidos através das dez experiências realizadas são semelhantes aos resultados previstos, confirmando-se assim que estamos na presença de um bom modelo mesmo para a resposta resolução, que apresentava um modelo menos robusto (R^2 e R^2 ajustado).

Os resultados previstos foram determinados com base no modelo matemático, e a partir destes valores que se determinaram os gráficos que se seguem.

Ao contrário do que foi feito no desenvolvimento do método de conteúdo, neste caso analisou-se primeiro o gráfico de contorno para as condições SOP (ponto central do DoE), como se pode ver de seguida (Figuras 24, 25 e 26):

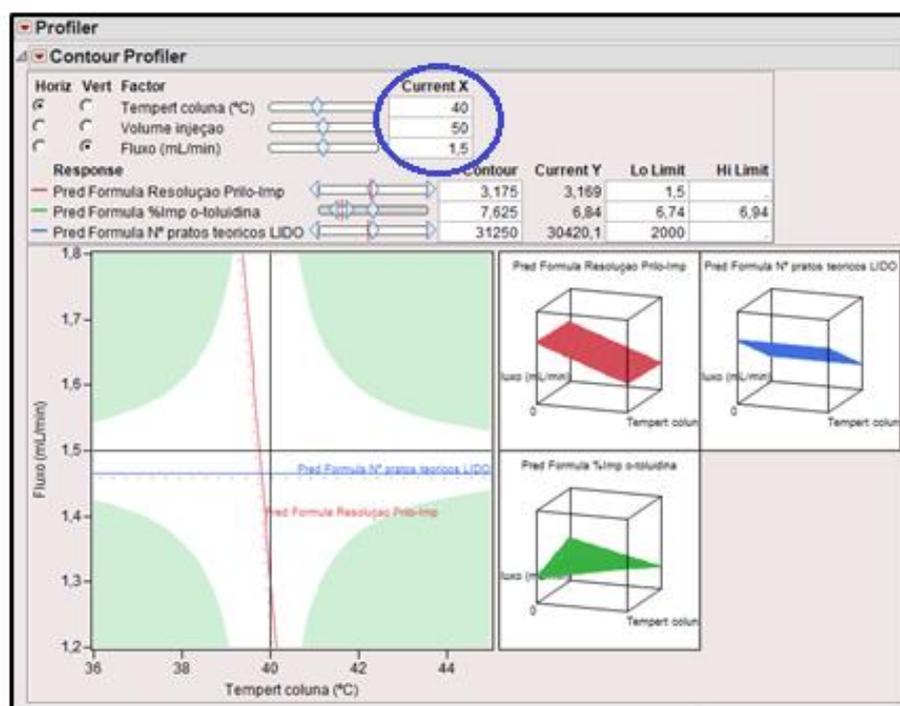


Figura 24. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Temperatura da coluna versus Fluxo.

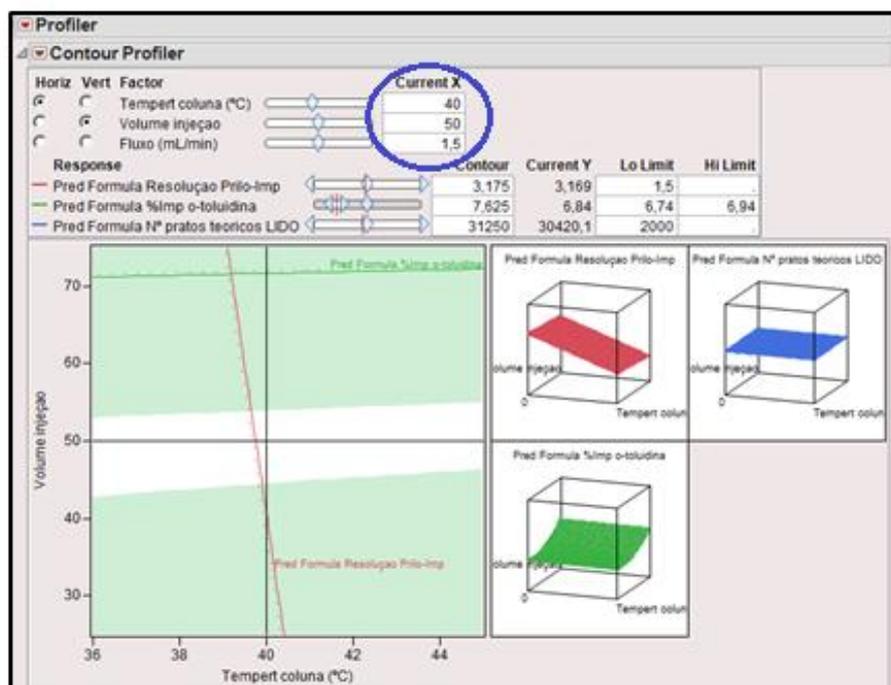


Figura 25. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Temperatura versus Volume de injeção.

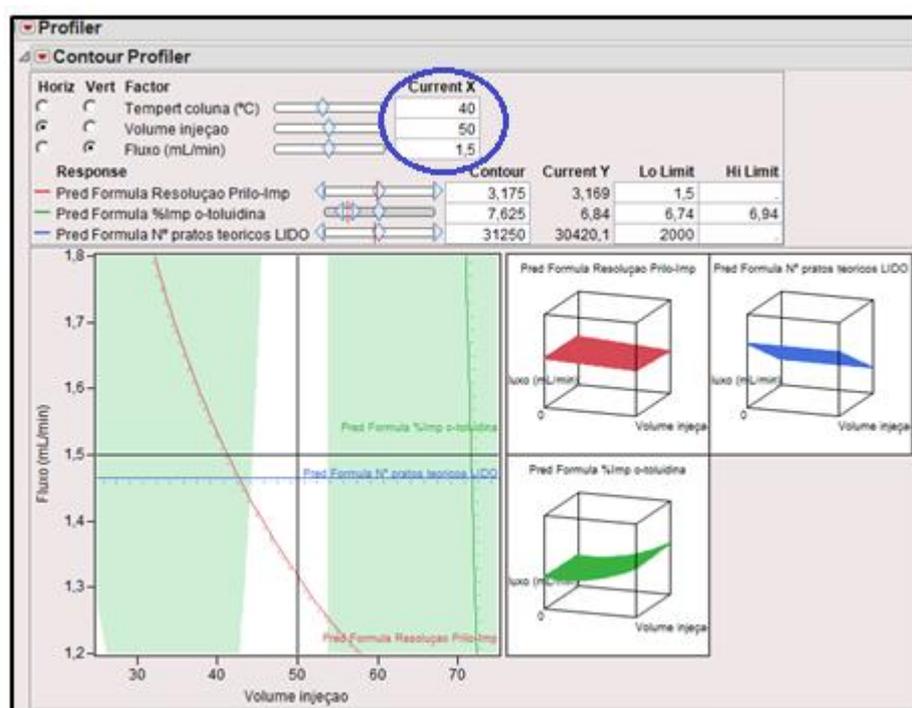


Figura 26. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Fluxo versus Volume de injeção,

A partir dos gráficos de contorno (Figuras 24, 25 e 26), verifica-se que a zona de trabalho é muito reduzida, contudo como o SOP definido (valores no *Current X*) está na zona branca (zona de trabalho), decidiu-se avançar com o método tendo como condições cromatográficas o SOP.

De seguida, representou-se o gráfico de perfil com as condições SOP (ver Figura 27) e como se pode ver o valor desejado (*Desirability*) é 1 (valor ideal).

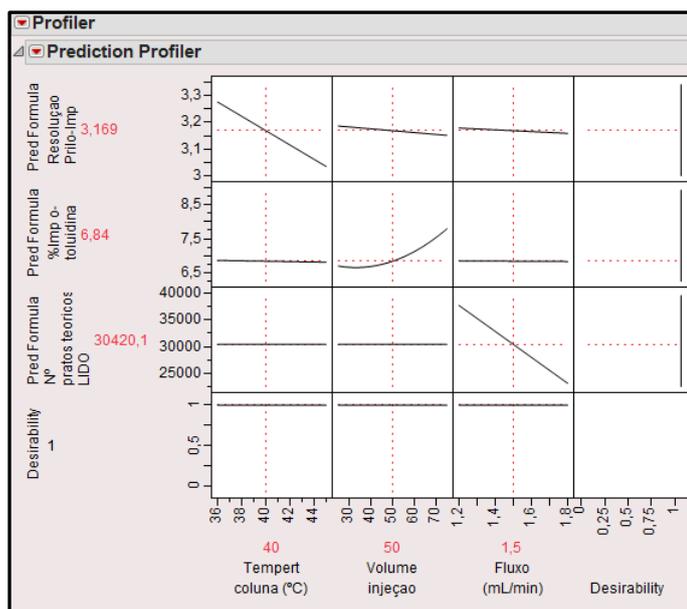


Figura 27. Perfil da influência dos fatores (fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna) nas condições SOP.

A Figura 27 representa em forma de perfil a influência dos fatores nas respostas avaliada através do screening da Figura 23.

4.5 Condições cromatográficas

Assim, as condições cromatográficas para avançar com a validação do método de impurezas encontram-se descritas na Tabela 37.

Tabela 37. Condições cromatográficas para a validação do método de impurezas.

Condições do sistema	
Coluna HPLC:	Luna C18 (2) 100Å 100 x 4,6mm, 3µm
Fases móveis:	Fases móveis A e B otimizadas
Fluxo:	1,5 mL/min
Temperatura:	40 °C
Deteção:	UV 232 nm
Volume de injeção:	50 µL
Solventes:	NaOH 5N HCl 5N Solução tampão KH ₂ PO ₄ 3,79 g/L:ACN (70:30% V/V).

c. Sequência de análise de acordo com a norma interna da empresa:

- Branco (fase móvel): 50 µL (2 injeções ou até o cromatograma estabilizar);
- Calibração com duas soluções padrão independentes:
 - Padrão #1: 50 µL (2 injeções);
 - Padrão #2: 50 µL (2 injeções);
- Amostras (máximo 6): 50 µL (injeção simples);
- Padrão #1 ou #2 (controle): 50 µL (injeção simples).

d. Teste de conformidade do sistema

Para as soluções padrão, efetuar a seguinte avaliação:

1) Calcular o fator de resposta (*RF*) para cada substância ativa, conforme a Equação 21.

Onde C_p é calculado através da seguinte fórmula (Equação 25):

$$C_p = \frac{M_p \times C_p \text{ teórica}}{50 \times 100} \times \frac{1}{100}; \text{ (Equação 25)}$$

50 = corresponde ao volume do balão volumétrico para preparar a solução (mL);

1/100 = corresponde à diluição a partir da solução stock.

2) Calcular o *RSD* de quatro *RF* obtidos nas injeções das soluções padrão #1 e #2.

$RSD (n=4) \leq 5,0\%$.

3) Calcular o *RF1* e *RF2* obtidos das duas injeções de cada solução padrão, para cada substancia ativa.

4) Calcular a relação dos fatores de resposta, com base na Equação 23. Pelo que o *R* tem se estar entre 95,0 e 105,0%.

5) Calcular a média dos *RF*, através da equação 24.

6) Identificação das impurezas:

Os tempos de retenção que se encontram na Tabela 38 foram determinados a partir do desenho de experiências, nomeadamente nas condições SOP:

- Fluxo: 1,5 mL/min;
- Volume de injeção: 50 µL;
- Temperatura da coluna: 40 °C.

Tabela 38. Identificação, tempos de retenção e respetivos tempos de retenção relativos (método impurezas).

Substâncias ativas / Impurezas	t_R (min)	RRT
Prilocaina HCl	≈ 11,4	-
Lidocaína HCl	≈ 25,4	-
o-toluidina	≈ 4,1	0,36 (em relação à Prilocaina HCl)
N-cloroacetil-2,6-xilidina	≈ 5,9	0,23 (em relação à Lidocaína HCl)
Dimetilnilina	≈ 7,4	0,29 (em relação à Lidocaína HCl)
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina	≈ 13,0	0,51 (em relação à Lidocaína HCl)

Capítulo V – Validação dos Métodos Analíticos

I Validação do método analítico para quantificação de conteúdo da prilocaína e lidocaína

Durante a validação do método de conteúdo foi considerada a solução amostra para as duas substâncias ativas (na forma de HCl) com uma concentração de 0,04 mg/mL como a solução a 100% (valor central da gama de linearidade em estudo).

Alguns dos parâmetros presentes na *Guideline Q2 (R1)* da ICH [36] para a validação de métodos analíticos não referem o número de amostras ou injeções necessárias, assim o critério usado foi o usual na validação de métodos analíticos na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A. Os limites de aceitação para os parâmetros de validação estão descritos na Tabela 5 do Capítulo II.

I.1 Testes de filtração

O processo de preparação de amostras é crucial quando se valida um método analítico. Como se pode verificar na monografia descrita na USP [53], as amostras antes de serem analisadas têm de ser filtradas, assim efetuaram-se testes de filtração para determinar quais os filtros compatíveis com as mesmas.

Este teste consistiu em:

- Analisar uma solução padrão antes da filtração (3 injeções consecutivas);
- Analisar a solução padrão filtrada três vezes com cada tipo de filtro: efetuar três filtrações independentes da mesma solução utilizando de cada vez um filtro independente;
- Efetuar injeções simples.

Em cada filtração, os dois primeiros mL da solução foram rejeitados.

Com este teste pretendeu-se estudar o efeito que a filtração apresenta na resposta da substância ativa filtrada em relação às soluções não filtradas.

A avaliação deste parâmetro de validação foi feita a partir da análise dos tempos de retenção de cada substância ativa e dos fatores de resposta ($RF = \text{Área}/\text{Concentração}$) das soluções não filtradas e filtradas.

Para além da solução padrão, foi analisado o branco (solvente) filtrado com os filtros referidos no ponto 1.5 do Capítulo III.

Os resultados obtidos com os diferentes filtros encontram-se nas Tabelas 39 (Prilocaina HCl) e 40 (Lidocaína HCl). A Tabela 41 apresenta em forma de resumo os resultados obtidos.

Tabela 39. Resultados dos testes de filtração para a substância ativa Prilocaina HCl (método conteúdo).

Solução Padrão ($C_{Real}=3,978E-02$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	1,940	342729	8,616E+06	1,942	343757	8,641E+06	1,944	344927	8,671E+06
Injeção #2	1,941	342511	8,610E+06	1,943	345199	8,678E+06	1,947	344988	8,672E+06
Injeção #3	1,941	342432	8,608E+06	1,944	343331	8,631E+06	1,943	345490	8,685E+06
Média		342557	8,611E+06		344096	8,650E+06		345135	8,676E+06
RSD (%)		0,04			0,28			0,09	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						-0,45			-0,75
<i>p-value</i>						0,115			0,000

(continuação)

Solução Padrão ($C_{Real}=3,978E-02$ mg/mL)	Filtrado com Nylon VWR 0,45 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m			Filtrado com PP VWR 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	1,946	342424	8,608E+06	1,947	344162	8,652E+06	1,957	341749	8,591E+06
Injeção #2	1,946	344989	8,672E+06	1,953	341943	8,596E+06	1,957	342708	8,615E+06
Injeção #3	1,949	344816	8,668E+06	1,950	342588	8,612E+06	1,954	342449	8,609E+06
Média		344076	8,649E+06		342898	8,620E+06		342302	8,605E+06
RSD (%)		0,42			0,33			0,14	
Desvio (%) relativo ao não filtrado			-0,44			-0,10			0,07
<i>p-value</i>			0,210			0,660			0,442

Tabela 40. Resultados dos testes de filtração para a substância ativa Lidocaína HCl (método conteúdo).

Solução Padrão ($C_{Real}=3,770E-02$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	4,534	148105	3,929E+06	4,539	149185	3,958E+06	4,543	149849	3,975E+06
Injeção #2	4,536	148457	3,938E+06	4,542	150307	3,987E+06	4,547	150540	3,994E+06
Injeção #3	4,537	148455	3,938E+06	4,542	149008	3,953E+06	4,543	150849	4,002E+06
Média		148339	3,935E+06		149500	3,966E+06		150413	3,990E+06
RSD (%)		0,14			0,47			0,34	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						-0,78			-1,39
<i>p-value</i>						0,052			0,003

(continuação)

Solução Padrão ($C_{Real} = 3,770E-02$ mg/mL)	Filtrado com Nylon VWR 0,45 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m			Filtrado com PP VWR 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	4,549	149048	3,954E+06	4,552	150304	3,987E+06	4,566	149467	3,965E+06
Injeção #2	4,549	150771	4,000E+06	4,559	149323	3,961E+06	4,568	150007	3,979E+06
Injeção #3	4,552	150539	3,994E+06	4,556	149194	3,958E+06	4,565	149372	3,963E+06
Média		150119	3,982E+06		149607	3,969E+06		149615	3,969E+06
RSD (%)		0,62			0,41			0,23	
Desvio (%) relativo ao não filtrado			-1,19			-0,86			-0,86
<i>p-value</i>			0,084			2,132			0,005

Tabela 41. Resumo com a avaliação dos resultados dos testes de filtração para as duas substâncias ativas (método conteúdo).

Substâncias ativas	Limites		Nylon VWR 0,2 μ m	PVDF Millipore 0,22 μ m	Nylon VWR 0,45 μ m	GHP Pall 0,45 μ m	PP VWR 0,45 μ m
	Prilocaina HCl	Desvio (%)	≤ 2	-0,45%	-0,75%	-0,44%	-0,10%
<i>p-value</i>		$\geq 0,05$	0,115	0,000	0,210	0,660	0,442
Lidocaína HCl	Desvio (%)	≤ 2	-0,78%	-1,39%	-1,19%	-0,86%	-0,86%
	<i>p-value</i>	$\geq 0,05$	0,052	0,003	0,084	2,132	0,005

Em termos cromatográficos, relativamente à análise do branco verificou-se que os sistemas de filtração não provocaram alterações no cromatograma e na solução padrão não houve mudanças significativas nos tempos de retenção (como se pode ver nas Tabelas 39 e 40).

A avaliação da influência da filtração foi feita com base no desvio (em %) relativo à solução não filtrada (calculada através da Equação 20 – Capítulo I). Como se pode ver na Tabela 41, os desvios em relação à solução padrão não filtrada são $\leq 2\%$ para todos os filtros testados.

De seguida efetuou-se, o teste F que em termos estatísticos, é um teste de hipóteses para analisar a adequabilidade do modelo, para verificar se havia alterações significativas entre os filtros a testar e por fim efetuou-se o teste de *t-student* para avaliar o *p-value* (cálculo efetuado através dos RF das soluções filtradas em relação à solução padrão não filtrada). Este valor deve ser $\geq 0,05$ para que os valores sejam estatisticamente semelhantes (para um grau de confiança de 95%). Verificou-se que nem todos os filtros apresentam um *p-*

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
 Capítulo V
 $value \geq 0,05$ (ver Tabela 41), como é o caso dos filtros PVDF Millipore 0,22 μm para as duas substâncias ativas e os filtros PP 0,45 μm para a Lidocaína HCl, pelo que estes não seriam os filtros escolhidos, visto que os resultados não são estatisticamente semelhantes.

Neste trabalho, decidiu-se escolher o filtro Nylon VWR 0,2 μm para avançar com a validação do método, porque este apresenta bons resultados para as duas substâncias ativas e é o que possui um poro de membrana mais pequeno, o que no caso desta formulação é vantajoso devido à complexidade da composição da matriz da amostra.

1.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da análise (dupla injeção) das soluções, segundo o método analítico, pela seguinte ordem:

- Branco (solvente – fase móvel);
- Solução padrão para as duas substâncias ativas a 100% ($C=0,04 \text{ mg/mL}$);
- Solução placebo (excipientes) após filtração;
- Solução de fórmula reconstituída após filtração.

Os resultados obtidos em termos de parâmetros de conformidade encontram-se na Tabela 42.

Tabela 42. Resultados obtidos para os parâmetros de conformidade a partir da solução de fórmula reconstituída (método conteúdo).

Substâncias ativas	Parâmetros (avaliação da injeção #1 da solução de fórmula reconstituída)				
	Tempo de retenção (min)	Áreas	Simetria	Nº Pratos Teóricos	k'
Prilocaína HCl ($C_{\text{Real}}=4,05\text{E-}02 \text{ mg/mL}$)	1,941	342326	1,17	2960	2,88
Lidocaína HCl ($C_{\text{Real}}=3,76\text{E-}02 \text{ mg/mL}$)	4,527	154781	1,08	2960	8,05

Na Tabela 42, em relação aos parâmetros de conformidade verificou-se que para as duas substâncias ativas a simetria apresenta um valor relativamente próximo de 1, o número de pratos teóricos é superior a 2000 e os valores de k' são superiores a 2, o que significa que se cumprem os parâmetros de conformidade do sistema.

A partir dos cromatogramas obtidos verificou-se que não havia interferências da fase móvel, nem da mistura de excipientes e os cromatogramas apresentam uma linha de base estável (consultar Anexos – Cromatogramas 13 e 14, respetivamente). As duas substâncias

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
 Capítulo V
 ativas distinguem-se perfeitamente na solução padrão (consultar Anexos – Cromatograma 15) e na solução de fórmula reconstituída (consultar Anexos – Cromatograma 16).

Deste modo, pode afirmar-se que o método é específico para a Prilocaína HCl e Lidocaína HCl.

1.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da curva de calibração pela análise de cinco soluções padrão com as respectivas concentrações de Prilocaína HCl e Lidocaína HCl a 60%, 80%, 100%, 120% e 140%.

As soluções foram analisadas com injeção dupla de acordo com o método definido e foram calculados os fatores de respostas para ambas as substâncias ativas (Tabelas 43 e 45).

Para cada uma das substâncias ativas foram calculados os parâmetros de regressão linear: a % de desvio à ordenada na origem em relação à concentração de 100%, o coeficiente de correlação (r), o declive e a soma dos quadrados dos resíduos (Tabelas 44 e 46).

Tabela 43. Resultados da linearidade para Prilocaína HCl (método de conteúdo).

Prilocaína HCl					
Nível de Concentração (%) / (mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
60% (C=0,024 mg/mL)	2,409E-02	206495	205118	205807	8,543E+06
80% (C=0,034 mg/mL)	3,196E-02	275254	275292	275273	8,613E+06
100% (C=0,040 mg/mL)	3,978E-02	343319	342238	342779	8,617E+06
120% (C=0,048 mg/mL)	4,780E-02	409981	411233	410607	8,590E+06
140% (C=0,056 mg/mL)	5,575E-02	478315	480146	479231	8,596E+06

Gráfico 1. Curva de linearidade da Prilocaína HCl (método de conteúdo).

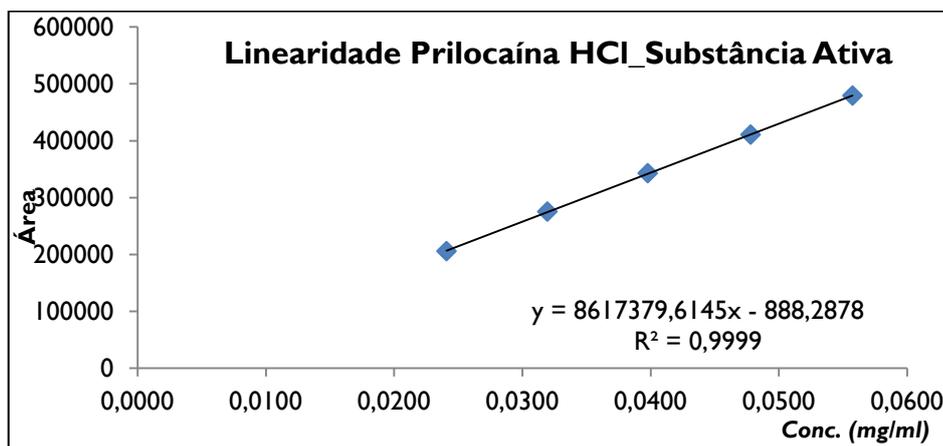


Tabela 44. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Prilocaína HCl (método de conteúdo).

Parâmetros	Prilocaína HCl (Substância ativa)	Limites
Desvio à ordenada na origem (%)	-0,26%	≤±3%
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	≥0,997
Declive	8617380	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	46535684920	

O Gráfico 1 representa a curva de linearidade da Prilocaína HCl com base na equação $y = mx + b$, onde m representa o declive e b representa a ordenada na origem (interseção da reta com o eixo dos y). A % de desvio à ordenada na origem foi calculada através da equação 11 (Capítulo I) e o coeficiente de correlação (r) pela expressão $\sqrt{R^2}$. Como se pode verificar na Tabela 44, os limites de aceitação recomendados foram cumpridos.

Tabela 45. Resultados da linearidade da Lidocaína HCl (método de conteúdo).

Lidocaína HCl					
Nível de Concentração (%)/(mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
60% (C=0,024 mg/mL)	2,267E-02	93298	92695	92997	4,102E+06
80% (C=0,034 mg/mL)	3,026E-02	124875	124911	124893	4,127E+06
100% (C=0,040 mg/mL)	3,770E-02	156236	155546	155891	4,135E+06
120% (C=0,048 mg/mL)	4,521E-02	185641	185868	185755	4,109E+06
140% (C=0,056mg/mL)	5,274E-02	217757	218935	218346	4,140E+06

Gráfico 2. Curva de linearidade da Lidocaína HCl (método de conteúdo).

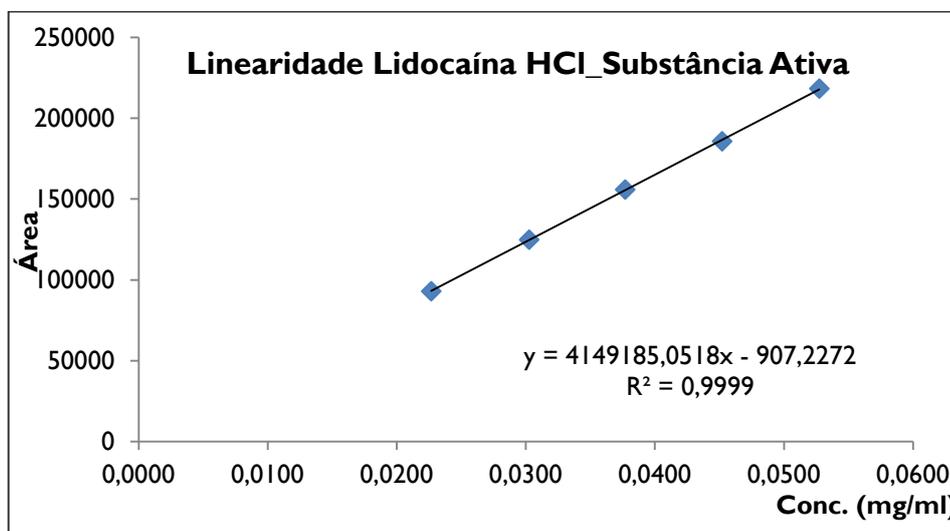


Tabela 46. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Lidocaína HCl (método de conteúdo).

Parâmetros	Lidocaína HCl (Substância ativa)	Limites
Desvio à ordenada na origem (%)	-0,58%	≤±3%
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	≥0,997
Declive	4149185	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	9707290198	

O Gráfico 2 representa a curva de linearidade da Lidocaína HCl e como se pode verificar na Tabela 46, os limites de aceitação recomendados foram também cumpridos.

A partir dos valores obtidos, pode afirmar-se que o método é linear para as duas substâncias ativas dentro da gama de trabalho estabelecida.

1.4 Precisão do sistema

A precisão do sistema traduz a precisão do equipamento. A avaliação da precisão do sistema foi feita através da análise de uma solução padrão e de uma solução de fórmula reconstituída. Foram efetuadas seis injeções consecutivas da solução padrão e da solução de fórmula reconstituída (após filtração).

Os resultados obtidos para a precisão do sistema encontram-se nas Tabelas 47 (Prilocaína HCl) e 48 (Lidocaína HCl).

Tabela 47. Resultados da precisão do sistema para Prilocaína HCl.

Injeção n°	Prilocaína HCl na solução padrão a 0,04 mg/mL			Prilocaína HCl na fórmula reconstituída a 0,04 mg/mL		
	Conc. Real (mg/mL)	Áreas	RF	Conc. Real (mg/mL)	Áreas	RF
1	3,988E-02	355537	8,915E+06	4,034E-02	358220	8,880E+06
2		355707	8,919E+06		356523	8,838E+06
3		353694	8,869E+06		356542	8,838E+06
4		351744	8,820E+06		358101	8,877E+06
5		357086	8,954E+06		359457	8,911E+06
6		358044	8,978E+06		359532	8,913E+06
Média			8,909E+06			8,876E+06
SD			57362			32910
RSD (%)			0,64			0,37

Tabela 48. Resultados da precisão do sistema para Lidocaína HCl.

Injeção n°	Lidocaína HCl na solução padrão a 0,04 mg/mL			Lidocaína HCl na fórmula reconstituída a 0,04 mg/mL		
	Conc. Real (mg/mL)	Áreas	RF	Conc. Real (mg/mL)	Áreas	RF
1	3,745E-02	158922	4,243E+06	3,755E-02	162645	4,332E+06
2		158529	4,233E+06		161624	4,305E+06
3		158150	4,223E+06		161797	4,309E+06
4		156353	4,175E+06		162955	4,340E+06
5		158765	4,239E+06		163286	4,349E+06
6		158921	4,243E+06		163537	4,356E+06
Média			4,226E+06			4,332E+06
SD			26298			20850
RSD (%)			0,62			0,48

Os valores de SD (ou s) e de RSD foram calculados através das equações 12 e 13 (Capítulo I), respetivamente.

Como se verifica nas Tabelas 47 e 48, os valores de RSD dos fatores de resposta são $\leq 2\%$, logo o equipamento analítico é preciso e ocorrem desvios pouco significativos nos fatores de resposta para as duas substâncias ativas.

1.5 Precisão do método

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade. Este parâmetro consiste em analisar seis amostras independentes. Ao contrário dos outros parâmetros de validação em que se analisou a fórmula reconstituída, a análise da repetibilidade é feita com “amostras reais”, isto é formulação com as substâncias ativas incorporadas.

As amostras foram avaliadas em termos de % de conteúdo, o que pressupõe a verificação de uma calibração com duas soluções padrão independentes.

Para calcular o conteúdo (%) de Prilocaina HCl e Lidocaína HCl na formulação efetua-se o seguinte cálculo (Equação 26):

$$\% \text{ Conteúdo} = Aa \times \frac{100}{MRF \times Ma \times \frac{2}{10}} \times 100; \quad (\text{Equação 26})$$

Aa = área do pico de cada substância ativa na solução amostra;

100 = corresponde ao volume do balão volumétrico para preparar a solução (mL);

MRF = média do RF ;

Ma = massa da amostra (mg);

$2/10$ = corresponde à diluição a partir da solução *stock*;

100 = conversão para percentagem.

Os resultados para as duas substâncias ativas encontram-se na Tabela 49.

Tabela 49. Resultados da precisão do método para as duas substâncias ativas.

Amostras Reais		Prilocaina HCl	Lidocaína HCl
		Conteúdo (%)	Conteúdo (%)
Amostra #1		102,90	97,62
Amostra #2		101,83	97,49
Amostra #3		99,28	97,95
Amostra #4		102,69	98,55
Amostra #5		102,98	98,89
Amostra #6		102,29	98,12
Média (%)		102,0	98,1
SD (%)		1,40	0,54
RSD (%)		1,37	0,55
95% CI	Min. (%)	100,53	97,53
	Máx. (%)	103,47	98,67

Como se pode ver na Tabela 49, os valores individuais de % de conteúdo estão entre 97% e 103% e os valores de RSD são $\leq 3\%$, verificando-se assim que o método analítico é preciso, quando se analisam amostras diferentes sob as mesmas condições num curto espaço de tempo.

Para além disso foi determinado o intervalo de confiança a 95% (através da Equação 14 do Cap. I) para as médias dos conteúdos obtidos nas duas substâncias ativas, obtendo-se um intervalo de estimativas prováveis com 95% de certeza.

1.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação das soluções de fórmula reconstituída.

A recuperação foi demonstrada a partir de soluções com três níveis de concentração, nomeadamente, a 60%, 100 e 140%. Para cada concentração foram preparadas três amostras tendo em conta a concentração teórica de cada substância ativa e a respetiva compensação de mistura de excipientes.

Esta análise pressupõe a verificação de uma calibração com duas soluções padrão independentes preparadas segundo o método analítico, para que se possa calcular a recuperação de cada amostra.

As % de recuperação foram calculadas a partir da equação 15 (Capítulo I) e os valores encontram-se nas Tabelas 50 (Prilocaina HCl) e 51 (Lidocaína HCl).

Tabela 50. Resultados de recuperação para a Prilocaina HCl (método conteúdo).

Prilocaina HCl (Fórmula Reconstituída)		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
60%	#1	2,403184 E-02	209516	2,363021 E-02	98,33	98,38	0,40	0,41	97,39	99,37
	#2	2,401188 E-02	208651	2,353265 E-02	98,00					
	#3	2,375240 E-02	208069	2,346701 E-02	98,80					
100%	#1	4,007968 E-02	346224	3,904878 E-02	97,43	98,53	0,99	1,00	96,07	100,99
	#2	4,015952 E-02	351845	3,968274 E-02	98,81					
	#3	3,997988 E-02	352147	3,971680 E-02	99,34					
140%	#1	5,574828 E-02	492133	5,550509 E-02	99,56	99,3%	0,24	0,24	98,77	99,97
	#2	5,584808 E-02	490729	5,534674 E-02	99,10					
	#3	5,606764 E-02	494420	5,576303 E-02	99,46					

Tabela 51. Resultados de recuperação para a Lidocaína HCl (método conteúdo).

Lidocaína HCl (Fórmula Reconstituída)		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
60%	#1	2,265109E-02	94841	2,251348E-02	99,39	98,82	0,88	0,89	96,63	101,01
	#2	2,255718E-02	92943	2,206293E-02	97,81					
	#3	2,253840E-02	94250	2,237319E-02	99,27					
100%	#1	3,771426E-02	156582	3,716963E-02	98,56	99,49	0,95	0,95	97,13	101,85
	#2	3,758278E-02	157484	3,738375E-02	99,47					
	#3	3,780817E-02	159986	3,797768E-02	100,45					
140%	#1	5,268351E-02	22179	5,274113E-02	100,11	99,81	0,39	0,40	98,84	100,78
	#2	5,262716E-02	220283	5,229106E-02	99,36					
	#3	5,273986E-02	222070	5,271526E-02	99,95					

Como se pode ver nas Tabelas 50 e 51, os valores individuais de recuperação estão entre 97% e 103% e os valores de RSD são $\leq 3\%$ em todos os níveis de concentração.

Foram calculados os intervalos de confiança a 95% para as médias de recuperação obtidas com base no mesmo princípio descrito no ponto anterior.

Verificou-se assim, que o método é exato, pois obtiveram-se bons resultados de recuperação nos três níveis de concentração (pontos extremos e intermédio da gama de trabalho).

1.7 Estudo de Estabilidade das soluções

O estudo da estabilidade consiste em avaliar a estabilidade das soluções padrão e das soluções de fórmula reconstituída à temperatura ambiente considerando como tempo inicial o $t=0h$. De modo a efetuar o estudo da estabilidade das soluções, analisaram-se três soluções padrão e três soluções de fórmula reconstituída após filtração. Estas soluções foram mantidas à temperatura ambiente e analisadas com injeção dupla em intervalos de 24h. Os resultados das Tabelas 52 e 53 dizem respeito à estabilidade dos padrões e os resultados das Tabelas 55 e 56 à estabilidade das amostras. Nestas tabelas encontram-se os valores de RF, as médias dos RF's, os valores de % RSD (em relação aos RF) e as % de desvios da média dos RF's dos tempos 24h e 48h em relação ao $t=0h$ (com base na equação 18 – Capítulo I). As Tabelas 54 e 57 apresentam a avaliação dos desvios e os *p-value*.

Tabela 52. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para Prilocaína HCl (método conteúdo).

Temperatura ambiente	Concentração Real (mg/mL)		Áreas			RF	Média RF Prilocaína HCl (n=3)	RSD dos RF (%)	%Desvio RF em relação $t = 0h$
			Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)				
t = 0h	Sol. Padrão #1	3,952E-02	361820	358638	360229	9,115E+06	9,024E+06	0,87	-
	Sol. Padrão #2	3,984E-02	353628	361658	357643	8,977E+06			
	Sol. Padrão #3	4,040E-02	360256	365331	362794	8,980E+06			
t = 24 h	Sol. Padrão #1	3,952E-02	356321	357491	356906	9,031E+06	9,013E+06	0,19	-0,12
	Sol. Padrão #2	3,984E-02	358812	359238	359025	9,012E+06			
	Sol. Padrão #3	4,040E-02	362602	364257	363430	8,996E+06			
t = 48 h	Sol. Padrão #1	3,952E-02	355978	355345	355662	8,999E+06	9,009E+06	0,19	-0,17
	Sol. Padrão #2	3,984E-02	360544	358921	359733	9,029E+06			
	Sol. Padrão #3	4,040E-02	363721	363437	363579	9,000E+06			

Tabela 53. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para Lidocaína HCl (método conteúdo).

Temperatura ambiente	Concentração Real (mg/mL)		Áreas			RF	Média RF Lidocaína HCl (n=3)	RSD dos RF (%)	%Desvio RF em relação $t = 0h$
			Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)				
t = 0h	Sol. Padrão #1	3,741E-02	165010	163452	164231	4,390E+06	4,350E+06	1,16	-
	Sol. Padrão #2	3,771E-02	159927	163911	161919	4,293E+06			
	Sol. Padrão #3	3,775E-02	163696	166116	164906	4,368E+06			
t = 24 h	Sol. Padrão #1	3,741E-02	162612	163403	163008	4,357E+06	4,353E+06	0,71	0,07
	Sol. Padrão #2	3,771E-02	162604	163263	162934	4,320E+06			
	Sol. Padrão #3	3,775E-02	165169	165628	165399	4,381E+06			
t = 48 h	Sol. Padrão #1	3,741E-02	161804	161748	161776	4,324E+06	4,330E+06	0,68	-0,46
	Sol. Padrão #2	3,771E-02	162373	162326	162350	4,305E+06			
	Sol. Padrão #3	3,775E-02	164416	164983	164700	4,363E+06			

Tabela 54. Avaliação dos desvios e do *p*-value para as soluções padrão (método conteúdo).

Substâncias ativas	tempos (h)	% Desvio RF em relação ao $t=0h$ ($\leq 2\%$)	<i>p</i> -value $\geq 0,05$
Prilocaina HCl	$t=24h$	-0,12%	0,79
	$t=48h$	-0,17%	0,80
Lidocaína HCl	$t=24h$	0,07%	0,91
	$t=48h$	-0,46%	0,48

Tabela 55. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para Prilocaina HCl (método conteúdo).

Temperatura ambiente	Concentração Real (mg/mL)		Áreas			RF	Média RF Prilocaina HCl (n=3)	RSD dos RF (%)	%Desvio RF em relação $t = 0h$
			Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)				
t = 0h	Sol.Amostra #1	4,048E-02	353935	362661	358298	8,851E+06	8,896E+06	0,45	-
	Sol.Amostra #2	4,056E-02	359151	363792	361472	8,912E+06			
	Sol.Amostra #3	4,048E-02	361214	361487	361351	8,926E+06			
t = 24 h	Sol.Amostra #1	4,048E-02	359019	358522	358771	8,863E+06	8,862E+06	0,47	-0,38
	Sol.Amostra #2	4,056E-02	363698	358576	361137	8,903E+06			
	Sol.Amostra #3	4,048E-02	356813	357320	357067	8,821E+06			
t = 48 h	Sol.Amostra #1	4,048E-02	357907	358105	358006	8,844E+06	8,831E+06	0,18	-0,73
	Sol.Amostra #2	4,056E-02	359054	357750	358402	8,836E+06			
	Sol.Amostra #3	4,048E-02	356804	356769	356787	8,814E+06			

Tabela 56. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para Lidocaína HCl (método conteúdo).

Temperatura ambiente	Concentração Real (mg/mL)		Áreas			RF	Média RF Locaína HCl (n=3)	RSD dos RF (%)	%Desvio RF em relação $t=0h$
			Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)				
t = 0h	Sol.Amostra #1	3,766E-02	161571	164664	163118	4,331E+06	4,357E+06	0,54	-
	Sol.Amostra #2	3,766E-02	163958	165761	164860	4,378E+06			
	Sol.Amostra #3	3,758E-02	163821	164064	163943	4,362E+06			
t = 24 h	Sol.Amostra #1	3,766E-02	163553	163471	163512	4,342E+06	4,352E+06	0,78	-0,11
	Sol.Amostra #2	3,766E-02	166745	163923	165334	4,390E+06			
	Sol.Amostra #3	3,758E-02	162364	162724	162544	4,325E+06			
t = 48 h	Sol.Amostra #1	3,766E-02	162524	162598	162561	4,317E+06	4,320E+06	0,43	-0,85
	Sol.Amostra #2	3,766E-02	163555	163336	163446	4,340E+06			
	Sol.Amostra #3	3,758E-02	161409	162049	161729	4,303E+06			

Tabela 57. Avaliação dos desvios e do *p-value* para as soluções amostra (método conteúdo).

Substâncias ativas	tempos (h)	% Desvio RF em relação ao $t=0h$ ($\leq 2\%$)	<i>p-value</i> $\geq 0,05$
Prilocaína HCl	$t=24h$	-0,38%	0,45
	$t=48h$	-0,73%	0,17
Lidocaína HCl	$t=24h$	-0,11%	0,80
	$t=48h$	-0,85%	0,10

Como se pode verificar pela análise dos resultados apresentados nas Tabelas 54 e 57, os desvios do RF em relação ao $t=0h$ são inferiores a 2% (valores positivos ou negativos, consoante o aumento ou diminuição das médias dos RF em relação ao $t=0h$, respetivamente), logo as soluções (padrão e amostra) são estáveis durante 48h. Os valores de *p-value* obtidos foram calculados a partir dos fatores de resposta dos tempos 24h e 48h em relação ao $t=0h$ são $\geq 0,05$, o que prova que os valores são estatisticamente semelhantes, para um grau de confiança de 95%.

1.8 Robustez

A determinação da robustez dos métodos analíticos não é um parâmetro obrigatório da validação analítica como se pode verificar na Tabela 2 do Capítulo I.

Contudo neste método, decidiu-se avaliar a sua robustez através do desenho de experiências porque este parâmetro dá indicações importantes sobre a confiança e segurança analítica do método.

A robustez foi avaliada em termos de alteração do fluxo de trabalho (alterações de 20%), do volume de injeção (alterações de 50%) e da temperatura da coluna (alterações de $\pm 4^{\circ}\text{C}$), como se pode ver a seguir:

- Fluxo: entre 1,2 e 1,8 mL/min (ponto central 1,5 mL/min);
- Volume de injeção: entre 5 e 15 μL (ponto central 10 μL);
- Temperatura da coluna: 36 e 44 $^{\circ}\text{C}$ (ponto central 40 $^{\circ}\text{C}$).

Com base na variação destes parâmetros (fatores), avaliaram-se as repostas de acordo com os critérios de aceitação (ver Tabela 5, Cap. II), nomeadamente:

- a simetria (A_s);
- o número de pratos teóricos (N);
- o k' (K prime);
- as percentagens de recuperação para as substâncias ativas (parâmetro crucial para determinar a robustez do método, porque o método de conteúdo é usado para quantificar as substâncias ativas na formulação).

De seguida, os fatores, as respostas descritas em cima e os respetivos objetivos foram colocados no *software* de DoE (programa JMP) e realizou-se um *Screening Design* (Figura 28). Os limites das respostas foram introduzidos no *software* com os mínimos e máximos de acordo com os valores a avaliar.

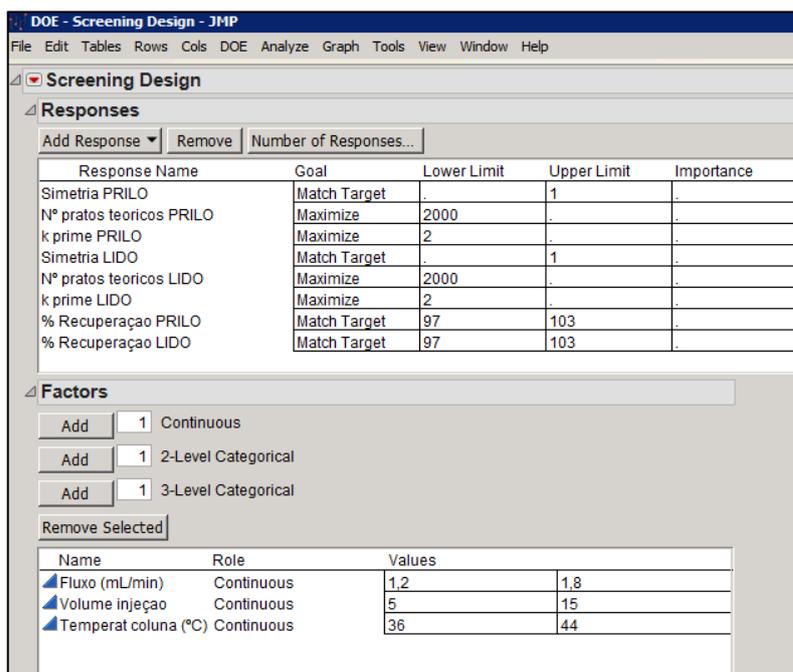


Figura 28. *Screening Design*: Introdução de fatores, respostas e objetivos no *software* JMP para avaliação da robustez do método de conteúdo.

O tipo de desenho escolhido foi um desenho completo (*Full Factorial*) num único bloco e a lista de experiências a realizar dada pelo *software* encontra-se na Figura 29.

	Pattern	Fluxo (mL/min)	Volume injeção	Temperat coluna (°C)
1	--+	1,2	15	44
2	++	1,8	5	44
3	--+	1,2	15	36
4	+++	1,8	15	44
5	+++	1,8	5	36
6	++-	1,8	15	36
7	000	1,5	10	40
8	000	1,5	10	40
9	--+	1,2	5	44
10	---	1,2	5	36

Figura 29. Tabela de *full factorial* com as experiências a realizar para avaliar a robustez do método.

Para cada uma das experiências da Figura 29 foram analisadas no HPLC, de acordo com o método analítico, duas soluções padrão independentes para efetuar uma calibração e três soluções de fórmula reconstituída independentes.

Os resultados que se seguem nas Tabelas 58 (Prilocaína HCl) e 59 (Lidocaína HCl) foram obtidos a partir da avaliação das soluções referidas.

Tabela 58. Resultados do DoE para o método de Conteúdo para a substância ativa Prilocaína HCl.

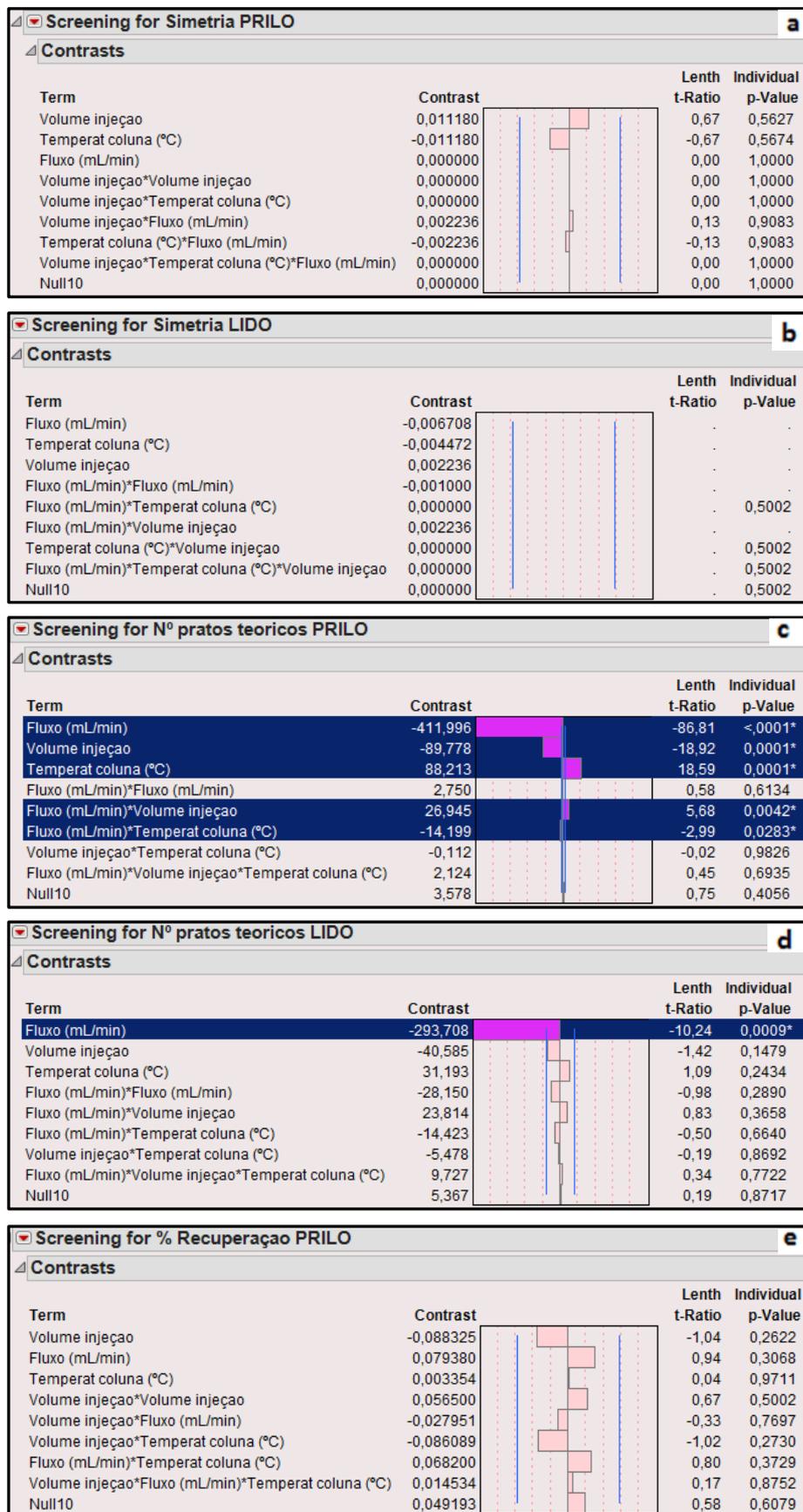
N° Experiência	Fatores			Respostas Prilocaína HCl								
	Fluxo mL/min	Volume de Injeção (μ L)	Temperatura coluna (°C)	Tempo de retenção (min)	Simetria	N° pratos teóricos	k'	% Média Recuperação (n=3)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
											Min (%)	Máx (%)
1	1,2	15	44	2,48	0,98	3286	3,96	98,17	0,21	0,21	97,65	98,69
2	1,8	5	44	1,65	0,95	2534	2,31	98,89	0,38	0,38	97,95	99,83
3	1,2	15	16	2,31	1,00	3062	3,61	98,54	0,10	0,10	98,29	98,79
4	1,8	15	44	1,66	0,98	2398	2,31	98,47	0,28	0,28	97,77	99,17
5	1,8	5	36	1,54	0,98	2373	2,08	98,57	0,26	0,26	97,92	99,22
6	1,8	15	36	1,55	1,01	2228	2,10	98,47	0,24	0,25	97,87	99,07
7	1,5	10	40	1,92	0,98	2845	2,85	98,48	0,24	0,24	97,88	99,08
8	1,5	10	40	1,92	0,98	2829	2,85	98,26	0,08	0,08	98,06	98,46
9	1,2	5	44	2,48	0,96	3552	3,95	98,53	0,37	0,37	97,61	99,45
10	1,2	5	36	2,30	0,98	3318	3,60	98,45	0,09	0,09	98,23	98,67

Tabela 59. Resultados do DoE para o método de Conteúdo para a substância ativa Lidocaína HCl.

N° Experiência	Fatores			Respostas Lidocaína HCl								
	Fluxo mL/min	Volume de Injeção (μ L)	Temperatura coluna (°C)	Tempo de retenção (min)	Simetria	N° pratos teóricos	k'	% Média Recuperação (n=3)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
											Máx (%)	Min (%)
1	1,2	15	44	5,63	0,90	3737	10,27	99,11	0,25	0,25	98,49	99,73
2	1,8	5	44	3,76	0,88	3151	6,52	100,22	0,36	0,36	99,33	101,11
3	1,2	15	16	5,45	0,91	3669	9,91	99,77	0,23	0,23	99,20	100,34
4	1,8	15	44	3,76	0,89	3123	6,52	99,81	0,21	0,22	99,29	100,33
5	1,8	5	36	3,65	0,89	3123	6,30	99,78	0,44	0,44	98,69	100,87
6	1,8	15	36	3,13	0,90	3076	6,31	99,75	0,36	0,36	98,86	100,64
7	1,5	10	40	4,45	0,90	3529	7,90	99,98	0,18	0,18	99,53	100,43
8	1,5	10	40	4,45	0,90	3505	7,90	99,67	0,23	0,23	99,10	100,24
9	1,2	5	44	5,61	0,90	3915	10,21	99,67	0,47	0,47	98,50	100,84
10	1,2	5	36	5,45	0,91	3779	9,90	100,02	0,20	0,20	99,52	100,52

Nota: Nas Tabelas 58 e 59, os tempos de retenção e os valores de k' para ambas as substâncias ativas são meramente indicativos, estes não foram avaliados estatisticamente.

Com base nos resultados obtidos (Tabelas 58 e 59) para cada experiência foi avaliada a forma como os fatores em estudo afetavam as respostas através do screening para cada resposta como se pode ver na Figura 30.



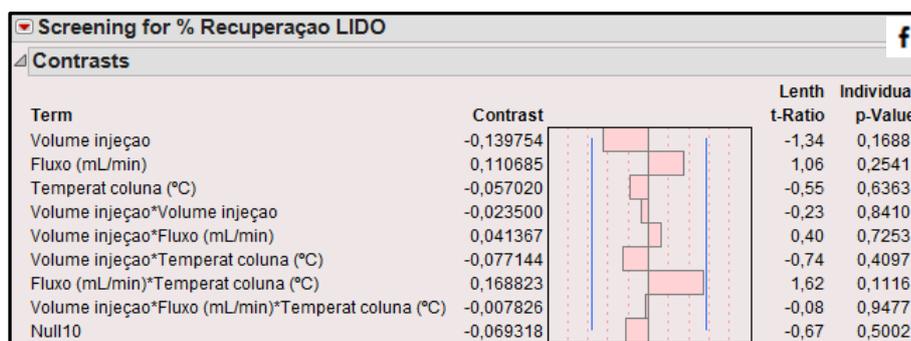


Figura 30. Influência dos fatores fluxo de trabalho, volume de injeção e temperatura da coluna nas respostas para avaliação da robustez (a – *Screening* para a simetria da Prilocaína HCl; b – *Screening* para a simetria da Lidocaína HCl; c – *Screening* para o número de pratos teóricos da Prilocaína HCl; d – *Screening* para o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl; e – *Screening* para a % de recuperação da Prilocaína HCl; f – *Screening* para a % de recuperação da Lidocaína HCl).

A partir do Figura 30 e com base nos mesmos critérios (barras e *p-value*) usados no Capítulo IV, verificou-se que os fatores em estudo influenciam apenas o número de pratos teóricos para ambas as substâncias ativas. Isto é o número de pratos teóricos da Prilocaína HCl (Figura 30 c) é afetado pelos fatores fluxo, volume de injeção, temperatura da coluna e respectivas interações do *fluxo x volume de injeção* e *fluxo x temperatura da coluna* enquanto o número de pratos teóricos da Lidocaína HCl (Figura 30 d) só é afetada pelo fluxo. Através dos valores da coluna *Contrast* verificou-se que o aumento do fluxo induz a diminuição do número de pratos teóricos para ambas as substâncias ativas, o aumento do volume de injeção induz a diminuição do número de pratos teóricos para a Prilocaína HCl enquanto o aumento da temperatura da coluna aumenta esta resposta.

De seguida (ver Tabela 60), foi feita a análise estatística para as respostas influenciadas pelos fatores em estudo, onde se avaliaram os valores de R^2 , R^2 ajustado e os valores de *p-value*.

Tabela 60. Avaliação estatística da influência dos fatores nas respostas para avaliar a robustez do método.

Análise estatística Respostas	R²	R² ajustado	Analysis of Variance Prob>F (p-value <0,05)
Nº pratos teóricos Prilocaína HCl	0,999867	0,9997	<0,0001
Nº pratos teóricos Lidocaína HCl	0,952088	0,946099	<0,0001

Os valores de R^2 e R^2 ajustado são semelhantes entre si e próximos de 1, e os valores de *p-value* obtidos pela ANOVA são $<0,05$ (Tabela 60), assim pode afirmar-se que obtivemos um bom modelo.

De acordo com o modelo obtido foram calculados os valores previstos para cada uma das respostas influenciadas pelos fatores. Na Tabela 61 estão representados os valores obtidos experimentalmente para se comparar com os resultados previstos dados pelo modelo matemático.

Tabela 61. Resultados obtidos versus resultados previstos para avaliar a robustez do método (método conteúdo).

N° da experiência	Resultados Obtidos		Resultados Previstos	
	N° pratos teóricos Prilocaína HCl	N° pratos teóricos Lidocaína HCl	N° pratos teóricos Prilocaína HCl	N° pratos teóricos Lidocaína HCl
1	3286	3737	3287	3789
2	2534	3151	2535	3132
3	3062	3669	3058	3789
4	2398	3123	2394	3132
5	2373	3123	2369	3132
6	2228	3076	2229	3132
7	2845	3529	2843	3461
8	2829	3505	2843	3461
9	3552	3915	3548	3789
10	3318	3779	3319	3789

Como se pode ver na Tabela 61 os resultados obtidos através das dez experiências realizadas são semelhantes aos resultados previstos, confirmando-se assim que estamos na presença de um bom modelo.

De seguida, através dos valores previstos referidos na Tabela 61 foram representados os gráficos de perfil (Figura 31) e os gráficos de contorno (Figuras 32, 33 e 34).

Segundo o modelo matemático obtido, a Figura 31 representa os perfis de como os fatores fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna (eixo dos x) influenciam as respostas, número de pratos teóricos de ambas as substâncias ativas (eixo dos y). Os valores que se encontram no eixo dos x para os fatores são os valores dados pelo *software* para que se consigam alcançar os critérios de avaliação descritos na Tabela 5 do Capítulo II. Assim,

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
 Capítulo V
 determinando as condições desejadas maximizadas (“*Maximize Desirabilities*”), verificou-se
 valor desejado (*Desirability*) é 1 (valor ideal).

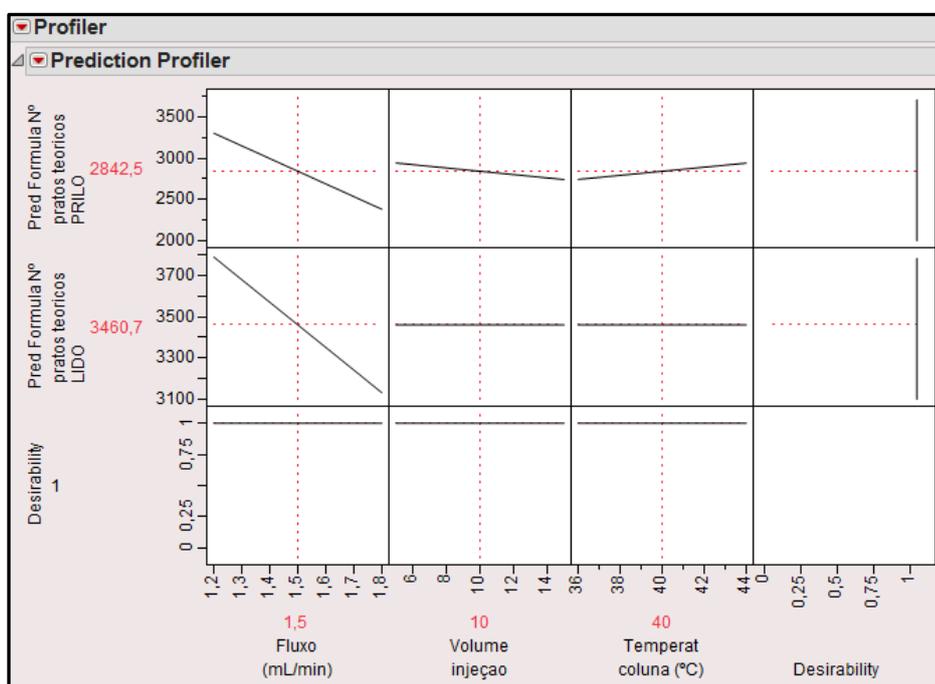


Figura 31. Perfil da influência dos fatores nas respostas com *Maximize Desirabilities* para avaliar a robustez do método.

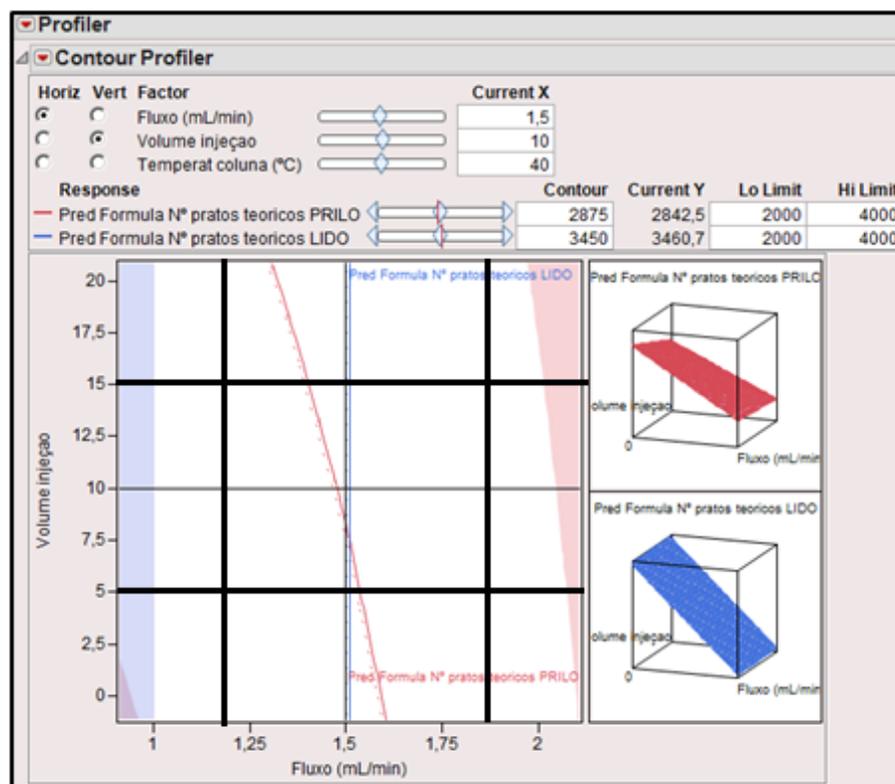


Figura 32. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Fluxo versus Volume de injeção (Robustez do método conteúdo).

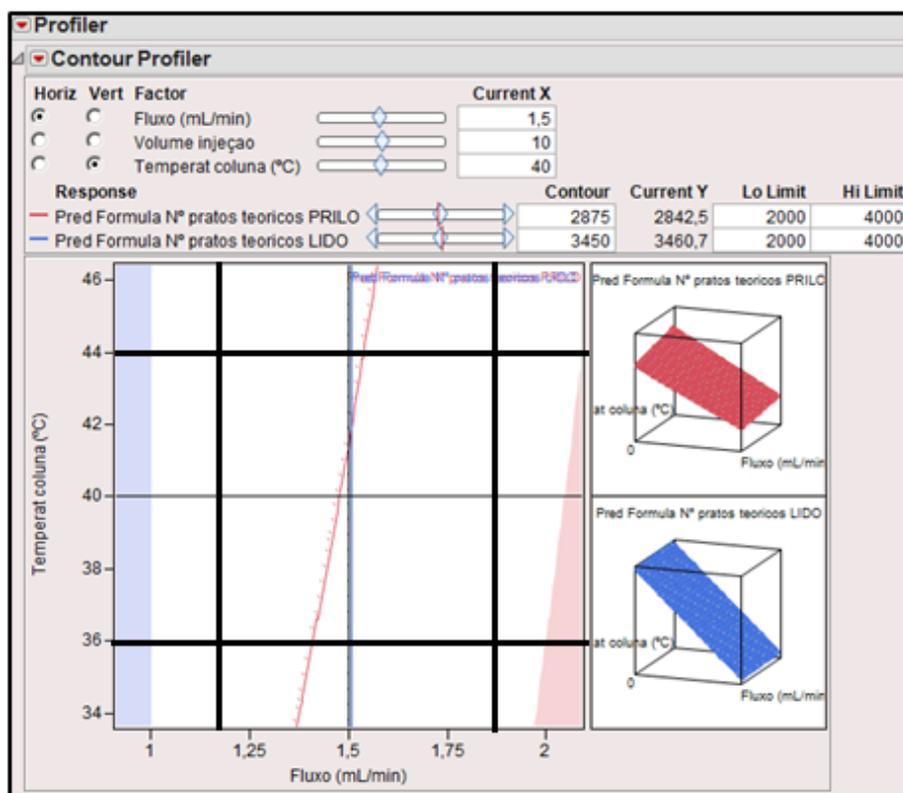


Figura 33. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Fluxo versus Temperatura da coluna (Robustez do método conteúdo).

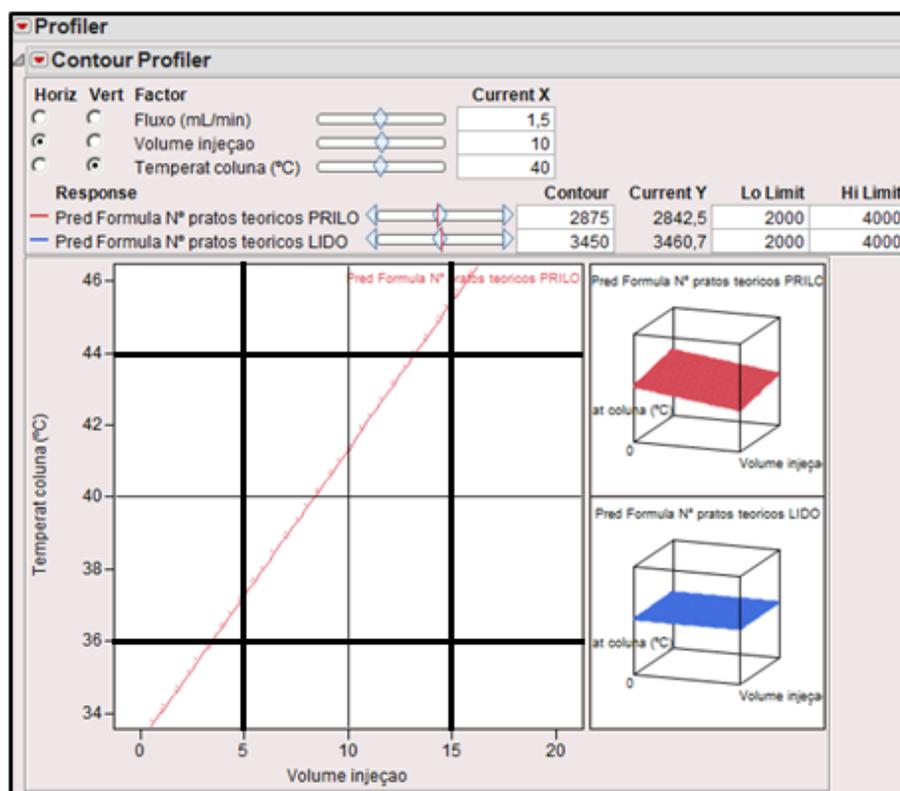


Figura 34. Gráfico de contorno para as respostas com base nos fatores Volume de injeção versus Temperatura (Robustez do método conteúdo).

Com base nas Figuras 32, 33 e 34, verifica-se que estamos na zona de trabalho para todas as experiências realizadas (zona a branco delimitada pelas linhas a preto que representam as condições extremas testadas).

A partir dos resultados obtidos e das percentagens de recuperação para ambas as substâncias ativas (todos os valores estão entre 97% e 103%), pode afirmar-se que o método é robusto para as alterações estudadas, isto é as variações testadas não originam resultados fora dos limites estipulados.

2 Validação do método analítico para determinação do perfil de impurezas da prilocaína e lidocaína

Para o método de impurezas a solução amostra para as duas substâncias ativas (na forma de HCl) tem uma concentração de 0,2 mg/mL. Esta solução consiste na solução *stock* da solução amostra para o método de conteúdo, visto que a amostra de conteúdo de $C=0,04$ mg/mL era muito diluída e por isso não se conseguiam quantificar as impurezas.

Os limites de aceitação para os parâmetros de validação estão descritos na Tabela 6 do Capítulo II e seguiu-se o mesmo princípio referido na validação do método de conteúdo para número de amostras ou injeções necessárias à validação do método em questão.

2.1 Testes de filtração

Para efetuar o teste de filtração no método de impurezas, seguiu-se o mesmo princípio que o referido na validação do método de conteúdo, contudo a solução a analisar consistiu numa solução padrão com as duas substâncias ativas a uma concentração de $C=0,002$ mg/mL contendo as impurezas a metade do nível de especificação.

A avaliação foi feita da mesma forma que a reportada no método de conteúdo, mas para além das substâncias ativas é necessário avaliar as impurezas (cálculo através da Equação 20). Testaram-se filtros de membrana Nylon 0,2 μm e PVDF Millipore 0,22 μm , visto que estes têm o poro de membrana mais pequeno e um dos filtros de membrana 0,45 μm testado no método de conteúdo. O filtro de membrana 0,45 μm escolhido foi o de GHP Pall por motivos económicos de entre os três filtros com este poro de membrana.

Os resultados para os testes de filtração encontram-se nas Tabelas 62 e 63 (Prilocaína HCl e Lidocaína HCl, respetivamente) e para as impurezas (Tabelas 64, 65, 66 e 67). A Tabela 68 apresenta em forma de resumo os resultados obtidos.

Tabela 62. Resultados dos testes de filtração para a Prilocaína HCl (método impurezas).

Solução Padrão ($C_{Real}=2,002E-03$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	11,344	88646	4,428E+07	11,375	87421	4,367E+07	11,359	87042	4,348E+07	11,462	87161	4,354E+07
Injeção #2	11,337	88712	4,431E+07	11,364	87670	4,379E+07	11,359	88726	4,432E+07	11,472	86626	4,327E+07
Injeção #3	11,330	88072	4,399E+07	11,365	85713	4,281E+07	11,379	86603	4,326E+07	11,477	88418	4,416E+07
Média		88477	4,419E+07		86935	4,342E+07		87457	4,368E+07		87402	4,366E+07
RSD (%)		0,40			1,23			1,28			1,05	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						1,76				1,16		1,21
<i>p-value</i>						0,076				0,207		0,132

Tabela 63. Resultados dos testes de filtração para a Lidocaína HCl (método impurezas).

Solução Padrão ($C_{Real}=2,008E-03$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	25,305	41964	2,090E+07	25,343	40596	2,022E+07	25,315	39594	1,972E+07	25,419	40147	1,999E+07
Injeção #2	25,298	41218	2,053E+07	25,328	42121	2,098E+07	25,333	41382	2,061E+07	25,438	41484	2,066E+07
Injeção #3	25,298	41566	2,070E+07	25,329	40638	2,024E+07	25,350	38856	1,935E+07	25,438	40013	1,993E+07
Média		41583	2,071E+07		41118	2,048E+07		39944	1,989E+07		40548	2,019E+07
RSD (%)		0,90			2,11			3,25			2,01	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						1,12				4,04		2,54
<i>p-value</i>						0,443				0,104		0,116

Tabela 64. Resultados dos testes de filtração para a impureza o-toluidina (método impurezas).

Impureza a 1,0% ($C_{Real}=2,0037E-03$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	4,103	364197	1,818E+08	4,104	361336	1,803E+08	4,099	362255	1,808E+08	4,096	360771	1,801E+08
Injeção #2	4,103	363989	1,817E+08	4,099	362849	1,811E+08	4,094	363234	1,813E+08	4,099	360987	1,802E+08
Injeção #3	4,103	364881	1,821E+08	4,100	361778	1,806E+08	4,099	361237	1,803E+08	4,101	360777	1,801E+08
Média		364356	1,819E+08		361988	1,807E+08		362242	1,808E+08		360845	1,801E+08
RSD (%)		0,13			0,21			0,28			0,03	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						0,66				0,61		0,99
<i>p-value</i>						0,011				0,029		0,000

Tabela 65. Resultados dos testes de filtração para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina (método impurezas).

Impureza a 0,05% ($C_{Real}=1,0236E-04$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	5,918	4512	4,408E+07	5,926	4976	4,861E+07	5,914	5182	5,062E+07	5,913	5343	5,220E+07
Injeção #2	5,918	5509	5,382E+07	5,917	5185	5,065E+07	5,909	5166	5,047E+07	5,919	4593	4,487E+07
Injeção #3	5,920	4509	4,405E+07	5,918	5242	5,121E+07	5,914	5447	5,321E+07	5,923	5360	5,236E+07
Média		4843	4,732E+07		5134	5,016E+07		5265	5,144E+07		5099	4,981E+07
RSD (%)		11,90			2,73			3,00			8,59	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						-5,83				-8,34		-5,13
<i>p-value</i>						0,443				0,289		0,574

Tabela 66. Resultados dos testes de filtração para a impureza dimetilnilina (método impurezas).

Impureza a 0,05% ($C_{Real}=9,8901E-05$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,4 5 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	7,407	23402	2,366E+08	7,411	21644	2,188E+08	7,394	22261	2,251E+08	7,390	21398	2,164E+08
Injeção #2	7,405	20726	2,096E+08	7,399	21453	2,169E+08	7,388	22152	2,240E+08	7,393	21106	2,134E+08
Injeção #3	7,404	21185	2,142E+08	7,400	22108	2,235E+08	7,392	21635	2,188E+08	7,396	22687	2,294E+08
Média		21771	2,201E+08		21735	2,198E+08		22016	2,226E+08		21730	2,197E+08
RSD (%)		6,57			1,55			1,52			3,87	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						0,14						0,18
<i>p-value</i>						0,968						0,968

Tabela 67. Resultados dos testes de filtração para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina (método impurezas).

Impureza a 0,05% ($C_{Real}=1,0100E-04$ mg/mL)	Não Filtrado			Filtrado com Nylon VWR 0,2 μ m			Filtrado com PVDF Millipore 0,22 μ m			Filtrado com GHP Pall 0,45 μ m		
	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF	TR (min)	Áreas	RF
Injeção #1	12,886	13705	1,357E+08	12,929	13232	1,310E+08	12,913	12391	1,227E+08	13,034	12807	1,268E+08
Injeção #2	12,884	13511	1,338E+08	12,913	12134	1,201E+08	12,916	12564	1,244E+08	13,053	12343	1,222E+08
Injeção #3	12,878	13334	1,320E+08	12,918	12949	1,282E+08	12,937	13326	1,319E+08	13,057	13154	1,302E+08
Média		13517	1,338E+08		12772	1,265E+08		12760	1,263E+08		12768	1,264E+08
RSD (%)		1,37			4,46			3,90			3,19	
Desvio (%) relativo ao não filtrado						5,61						5,69
<i>p-value</i>						0,098						0,044

Tabela 68. Resumo com a avaliação dos resultados dos testes de filtração para as duas substâncias ativas e impurezas (método impurezas).

Substâncias ativas / Impurezas	Limites		Nylon VWR 0,2 µm	PVDF Millipore 0,22 µm	GHP Pall 0,45 µm
	% Desvio	≤ 10%			
Prilocaina HCl	% Desvio	≤ 10%	1,76%	1,16%	1,21%
	<i>p-value</i>	≥ 0,05	0,076	0,207	0,132
Lidocaína HCl	% Desvio	≤ 10%	1,12%	4,04%	2,54%
	<i>p-value</i>	≥ 0,05	0,443	0,104	0,116
o-toluidina	% Desvio	≤ 10%	0,66%	0,61%	0,99%
	<i>p-value</i>	≥ 0,05	0,011	0,029	0,000
N-cloroacetil-2,6-xilidina	% Desvio	≤ 10%	-5,83%	-8,34%	-5,13%
	<i>p-value</i>	≥ 0,05	0,443	0,289	0,574
dimetilanilina	% Desvio	≤ 10%	0,14%	-1,13%	0,18%
	<i>p-value</i>	≥ 0,05	0,968	0,787	0,968
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina	% Desvio	≤ 10%	5,61%	5,77%	5,69%
	<i>p-value</i>	≥ 0,05	0,098	0,069	0,044

Em termos cromatográficos, verificou-se que não houve introdução de picos estranhos no branco (solvente) nem na solução padrão e os tempos de retenção mantiveram-se praticamente sem alterações (Tabelas 62 - 67).

Como se pode ver na Tabela 68, de um modo geral o filtro Nylon VWR 0,2 µm foi o que apresentou melhores resultados, por isso foi este o filtro escolhido.

A impureza o-toluidina apresenta valores de *p-value* inferiores a 0,05 em todos os filtros, contudo este valor não serve de fator de exclusão de nenhum filtro.

2.2 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da análise (dupla injeção) das soluções, segundo o método analítico, pela seguinte ordem:

- Branco (solvente – fase móvel);
- Solução padrão com as duas substâncias ativas (C=0,002 mg/mL);
- Soluções de impurezas ao nível de especificação;

- Solução de substâncias ativas + impurezas ao nível da especificação;
- Solução placebo (excipientes) após filtração;
- Solução de fórmula reconstituída + impurezas ao nível da especificação após filtração após filtração.

Os resultados obtidos em termos de parâmetros de conformidade encontram-se na Tabela 69.

Tabela 69. Avaliação dos parâmetros de conformidade para solução de fórmula reconstituída com impurezas.

Substâncias ativas / Impurezas	Parâmetros (avaliação da inj. #1 da solução de fórmula reconstituída com impurezas)				
	Tempo de retenção (min)	Áreas	Simetria	Nº Pratos Teóricos	k'
Prilocaina HCl (C _{Real} =2,03E-01 mg/mL)	11,429	8817821	0,85	8605	13,29
Lidocaína HCl (C _{Real} =1,89E-01 mg/mL)	25,392	4159394	0,89	21043	30,74
o-toluidina (C _{Real} =4,01E-03 mg/mL)	4,128	722908	0,89	5954	4,16
N-cloroacetil-2,6-xilidina (C _{Real} =2,05E-04 mg/mL)	5,950	8997	0,85	6190	6,44
Dimetilanilina (C _{Real} =1,98E-04 mg/mL)	7,442	38070	0,81	6204	8,30
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina (C _{Real} =2,02E-04 mg/mL)	13,025	14568	1,06	9361	15,28

Em relação aos parâmetros de conformidade verificou-se que a simetria está um pouco afastada do valor ideal (valor de 1) com exceção da última impureza, mas o número de pratos teóricos são superiores a 2000, os valores de k' são superiores a 2 e a resolução da impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina em relação à substância ativa Prilocaina HCl obtida foi de 3,05. Da análise dos cromatogramas, (Consultar Anexos – Cromatograma 17) verificou-se que não havia interferências da fase móvel. No Cromatograma 18 (Consultar Anexos) verificou-se que os picos das substâncias ativas na solução padrão distinguem-se perfeitamente e no Cromatograma 19 (Consultar Anexos) que a mistura de excipientes apresenta um pico inicial grande que é do solvente de extração e alguns picos pequenos (ao longo dos cromatogramas) que correspondem a componentes da matriz da formulação.

No Cromatograma 20 (Consultar Anexos), verificou-se que as impurezas não interferem com os picos das substâncias ativas (Prilocaina HCl e Lidocaína HCl). Os cromatogramas mostram que não há picos de solvente ou placebo no mesmo tempo de retenção que as substâncias ativas e que as impurezas. Assim, pode afirmar-se que o método é específico para a análise de impurezas na formulação em questão.

2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados para cada uma das substâncias ativas e para cada impureza através do método razão sinal/ruído descrito no ponto 4.2.6 do Capítulo I.

Para determinar este parâmetro injetaram-se várias soluções de diferentes concentrações de substâncias ativas e de impurezas.

Os níveis de concentração e as respetivas razões sinal/ruído encontram-se na Tabela 70.

Tabela 70. Limite de detecção e limite de quantificação calculados através da razão sinal/ruído (S/R) retirados do cromatograma 21 (Consultar Anexos).

Substâncias ativas / Impurezas	Limite de Detecção (LD)		Limite de Quantificação (LQ) (Consultar Anexos – Cromatograma 21)	
	S/R	Nível de Concentração (%)	S/R	Nível de Concentração (%)
Prilocaina HCl	5	0,045	15	0,09
Lidocaína HCl	3	0,045	7	0,09
o-toluidina	5	3,91E-03	16	0,016
N-cloroacetil-2,6- xilidina	3	0,025	17	0,05
Dimetilnilina	7	0,0125	15	0,019
2-dietilaminoaceto- 2,4-xilidina	5	0,019	10	0,025

Como se pode verificar na Tabela 70 tanto para as substâncias ativas como para as impurezas os níveis de concentração (em %) do LD são menores que os de LQ e as razões sinal/ruído foram cumpridos, com exceção do limite de quantificação para a Lidocaína HCl que a razão sinal/ruído foi de 7. Contudo, visto que irá ser determinada a recuperação ao nível do limite de quantificação, só se não se conseguir a recuperação desejada desta substância ativa é que se estudará o nível de concentração a seguir.

O limite de quantificação tem de ser menor ou igual que o *reporting threshold*, no caso desta formulação o *reporting threshold* é de 0,1% (Tabela 3) visto que a quantidade máxima de dose diária é de 500 mg [27], logo cumpre-se este requisito.

- Resultados de recuperação e precisão no limite de quantificação:

O limite de quantificação depois de determinado foi confirmado. Este foi confirmado a partir do teste de recuperação de acordo com o método analítico. Para tal, prepararam-se duas soluções independentes de padrão para efetuar uma calibração e três soluções de

Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica
 Capítulo V
 fórmula reconstituída independentes com as substâncias ativas e as impurezas no limite de
 quantificação de acordo com as concentrações referidas na Tabela 70 (amostras analisadas
 com injeção simples após filtração). As % de recuperação foram calculadas a partir da
 equação 15 e os resultados encontram-se nas seguintes Tabelas 71 e 72.

Tabela 71. Recuperação e precisão para as duas substâncias ativas no limite de quantificação.

Substâncias ativas		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
Prilocaina HCl a 0,09%	#1	1,81531 E-04	8679	1,94984 E-04	107,41	105,86	3,19	3,01	97,94	113,78
	#2	1,82166 E-04	8755	1,96691 E-04	107,97					
	#3	1,81531 E-04	8257	1,85503 E-04	102,19					
Lidocaína HCl a 0,09%	#1	1,83701 E-04	4263	1,98847 E-04	108,24	107,52	1,36	1,27	104,14	110,90
	#2	1,83650 E-04	4172	1,94579 E-04	105,95					
	#3	1,83701 E-04	4268	1,99080 E-04	108,37					

Tabela 72. Recuperação e precisão para as impurezas no limite de quantificação.

Impurezas		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
o-toluidina a 0,016%	#1	3,20589 E-05	6699	3,29299 E-05	102,72	104,27	2,46	2,36	98,16	110,38
	#2	3,11734 E-05	6792	3,33870 E-05	107,10					
	#3	3,20589 E-05	6716	3,30159 E-05	102,99					
N-cloroacetil- 2,6-xilidina a 0,05%	#1	1,02362 E-04	3289	1,10382 E-04	107,84	106,99	0,99	0,92	104,53	109,45
	#2	9,98890 E-05	3192	1,07110 E-04	107,23					
	#3	1,02362 E-04	3230	1,08402 E-04	105,90					
Dimetilaniina a 0,019%	#1	3,73626 E-05	5294	3,96968 E-05	106,25	106,21	0,57	0,54	104,79	107,63
	#2	3,72917 E-05	5309	3,98131 E-05	106,76					
	#3	3,73626 E-05	5262	3,94606 E-05	105,62					
2- dietilaminoacet o-2,4-xilidina a 0,025%	#1	5,05000 E-05	3899	5,39668 E-05	106,86	103,21	3,18	3,09	95,31	111,11
	#2	5,10000 E-05	3723	5,15238 E-05	101,03					
	#3	5,05000 E-05	3712	5,13785 E-05	101,74					

A partir dos resultados obtidos (Tabelas 71 e 72) conclui-se as substâncias ativas e impurezas podem ser quantificados com precisão nos limites de quantificação definidos.

2.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da curva de calibração para as duas substâncias ativas e para as impurezas pela análise de cinco soluções padrão.

No método de impurezas a gama de concentrações é estudada desde o limite de quantificação de cada substância ativa e cada impureza (Tabela 70 - níveis de concentração de LQ) a 120% da especificação da impureza mais alta.

Neste caso concreto, a impureza que tem a especificação mais alta é a o-toluidina que é de 2,0% (nível de especificação que corresponde ao 100%).

As soluções preparadas foram analisadas com injeção dupla de acordo com o método analítico definido. Para cada uma das substâncias ativas e impurezas foram calculados os fatores de resposta como se pode ver nas tabelas que se seguem (Tabelas 73, 75, 77, 79, 81, 83). Para cada uma das substâncias ativas e impurezas foram calculados os parâmetros de regressão linear: a % de desvio à ordenada na origem em relação à concentração de 100%, o coeficiente de correlação (r), o declive e a soma dos quadrados dos resíduos (Tabelas 74, 76, 78, 80, 82, 84).

Tabela 73. Resultados da linearidade para a substância ativa Prilocaina HCl (método de impurezas).

Prilocaina HCl					
Nível de Concentração (%)/(mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
0,09% (C=0,00018 mg/mL)	1,768E-04	9603	9794	9699	5,486E+07
0,8% (C=0,0016 mg/mL)	1,607E-03	71727	71948	71838	4,470E+07
1,5% (C=0,003 mg/mL)	3,054E-03	140442	140213	140328	4,595E+07
2,0% (C=0,004 mg/mL)	4,018E-03	179615	179057	179336	4,463E+07
2,4% (C=0,0048mg/mL)	4,821E-03	281142	281786	281464	5,838E+07

Gráfico 3. Curva de linearidade Prilocaina HCl (método de impurezas).

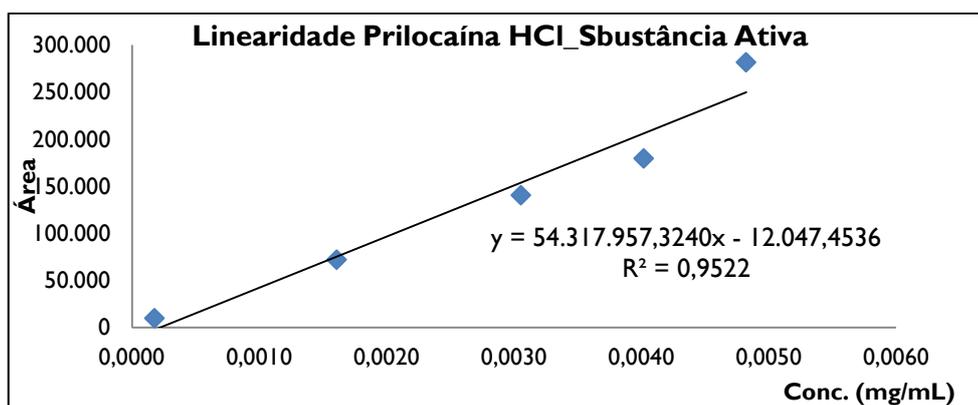


Tabela 74. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Prilocaína HCl (método de impurezas).

Parâmetros	Prilocaína HCl (Substância ativa)	Limites
% Desvio à ordenada na origem em relação ao 2,0% (C=0,004 mg/mL)	-6,72%	≤±10%
Coefficiente de correlação (r)	0,98	≥ 0,99
Declive	54317957	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	4,11E+10	

Na Tabela 73, encontram-se as áreas obtidas nos cromatogramas e os cálculos dos fatores de resposta para a Prilocaína HCl. O Gráfico 3 representa a curva de linearidade desta substância ativa com base na equação $y = mx + b$, tal como na validação do método do conteúdo. Como se pode verificar na Tabela 74, os limites de aceitação em relação à % de desvio à ordenada na origem foi cumprido, mas o coeficiente de correlação não foi cumprido, visto que é de 0,98 e devia ser ≥0,99. Contudo, este valor não põe em causa a linearidade do método para esta substância ativa pois o valor é muito próximo de 0,99.

Tabela 75. Resultados da linearidade para a substância ativa Lidocaína HCl (método de impurezas).

Lidocaína HCl					
Nível de Concentração (%)/(mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
0,09% (C=0,00018 mg/mL)	1,818E-04	3765	3939	3852	2,119E+07
0,8% (C=0,0016 mg/mL)	1,585E-03	37694	37994	37844	2,388E+07
1,5% (C=0,003 mg/mL)	3,029E-03	67730	66001	66866	2,207E+07
2,0% (C=0,004 mg/mL)	4,075E-03	96020	97265	96643	2,371E+07
2,4% (C=0,0048mg/mL)	4,875E-03	136663	136775	136719	2,804E+07

Gráfico 4. Curva de linearidade Lidocaína HCl (método de impurezas).

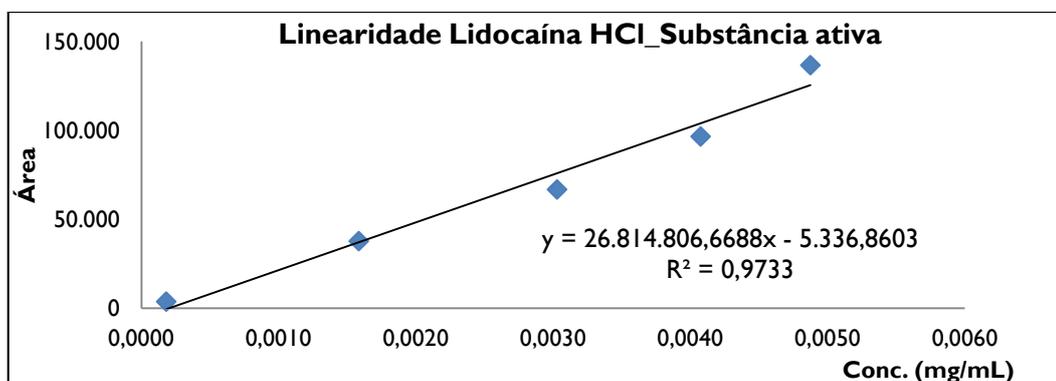


Tabela 76. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para Lidocaína HCl (método de impurezas).

Parâmetros	Lidocaína HCl (Substância ativa)	Limites
% Desvio à ordenada na origem em relação ao 2,0% (C=0,004 mg/mL)	-5,52%	≤±10%
Coefficiente de correlação (r)	0,99	≥ 0,99
Declive	26814806	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	1,03E+10	

Na Tabela 75, encontram-se as áreas obtidas nos cromatogramas e os cálculos dos fatores de resposta para a Lidocaína HCl.

O Gráfico 4 representa a curva de linearidade da Lidocaína HCl com base na equação $y = mx + b$.

Como se pode verificar na Tabela 76, os limites de aceitação recomendados foram cumpridos.

Tabela 77. Resultados da linearidade para a impureza o-toluidina.

Impureza o-toluidina					
Nível de Concentração (%)/(mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
0,016% (C=0,000032mg/mL)	3,198E-05	10809	11201	11005	3,442E+08
0,8% (C=0,0016 mg/mL)	1,559E-03	542451	542006	542229	3,479E+08
1,5% (C=0,003 mg/mL)	3,072E-03	743454	741751	742603	2,417E+08
2,0% (C=0,004 mg/mL)	4,077E-03	883124	883081	883103	2,166E+08
2,4% (C=0,0048mg/mL)	4,809E-03	1066041	1069216	1067629	2,220E+08

Gráfico 5. Curva de linearidade da impureza o-toluidina.

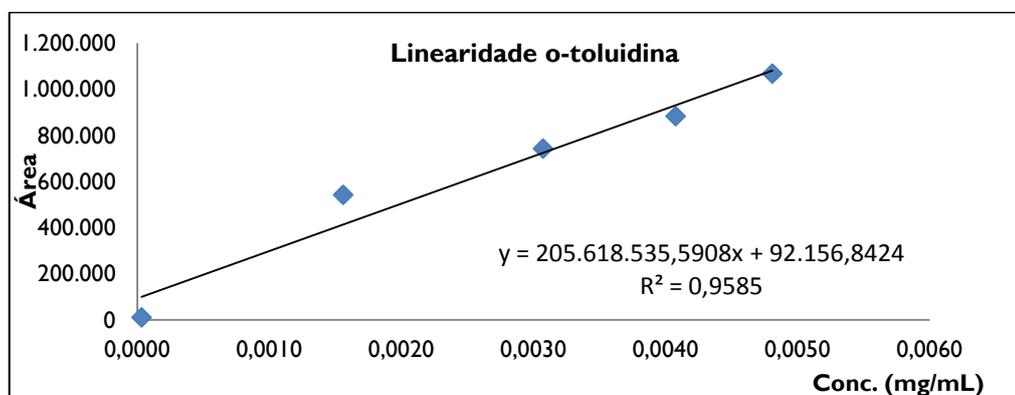


Tabela 78. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza o-toluidina.

Parâmetros	Impureza o-toluidina	Limites
% Desvio à ordenada na origem em relação ao 2,0% (C=0,004 mg/mL)	10,44%	≤±10%
Coefficiente de correlação (r)	0,98	≥ 0,99
Declive	205618536	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	6,30E+11	

Na Tabela 77, encontram-se as áreas obtidas nos cromatogramas e os cálculos dos fatores de resposta para a impureza o-toluidina. O Gráfico 5 representa a curva de linearidade da impureza com base na equação $y = mx + b$. Como se pode verificar na Tabela 78, a % de desvio à ordenada na origem foi cumprida, apesar de estar no limite, mas o coeficiente de correlação não foi cumprido, visto que é de 0,98 e devia ser ≥0,99. Contudo, este valor não põe em causa a linearidade do método para esta impureza pois o valor é muito próximo de 0,99.

Tabela 79. Resultados da linearidade para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.

Impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina					
Nível de Concentração (%) / (mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
0,05% (C=0,0001 mg/mL)	1,024E-04	4939	4821	4880	4,767E+07
0,8% (C=0,0016 mg/mL)	1,598E-03	53641	53585	53613	3,355E+07
1,5% (C=0,003 mg/mL)	3,009E-03	103996	103515	103756	3,448E+07
2,0% (C=0,004 mg/mL)	3,996E-03	130212	130094	130153	3,257E+07
2,4% (C=0,0048 mg/mL)	4,811E-03	171242	171578	171410	3,563E+07

Gráfico 6. Curva de linearidade da impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.

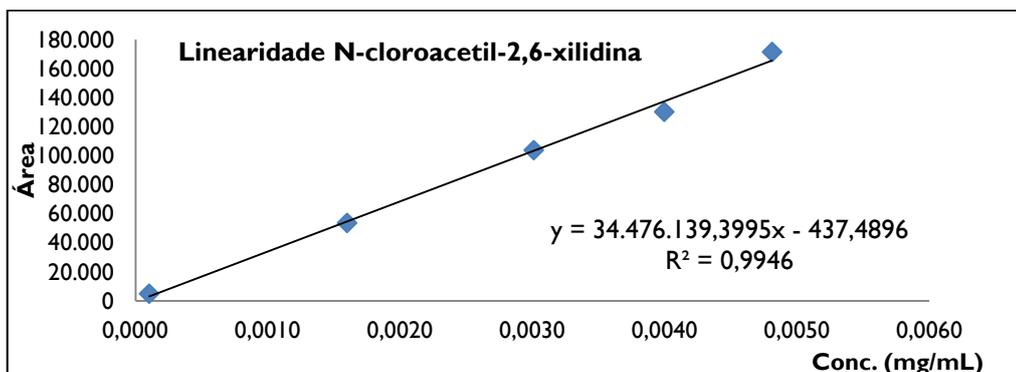


Tabela 80. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.

Parâmetros	Impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina	Limites
% Desvio à ordenada na origem em relação ao 2,0% (C=0,004 mg/mL)	-0,34%	≤±10%
Coefficiente de correlação (r)	1,00	≥ 0,99
Declive	34476139	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	1,69E+10	

Na Tabela 79, encontram-se as áreas obtidas nos cromatogramas e os cálculos dos fatores de resposta para a impureza em questão. O Gráfico 6 representa a curva de linearidade da impureza com base na equação $y = mx + b$. Como se pode verificar na Tabela 80, os limites de aceitação foram cumpridos.

Tabela 81. Resultados da linearidade para a impureza dimetilanilina.

Impureza Dimetilanilina					
Nível de Concentração (%) / (mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
0,019% (C=0,000038 mg/mL)	3,736E-05	6760	6012	6386	1,709E+08
0,8% (C=0,0016 mg/mL)	1,621E-03	247369	243518	245444	1,514E+08
1,5% (C=0,003 mg/mL)	3,022E-03	475851	476465	476158	1,576E+08
2,0% (C=0,004 mg/mL)	4,026E-03	616207	616992	616600	1,531E+08
2,4% (C=0,0048mg/mL)	4,808E-03	708601	712695	710648	1,478E+08

Gráfico 7. Curva de linearidade da impureza dimetilanilina.

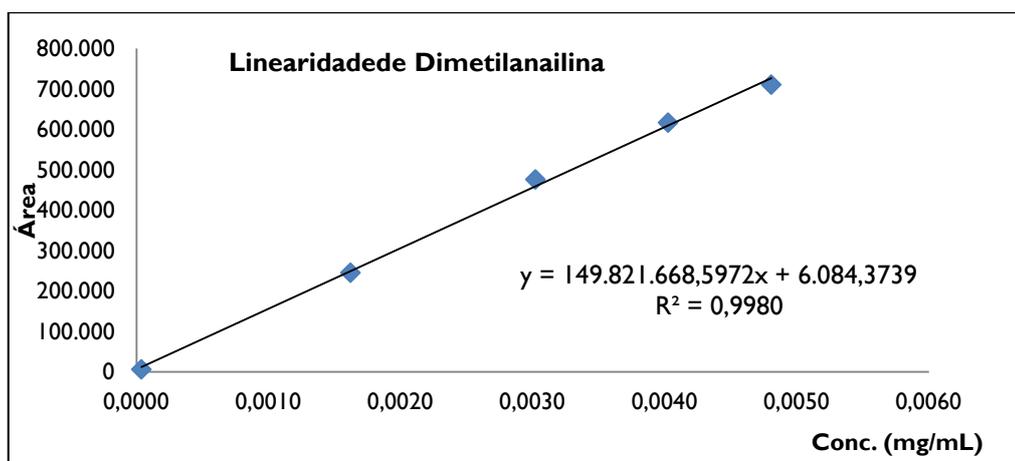


Tabela 82. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza dimetilanilina.

Parâmetros	Impureza Dimetilanilina	Limites
% Desvio à ordenada na origem em relação ao 2,0% (C=0,004 mg/mL)	0,99%	≤±10%
Coefficiente de correlação (r)	1,00	≥ 0,99
Declive	149821669	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	3,27E+11	

Na Tabela 81, encontram-se as áreas obtidas nos cromatogramas e os cálculos dos fatores de resposta para a impureza dimetilanilina.

O Gráfico 7 representa a curva de linearidade da impureza com base na equação $y = mx + b$.

Como se pode verificar na Tabela 82, os limites de aceitação foram cumpridos.

Tabela 83. Resultados da Linearidade para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.

Impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina					
Nível de Concentração (%) / (mg/mL)	Conc. Real (mg/mL)	Áreas			RF
		Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)	
0,025% (C=0,00005 mg/mL)	5,050E-05	3688	3662	3675	7,277E+07
0,8% (C=0,0016 mg/mL)	1,607E-03	137628	135834	136731	8,511E+07
1,5% (C=0,003 mg/mL)	3,030E-03	246135	246657	246396	8,132E+07
2,0% (C=0,004 mg/mL)	4,029E-03	338214	337274	337744	8,383E+07
2,4% (C=0,0048mg/mL)	4,798E-03	402920	399297	401109	8,361E+07

Gráfico 8. Curva de linearidade da impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.

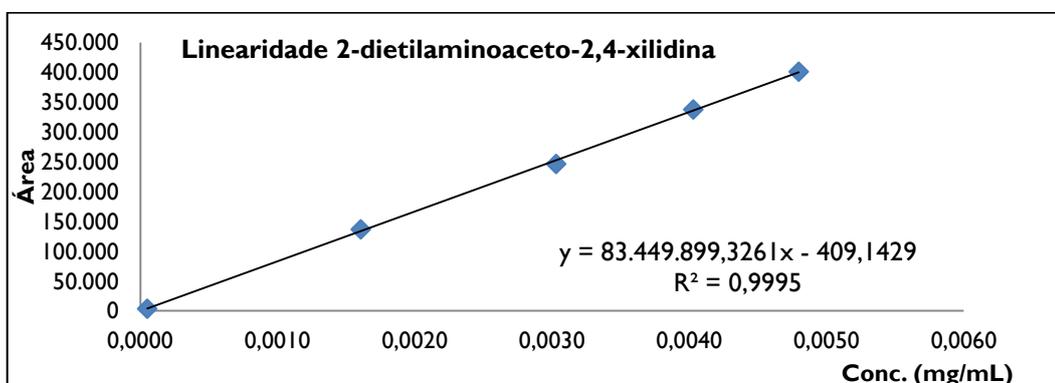


Tabela 84. Resultados e avaliação dos parâmetros da linearidade para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.

Parâmetros	Impureza 2-dietilaminoaceto-2,4- xilidina	Limites
% Desvio à ordenada na origem em relação ao 2,0% (C=0,004 mg/mL)	-0,12%	≤±10%
Coeficiente de correlação (r)	1,00	≥ 0,99
Declive	83449899	(não há valores de referência)
Soma dos quadrados dos resíduos	1,01E+11	

Na Tabela 83, encontram-se as áreas obtidas nos cromatogramas e os cálculos dos fatores de resposta para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.

O Gráfico 8 representa a curva de linearidade da impureza com base na equação $y = mx + b$.

Como se pode verificar na Tabela 84, os limites de aceitação foram cumpridos.

A partir das linearidades realizadas para as substâncias ativas e para as impurezas foram calculadas as médias dos fatores de resposta com os últimos três pontos da linearidade para que de seguida fossem calculados os fatores de resposta relativos. Foram usados apenas os últimos três pontos das linearidades porque os primeiros dois pontos destas, apresentam concentrações muito baixas e poderiam conduzir a RRF desajustados.

O cálculo do RRF de cada impureza foi feito através da seguinte equação (Equação 27):

$$\text{RRF} = \frac{\text{média RF impureza}}{\text{média RF substância ativa}} \quad (\text{Equação 27})$$

Os fatores de resposta relativos encontram-se descritos na Tabela 85.

Tabela 85. Determinação dos fatores de respostas de relativos (RRF).

Substâncias ativas / Impurezas	Média RF (dos três últimos pontos da linearidade)	RRF
Prilocáina HCl	4,97E+07	-
Lidocaína HCl	2,46E+07	-
o-toluidina	2,27E+08	4,57 (em relação à Prilocáina HCl)
N-cloroacetil-2,6-xilidina	3,42E+07	1,39 (em relação à Lidocaína HCl)
Dimetilanilina	1,53E+08	6,22 (em relação à Lidocaína HCl)
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina	8,29E+07	3,37 (em relação à Lidocaína HCl)

2.5 Precisão do sistema

Para avaliar a precisão do sistema foram efetuadas seis injeções consecutivas de uma solução padrão e de uma solução de fórmula reconstituída.

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 86 e 87.

Tabela 86. Avaliação da precisão do sistema para a solução padrão das substâncias ativas (método de impurezas).

Injeção n°	Prilocaina HCl na solução padrão a 0,002 mg/mL			Lidocaína HCl na solução padrão a 0,002 mg/mL		
	Conc. Real (mg/mL)	Áreas	RF	Conc. Real (mg/mL)	Áreas	RF
1	2,008E-03	92710	4,617E+07	1,899E-03	41915	2,208E+07
2		89757	4,470E+07		43336	2,282E+07
3		87925	4,379E+07		43605	2,297E+07
4		89774	4,471E+07		40993	2,159E+07
5		88061	4,386E+07		40591	2,138E+07
6		86036	4,285E+07		42017	2,213E+07
Média			4,435E+07			2,216E+07
SD			1130115			637834
RSD (%)			2,55			2,88

Tabela 87. Avaliação da precisão do sistema para as impurezas (método de impurezas).

Fórmula Reconstituída + Impurezas ao nível da especificação								
Injeção n°	Áreas o-toluidina C _{Real} = 4,077E-03 mg/mL	RF	Áreas N-cloroacetil- 2,6-xilidina C _{Real} = 2,047E-04 mg/mL	RF	Áreas Dimetilammina C _{Real} = 1,978E-04 mg/mL	RF	Áreas 2- dietilaminoaceto-2,4- xilidina C _{Real} = 2,020E-04 mg/mL	RF
1	698530	1,714E+08	7933	3,875E+07	23523	1,189E+08	17752	8,788E+07
2	700059	1,717E+08	7320	3,576E+07	24497	1,238E+08	18941	9,377E+07
3	698504	1,713E+08	7830	3,825E+07	23846	1,206E+08	17850	8,837E+07
4	698364	1,713E+08	7755	3,788E+07	23944	1,211E+08	18649	9,232E+07
5	698053	1,712E+08	6974	3,407E+07	25184	1,273E+08	17882	8,852E+07
6	697336	1,711E+08	7548	3,687E+07	25469	1,288E+08	17984	8,903E+07
Média		1,713E+08		3,693E+07		1,234E+08		8,998E+07
SD		219427		1762802		3948613		2443665
RSD (%)		0,13		4,77		3,20		2,72

As amostras foram avaliadas em termos do cálculo dos RSD dos fatores de resposta (Equação 13 do Capítulo I). Como se pode verificar nas Tabelas 86 e 87, os valores de RSD para as substâncias ativas (na solução padrão) e para as impurezas (na solução de fórmula reconstituída) são inferiores a 5%, o que significa que o sistema é preciso.

2.6 Precisão do método

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade. Analisaram-se seis amostras reais independentes com adição das impurezas ao nível da especificação. Para quantificar as impurezas em termos de percentagens foi necessário efetuar uma calibração com duas soluções padrão independentes e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 88.

Tabela 88. Resultados da precisão do método para as impurezas (método impurezas).

Amostras Reais	% Impureza o-toluidina	% Impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina	% Impureza Dimetilanilina	% Impureza 2-dietilamino aceto-2,4-xilidina
Amostra #1	94,76	99,53	108,50	90,66
Amostra #2	97,37	97,71	109,34	95,78
Amostra #3	92,22	102,37	108,30	104,81
Amostra #4	90,97	101,90	106,59	104,58
Amostra #5	92,51	102,85	108,54	97,24
Amostra #6	93,74	102,95	109,08	93,79
Média (%)	93,6	101,2	108,4	97,8
SD (%)	2,26	2,13	0,97	5,77
RSD (%)	2,42	2,10	0,89	5,90
95 % CI	Min. (%)	91,29	98,97	107,38
	Máx.(%)	95,97	103,44	109,42

A quantificação das impurezas foi feita a partir da seguinte equação (Equação 28):

$$\% \text{ Impureza} = \frac{Aa}{MRF \times RRF} \times \frac{100}{Ma}; \quad (\text{Equação 28})$$

Aa = área do pico de cada substância ativa na solução amostra;

MRF = média do RF ;

RRF = fator de resposta relativo;

100 = corresponde ao volume do balão volumétrico para preparar a solução (mL);

Ma = massa de substância ativa pesada (mg).

Como se pode ver na Tabela 88, os valores individuais de % para cada impureza estão entre 90% e 110% e os valores de RSD são $\leq 10\%$, constatando-se assim que os limites foram cumpridos e calcularam-se os intervalos de confiança a 95% para cada impureza.

Verificou-se assim, que o método de impurezas é preciso e permite a quantificação destas quando se analisam amostras diferentes sob as mesmas condições num curto intervalo de tempo.

2.7 Exatidão

Tal como na validação do método de conteúdo, a exatidão foi avaliada através da recuperação.

De acordo com o ponto 4.2.5.1 do Capítulo I, a recuperação foi avaliada em três níveis de concentração diferentes (3 amostras independentes para cada concentração), após filtração.

A solução amostra de $C=0,2$ mg/mL referida no procedimento analítico representa a amostra a 100%, pelo que as concentrações em mg/mL das seguintes concentrações em % a 0,1%, 0,08% e ao nível da especificação (o-toluidina a 2,0% e as outras três impurezas a 0,1%) foram calculadas a partir da solução amostra a 100%.

Para o nível intermédio, com exceção da impureza o-toluidina, a concentração escolhida foi de 0,08% para que se pudesse analisar um valor intermédio entre o LQ e o nível de especificação, porque se fosse ao nível do *reporting threshold* para estas a concentração seria igual ao nível mais alto e o que se pretendiam eram níveis de concentração diferentes.

A avaliação deste parâmetro pressupõe a verificação de uma calibração com duas soluções padrão independentes com as duas substâncias ativas de acordo com o método analítico para que se possa calcular as % de recuperação de cada impureza.

As % de recuperação foram calculadas através da equação 15 e os valores obtidos foram os seguintes (Tabelas 89 - 92).

Tabela 89. Resultados de recuperação para a impureza o-toluidina.

Impureza o-toluidina (Fórmula Reconstituída)		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
Nível Intermédio	#1	2,00368E-04	43138	2,14610E-04	107,11	108,41	1,15	1,06	105,55	111,27
	#2	2,00368E-04	44021	2,19003E-04	109,30					
	#3	2,00368E-04	43830	2,18053E-04	108,83					
Nível mais alto	#1	4,00736E-03	750010	3,73128E-03	93,11	92,98	0,31	0,33	92,21	93,75
	#2	4,00736E-03	746163	3,71214E-03	92,63					
	#3	4,00736E-03	750745	3,73494E-03	93,20					

Tabela 90. Resultados de recuperação para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina.

Impureza N- cloroacetil- 2,6-xilidina (Fórmula Reconstituída)		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
Nível Intermédio	#1	1,63778E-04	5437	1,69430E-04	103,45	105,07	1,42	1,35	101,54	108,60
	#2	1,63778E-04	5577	1,73793E-04	106,11					
	#3	1,63778E-04	5552	1,73014E-04	105,64					
Nível mais alto	#1	2,04723E-04	6974	2,17327E-04	106,16	102,25	6,04	5,91	87,25	117,25
	#2	2,04723E-04	6918	2,15582E-04	105,30					
	#3	2,04723E-04	6260	1,95077E-04	95,29					

Tabela 91. Resultados de recuperação para a impureza dimetilnilina.

Impureza Dimetilnilina (Fórmula Reconstituída)		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
Nível Intermédio	#1	1,59341E-04	24373	1,69733E-04	106,52	107,49	1,06	0,98	104,86	110,12
	#2	1,59341E-04	24558	1,71021E-04	107,33					
	#3	1,59341E-04	24853	1,73075E-04	108,62					
Nível mais alto	#1	2,03297E-04	30946	2,15507E-04	106,01	106,17	1,64	1,54	102,10	110,24
	#2	2,03297E-04	31012	2,15966E-04	106,23					
	#3	2,03297E-04	31026	2,16064E-04	106,28					

Tabela 92. Resultados de recuperação para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina.

Impureza 2-dietilamino aceto-2,4- xilidina (Fórmula Reconstituída)		Conc. Real (mg/mL)	Áreas (Injeção Simples)	Conc. Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média Recup. (%)	SD (%)	RSD (%)	95% CI	
									Min. (%)	Máx. (%)
Nível Intermédio	#1	1,61600E -04	12103	1,55564E -04	96,27	99,70	3,21	3,22	91,73	107,67
	#2	1,61600E -04	12903	1,65847E -04	102,63					
	#3	1,61600E -04	12600	1,61952E -04	100,22					
Nível mais alto	#1	2,02000E -04	15493	1,99137E -04	98,58	98,28	0,89	0,90	96,07	100,49
	#2	2,02000E -04	15555	1,99934E -04	98,98					
	#3	2,02000E -04	15288	1,96502E -04	97,28					

Como se pode ver nas Tabelas 89, 90, 91 e 92, as % de recuperação das impurezas encontram-se entre 90% e 110% e os valores de RSD obtidos são inferiores a 10%. Para além disso, foram calculados os intervalos de confiança a 95% para as médias de recuperação de cada impureza.

Verificou-se assim, que o método é exato, pois obtiveram-se bons resultados de recuperação no nível intermédio e mais alto estudados (a avaliação do nível mais baixo consta no ponto 2.3 da validação deste método).

2.8 Estudo da estabilidade das soluções

Este parâmetro foi avaliado antes de realizar o desenho de experiências nas condições SOP (método analítico descrito na USP) para se determinar qual a estabilidade das substâncias ativas e das impurezas.

Assim prepararam-se três soluções padrão e três soluções de fórmula reconstituída que foram mantidas à temperatura ambiente e injetadas com intervalos de 24h.

As soluções foram mantidas à temperatura ambiente e foi considerado como tempo inicial o $t=0h$.

Nas Tabelas 93 e 94, encontram-se os valores relativos à estabilidade das soluções padrão e nas Tabelas 96, 97, 98 e 99, os valores relativos à estabilidade das impurezas. Neste caso, as soluções padrão foram analisadas com injeção dupla mas as soluções amostra foram analisadas com injeção simples devido à duração da análise. As Tabelas 95 e 100 apresentam a avaliação dos desvios e os valores *p-value*.

2.8.1 Estudo da estabilidade dos padrões

Tabela 93. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para a Prilocaina HCl (método impurezas).

Temperatura ambiente	Concentração Real (mg/mL)		Áreas			RF	Média RF HCl Prilocaina (n=3)	RSD dos RF (%)	% alteração relação t=0h
			Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)				
t = 0h	Sol. Padrão#1	2,0000E-03	87940	89405	88673	4,434E+07	4,431E+07	0,63	-
	Sol. Padrão#2	2,0060E-03	87959	88659	88309	4,402E+07			
	Sol. Padrão#3	2,0180E-03	90122	89789	89956	4,458E+07			
t = 24 h	Sol. Padrão#1	2,0000E-03	89407	90133	89770	4,489E+07	4,450E+07	0,88	0,43
	Sol. Padrão#2	2,0060E-03	89165	87755	88460	4,410E+07			
	Sol. Padrão#3	2,0180E-03	90271	89397	89834	4,452E+07			
t = 48 h	Sol. Padrão#1	2,0000E-03	88785	88740	88763	4,438E+07	4,410E+07	0,81	-0,47
	Sol. Padrão#2	2,0060E-03	87674	87647	87661	4,370E+07			
	Sol. Padrão#3	2,0180E-03	89458	89055	89257	4,423E+07			

Tabela 94. Resultados do estudo da estabilidade da solução padrão para a Lidocaína HCl (método impurezas).

Temperatura ambiente	Concentração Real (mg/mL)		Áreas			RF	Média RF HCl Prilocaina (n=3)	RSD dos RF (%)	% alteração relação t=0h
			Injeção #1	Injeção #2	Média (n=2)				
t = 0h	Sol. Padrão#1	1,89698E-03	41661	42056	41859	2,207E+07	2,183E+07	1,09	-
	Sol. Padrão#2	1,89323E-03	41032	41677	41355	2,184E+07			
	Sol. Padrão#3	1,88947E-03	41179	40406	40793	2,159E+07			
t = 24 h	Sol. Padrão#1	1,89698E-03	41859	42016	41938	2,211E+07	2,220E+07	2,19	1,69
	Sol. Padrão#2	1,89323E-03	41525	40890	41208	2,177E+07			
	Sol. Padrão#3	1,88947E-03	43226	42648	42937	2,272E+07			
t = 48 h	Sol. Padrão#1	1,89698E-03	40880	42325	41603	2,193E+07	2,216E+07	0,9%	1,51
	Sol. Padrão#2	1,89323E-03	41635	42887	42261	2,232E+07			
	Sol. Padrão#3	1,88947E-03	42274	41738	42006	2,223E+07			

Tabela 95. Avaliação das % de alteração em relação ao $t=0h$ e do p -value para as soluções padrão de ambas as substâncias ativas (método impurezas).

Substâncias ativas	tempos (h)	% de alteração em relação ao $t=0h$ ($\leq 10\%$)	p -value $\geq 0,05$
Prilocaina HCl	$t=24h$	0,43%	0,42
	$t=48h$	-0,47%	0,24
Lidocaína HCl	$t=24h$	1,69%	0,44
	$t=48h$	1,51%	0,30

Para avaliar a estabilidade das soluções padrão, a % de alteração nos tempos 24h e 48h (Equação 18 do Capítulo I) tem que ser $\leq 10\%$ para demonstrar que os padrões são estáveis. Como se pode ver na Tabela 95, isto verifica-se, pelo que as soluções padrão são estáveis durante pelo menos 48h.

Para além disso foram calculados os valores de p -value (a partir dos fatores de resposta dos tempos 24h e 48h em relação ao $t=0h$) que devem ser $\geq 0,05$ para um grau de confiança de 95%.

2.8.2 Estudo da estabilidade das amostras

Para avaliar a estabilidade das amostras é necessária a realização de uma calibração (duas soluções padrão independentes) para que se possa quantificar as impurezas e avaliar a percentagem de alteração destas ao longo do tempo (através da Equação 19 – Capítulo I).

Tabela 96. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza o-toluidina (limite de especificação 2,0%).

Temperatura ambiente	Amostras (Fórmula Reconstituída com Impurezas)	Áreas (injeção simples)	% Impureza (n=3)	Média % Impureza (n=3)	RSD dos RF (%)	% alteração em relação $t = 0h$
t = 0h	Sol.Amostra #1	772067	8,7103	8,7567	0,00	-
	Sol.Amostra #2	778731	8,7767			
	Sol.Amostra #3	778512	8,7830			
t = 24 h	Sol.Amostra #1	768700	8,6723	8,7312	0,01	-1,28
	Sol.Amostra #2	776202	8,7482			
	Sol.Amostra #3	777631	8,7730			
t = 48 h	Sol.Amostra #1	765850	8,6401	8,6814	0,00	-3,77
	Sol.Amostra #2	770828	8,6876			
	Sol.Amostra #3	772618	8,7165			

Tabela 97. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina (limite de especificação 0,1%).

Temperatura ambiente	Amostras (Fórmula Reconstituída com Impurezas)	Áreas (injeção simples)	% Impureza (n=3)	Média % Impureza (n=3)	RSD dos RF (%)	% alteração em relação t =0h
t = 0h	Sol.Amostra #1	8280	0,1837	0,1873	0,02	-
	Sol.Amostra #2	8498	0,1893			
	Sol.Amostra #3	8516	0,1889			
t = 24 h	Sol.Amostra #1	8716	0,1933	0,1887	0,03	1,40
	Sol.Amostra #2	8491	0,1892			
	Sol.Amostra #3	8271	0,1835			
t = 48 h	Sol.Amostra #1	7407	0,1643	0,1698	0,03	-17,50
	Sol.Amostra #2	7770	0,1731			
	Sol.Amostra #3	7749	0,1719			

Tabela 98. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza dimetilnilina (limite de especificação 0,1%).

Temperatura ambiente	Amostras (Fórmula Reconstituída com Impurezas)	Áreas (injeção simples)	% Impureza (n=3)	Média % Impureza (n=3)	RSD dos RF (%)	% alteração em relação t =0h
t = 0h	Sol.Amostra #1	35207	0,7809	0,7960	0,02	-
	Sol.Amostra #2	35860	0,7990			
	Sol.Amostra #3	36430	0,8080			
t = 24 h	Sol.Amostra #1	34567	0,7667	0,7941	0,03	-1,90
	Sol.Amostra #2	35834	0,7984			
	Sol.Amostra #3	36848	0,8173			
t = 48 h	Sol.Amostra #1	34569	0,7668	0,7868	0,02	-9,20
	Sol.Amostra #2	35689	0,7952			
	Sol.Amostra #3	35990	0,7983			

Tabela 99. Resultados do estudo da estabilidade da solução de fórmula reconstituída para a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina (limite de especificação 0,1%).

Temperatura ambiente	Amostras (Fórmula Reconstituída com Impurezas)	Áreas (injeção simples)	% Impureza (n=3)	Média % Impureza (n=3)	RSD dos RF (%)	% alteração em relação t =0h
t = 0h	Sol.Amostra #1	18310	0,4061	0,4091	0,02	-
	Sol.Amostra #2	18755	0,4179			
	Sol.Amostra #3	18186	0,4034			
t = 24 h	Sol.Amostra #1	19282	0,4277	0,4110	0,04	1,90
	Sol.Amostra #2	17710	0,3946			
	Sol.Amostra #3	18519	0,4108			
t = 48 h	Sol.Amostra #1	20668	0,4584	0,4477	0,02	38,60
	Sol.Amostra #2	19990	0,4454			
	Sol.Amostra #3	19807	0,4477			

Tabela 100. Avaliação das % de alteração em relação ao t=0h e do p-value para as impurezas.

Impurezas	tempos (h)	% de alteração em relação ao t=0h ($\leq 10\%$)
o-toluidina	t=24h	-1,28%
	t=48h	-3,77%
N-cloroacetil-2,6-xilidina	t=24h	1,40%
	t=48h	-17,50%
Dimetilnilina	t=24h	-1,90%
	t=48h	-9,20%
2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina	t=24h	1,90%
	t=48h	38,60%

A % de alteração das impurezas nos tempos 24h e 48h têm que ser $\leq 10\%$ para demonstrar que as impurezas são estáveis. Como se pode ver na Tabela 100, as impurezas N-cloroacetil-2,6-xilidina e 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina apresentam uma % de alteração superiores a 10% (valores a negrito), logo as soluções amostra não são estáveis durante 48h. Assim, visto que a estabilidade foi avaliada apenas às 24h e 48h, só se pode afirmar a estabilidade das soluções até às 24h, pois no t=24h as percentagem de alteração são inferiores a 10%. Na avaliação da estabilidade das impurezas os valores de p-value não foram calculados porque não estamos a avaliar os fatores de resposta.

Capítulo VI – Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar dois métodos analíticos. O projeto iniciou-se com base na monografia “*Lidocaine and Prilocaine Cream*” da USP36-NF31”.

No método analítico de conteúdo o que se pretendia era um método isocrático curto para dar respostas que auxiliassem o desenvolvimento da formulação e o desenvolvimento foi iniciado a partir de alguns testes com colunas e gradientes diferentes. Assim, usou-se a ferramenta de DoE de modo a determinar a composição da fase móvel e o volume de injeção adequados.

De seguida, o método foi validado e demonstrou-se que o método analítico era específico, linear, exato e preciso. Por fim, foi verificada a sua robustez através do DoE onde se concluiu que o método em questão é robusto e que as variações de fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna não afetavam as percentagens de recuperação das duas substâncias ativas.

No método analítico de impurezas, testaram-se também algumas colunas e gradientes para que não houvesse alterações cromatográficas e sobreposição de picos. De seguida, com recurso ao DoE estudaram-se as condições cromatográficas, como o fluxo, a temperatura da coluna e o volume de injeção. Verificou-se que, devido aos limites permitidos para a variação de % de impurezas serem estreitos, a zona de trabalho obtida com o DoE também foi reduzida e por isso decidiu-se avançar com as condições SOP.

Um dos objetivos no desenvolvimento do método de impurezas era que a solução amostra usada no método de conteúdo de $C=0,04$ mg/mL fosse também a amostra para o método de impurezas, uma vez que esta amostra é muito diluída para analisar as impurezas usou-se então o *stock* da solução amostra usada no método de conteúdo de $C=0,2$ mg/mL. Assim, apesar dos métodos serem desenvolvidos com amostras de concentração diferentes, temos a vantagem de preparar um único *stock* de solução amostra para os dois métodos analíticos.

Por fim, validou-se o método com base nos parâmetros recomendados pela ICH, e demonstrou-se que o método era específico, linear, exato e preciso. Contudo, visto que no parâmetro de linearidade os coeficientes de correlação para a Prilocaina HCl e para a impureza o-toluidina não cumpriram o critério de coeficiente de correlação esta poderia ser repetida numa perspetiva futura.

A robustez não foi avaliada neste método, visto que este parâmetro não é obrigatório na validação de métodos analíticos (pela ICH), no entanto, considerou-se que

este também é um parâmetro importante que poderá ser determinado numa perspectiva futura.

Conclui-se assim, que os objetivos da tese foram cumpridos e os métodos analíticos encontram-se devidamente validados.

Em análises futuras, poderiam analisar-se outras formulações (por exemplo formulações sem o tween 80) para verificar se se obteriam cromatogramas diferentes aos obtidos com a formulação em causa para otimizar o tempo de corrida do método de impurezas com recurso ao DoE.

Capítulo VII – Referências Bibliográficas

- [1] BENSON, Heather A. E.; WATKINSON, Adam C. – **Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice**. First Edition. Canada: John Wiley & Sons, Inc, 2012. ISBN 978-0-470-45029-1.
- [2] WICKETT, R.R.; VISSCHER, M. O. – Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*. Vol. 34 (Dec. 2006) 98–110.
- [3] WALTERS, Kenneth A. – **Dermatological and Transdermal Formulations**. First Edition. James Swarbrick. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. ISBN 0-8247-9889-9.
- [4] RAMALHO A. [et. al.] – In vivo friction study of human skin: Influence of moisturizers on different anatomical sites, *Wear*. Vol. 263 (Sep. 2007) 1044–1049.
- [5] “Healthy on Care”. Disponível na Internet: <http://www.healthyoncare.com/skin-structure-and-function/.html>. Consultado a 10/05/2013.
- [6] SEELEY, Rod R. ; STEPHENS, Trent D. ; TATE, Philip – **Anatomia & Fisiologia**. 6ª Ed. McGraw-Hill Companies, Inc., 2005. ISBN 972-8930-07-0.
- [7] MENON, G.K. – New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced drug delivery reviews*. Vol. 54 Suppl 1 (Nov. 2002) 3–17.
- [8] LEE, S. H. [et. al.] – An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei medical journal*. Vol. 47 (Jun. 2006) 293–306.
- [9] “International Association for the Study of Pain”. Disponível na Internet: <http://www.iasp-pain.org/>. Consultado a 05/05/2013.
- [10] JORGE, L.L. [et. al.] – Topical preparations for pain relief: efficacy and patient adherence. *Journal of Pain Research*. Vol. 4 (Jan. 2011) 11–24.
- [11] FRIEDMAN, P.M. [et. al.] – Topical anesthetics update: EMLA and beyond. *American Society for Dermatologic Surgery, Inc*. Vol. 27 (Dec. 2001) 1019–26.

- [12] BERKMAN, S. [et. al.] – Adverse effects of topical anesthetics for dermatologic procedures. *Expert opinion on drug safety*. Vol. 3 (May 2012) 415–423.
- [13] GUIMARÃES, Serafim ; MOURA, Daniel ; SILVA, Patrícia Soares – *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. 5ª Edição. Porto Editora, Janeiro 2006. ISBN 972-0-06029-8.
- [14] FRIEDMAN, P.M. [et. al.] – Comparative study of the efficacy of four topical anesthetics. *American Society for Dermatologic Surgery, Inc.* Vol. 25 (Dec. 1999) 950–954.
- [15] SOBANKO, J.F. [et. al.] – Topical anesthetics for dermatologic procedures: a review. *American Society for Dermatologic Surgery, Inc.* Nº 38 (2012) 709–721.
- [16] KOAY, J. [et. al.] – Application of local anesthetics in dermatologic surgery. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery*. Nº 28 (2002) 143–148.
- [17] WETZIG, T. [et al] – Local anesthesia in dermatology. *Journal of the German Society of Dermatology*. (2010) 1007–1018.
- [18] HUANG, W. [et. al.] – Topical anesthetics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Vol. 43 (Aug. 2000) 286–298.
- [19] TADICHERLA, S. [et. al.] – Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. *Therapeutics and clinical risk management*. vol. 2, no. 1 (2006) 99–113.
- [20] KUNDU, S. [et. al.] – Principles of Office Anesthesia: Part II. Topical Anesthesia. vol. 66, nº 1 (2002) 99–102.
- [21] FORSTER, M. [et. al.] – Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur. Journal Dermatology*. Vol.19, nº4 (2009) 309–323.

- [22] INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde; Portugal; EMLA ®.
- [23] FDA Center for Drug Evaluation and Research; EMLA ® Cream; Astrazeneca LP; Application number: 19-941/S-017; December 2005.
- [24] OHANNESIAN, Lena – **Handbook of Pharmaceutical Analysis**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. ISBN: 0-8247-0462-2.
- [25] SNYDER, L. [et. al.] – **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3ªEd. WILEY, 2010. ISBN: 978-0-470-16754-0.
- [26] HOLLER, F. James [et. al.] – **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, 2009.
- [27] FORGÁCS, E. [et. al.] – **Molecular Basis of Chromatographic Separation**. New York, CRC Press, 1997.
- [28] United States Pharmacopoeia, USP 36-NF31 (2013), <624> Chromatography.
- [29] European Pharmacopoeia 7.0. (2013), 2.2.29. Liquid Chromatography.
- [30] Disponível na Internet: http://www.waters.com/waters/pt_PT/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064. [Acedido a 20/Nov/2013].
- [31] SWADESH, Joel K. – **HPLC Practical and industrial applications**. 2ªEd. CRC Press LLC, 2001. ISBN 0-8493-0003-7.
- [32] European Pharmacopoeia 7.0 (2013), 2.2.46. Chromatographic separation techniques.
- [33] ROZET, Eric [et. al.] – Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*. N° 1158 (2007) 111–125.
- [34] PETERS, Franck [et. al.] – Validation of new methods. *Forensic Science International*. N° 165 (2007) 216–224.

- [35] SHABIR, G. – Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonisation. *Journal of Chromatography A*. N° 987 (2003) 57–66.
- [36] ICH Harmonised Tripartite Guideline – **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, Nov 2005. [Acedido a 5 de Janeiro de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- [37] SHABIR, G. [et. al.] – **Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation**. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 30 (April 2007) [Acedido a 9 de Novembro de 2013]. Disponível na Internet: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826070601084753#.Uoz_3tLlb0Q.
- [38] Guidance for Industry – **Analytical Procedures and Methods Validation**. FDA Draft Guidance (Aug 2000); [Acedido a 5 de Janeiro de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm122858.pdf>.
- [39] United States Pharmacopoeia, USP 36-NF31, <1225> **Validation of Compendial Procedures**. [Acedido a 5 de Janeiro de 2013].
- [40] United States Pharmacopoeia, USP 36-NF31, <1010> **Analytical Data – Interpretation and treatment**. [Acedido a 5 de Janeiro de 2013].
- [41] ICH Harmonised Tripartite Guideline – **Impurities in new drug products Q3B (R2)**, Jun 2006. [Acedido a 10 de Março de 2013]. Disponível na Internet: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf.
- [42] CAUSON, Roger – Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoints and discussion. *Journal of Chromatography B*. N° 689 (1997) 175–180.

- [43] WOODCOCK, J. – The concept of pharmaceutical quality. *Am. Pharm. Rev.* (Nov/Dec 2004) 1–3.
- [44] LIONBERGER R. [et. al.] – Quality by Design: Concepts for ANDAs. *The AAPS Journal*. Vol. 10 (June 2008) 268–276.
- [45] ROY, Sandipan – Quality by design: A holistic concept of building quality in pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*. Vol 3 (2012) 100–108.
- [46] Guidance for Industry – Process Validation: General Principles and Practices; FDA Guidance (Jan 2011); Revision 1.
- [47] ICH Harmonised Tripartite Guideline – **Pharmaceutical Development Q8 (R2)**, August 2009. [Acedido a 10 de Junho de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
- [48] XU, Lawrence X. – Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding and Control. *Pharmaceutical Research*. Vol. 25 N°4 (April 2008) 781–791.
- [49] ICH Harmonised Tripartite Guideline – **Pharmaceutical Quality System Q10**, June 2008. [Acedido a 10 de Junho de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- [50] ORLANDINI, S. [et. al] – Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal. Bioanal. Chem.* (2012).
- [51] HYBBERT, D.B. – Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of Chromatography B*. (2012) 2–13.
- [52] VOGT, Frederick [et. al.] – Development of Quality-By-Design Analytical Methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 100, N° 3 (March 2011) 797–811.

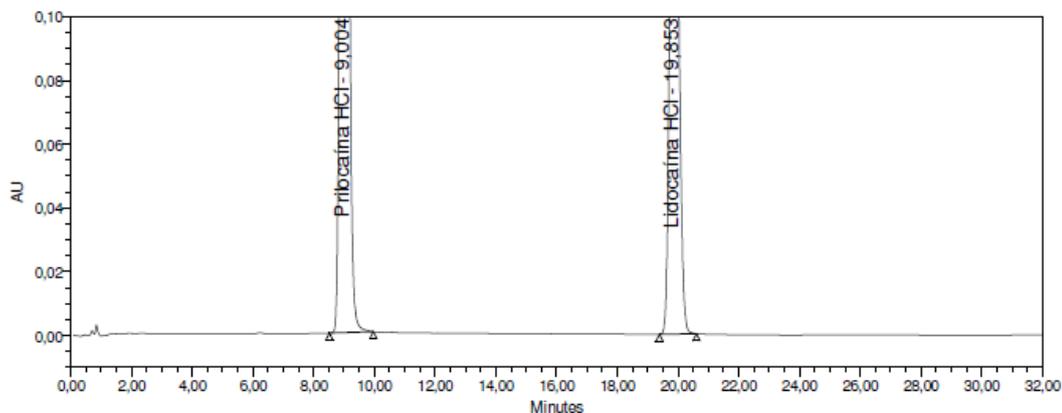
- [53] USP36-NF31 Online; **Monograph “Lidocaine and Prilocaine Cream”**; The United States Pharmacopeial Convention; page 4115; 2013.
- [54] KRISKO, R. [et. al.] – Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development. *Journal of Chromatography A*. 1122 (2006) 186–193.
- [55] BELAL, T. [et. al.] – Gradient HPLC-DAD Stability Indicating Determination of Miconazole Nitrate and Lidocaine Hydrochloride in their Combined Oral Gel Dosage Form. *Journal of Chromatographic Science*. 50 (2012) 401–409.
- [56] PLENIS, A. [et. al.] – Development of the HPLC Method for Simultaneous Determination of Lidocaine Hydrochloride and Tribenoside Along with Their Impurities Supported by the QSRR Approach. *Chromatographia*. 76 (2013) 255–265.
- [57] KATS, Michael – Forced Degradation Studies: Regulatory Considerations and Implementation. *BioPharm International* (Jul 2005).
- [58] REYNOLDS, DW, [et. al.] – Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology* (Feb 2002).

Capítulo VIII – Anexos

I Cromatogramas do desenvolvimento dos métodos analíticos

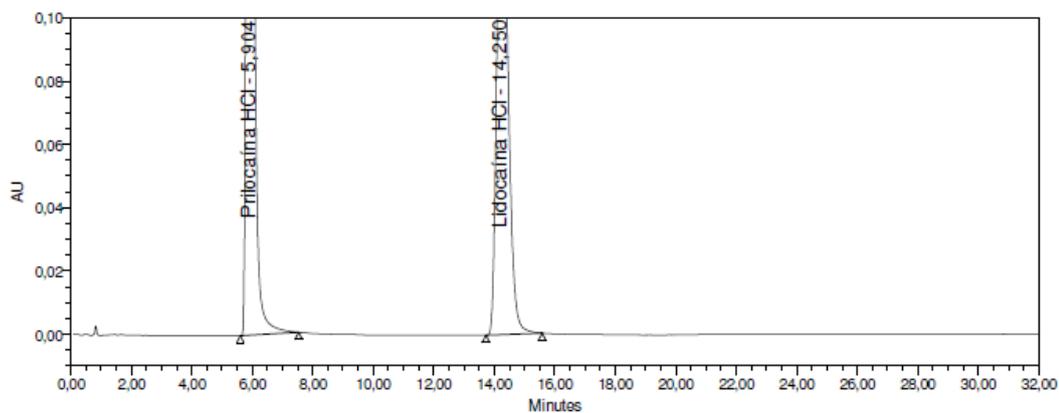
I.1 Estudos preliminares de desenvolvimento de métodos analíticos

Cromatograma 1. Cromatograma representativo dos estudos preliminares de desenvolvimento.

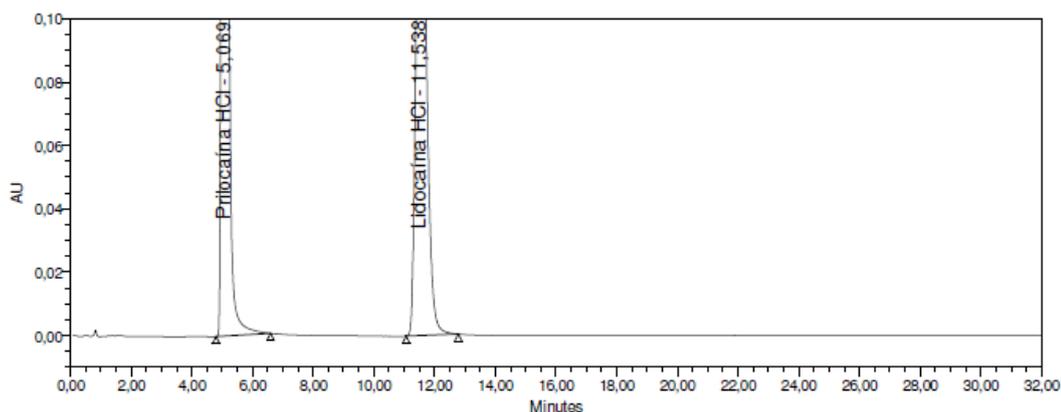


I.2 Desenvolvimento do método analítico para determinação do conteúdo

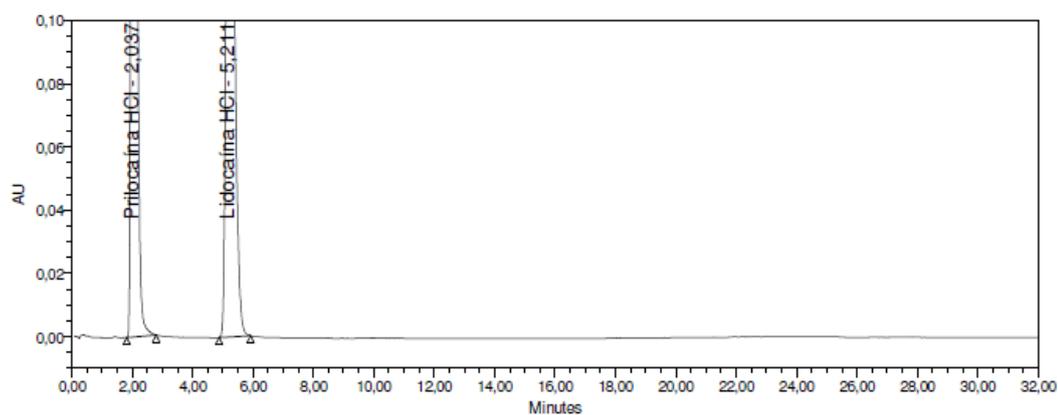
Cromatograma 2. Cromatograma representativo da experiência com a coluna cromatográfica BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 3µm) com o programa de gradiente 1.



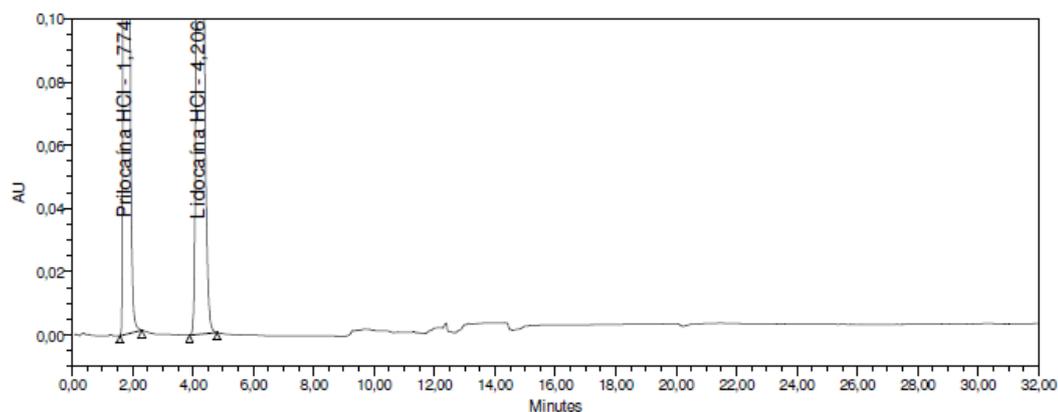
Cromatograma 3. Cromatograma representativo da experiência com a coluna cromatográfica BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 3µm) com o programa de gradiente 2.



Cromatograma 4. Cromatograma representativo da experiência com a coluna cromatográfica Luna C18 (2) 100A (50 x 3,0 mm; 3µm) com o programa de gradiente 1.

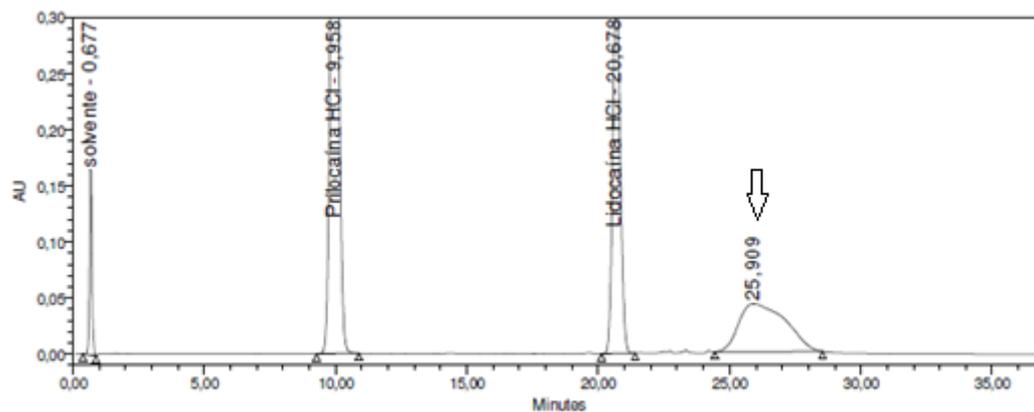


Cromatograma 5. Cromatograma representativo da experiência com a coluna cromatográfica Luna C18 (2) 100A (50 x 3,0 mm; 3µm) com o programa de gradiente 2.

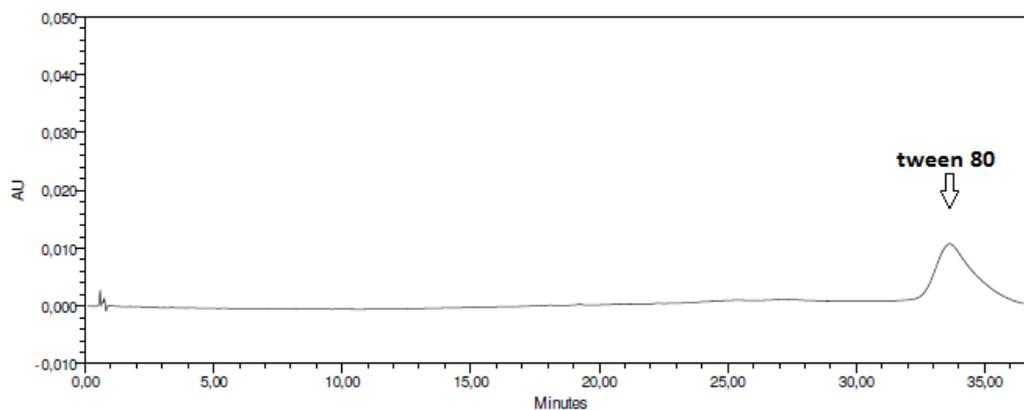


1.3 Desenvolvimento do método analítico para determinação do perfil de Impurezas

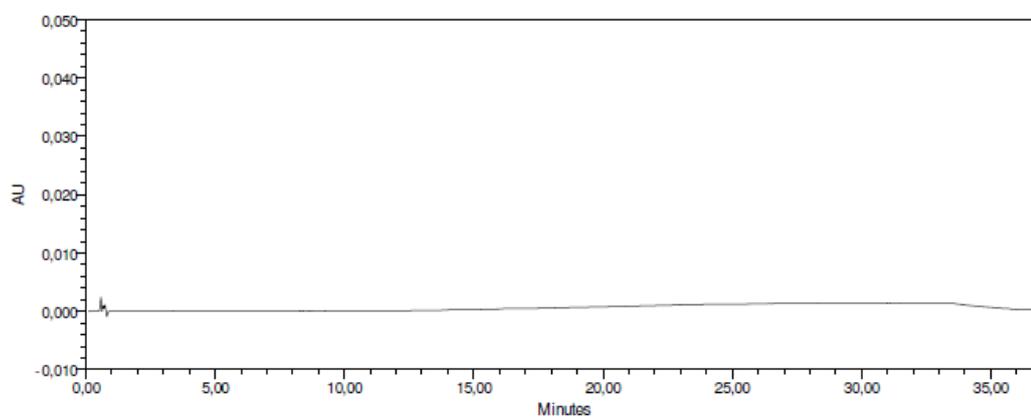
Cromatograma 6. Cromatograma da amostra de fórmula reconstituída (6ª injeção).



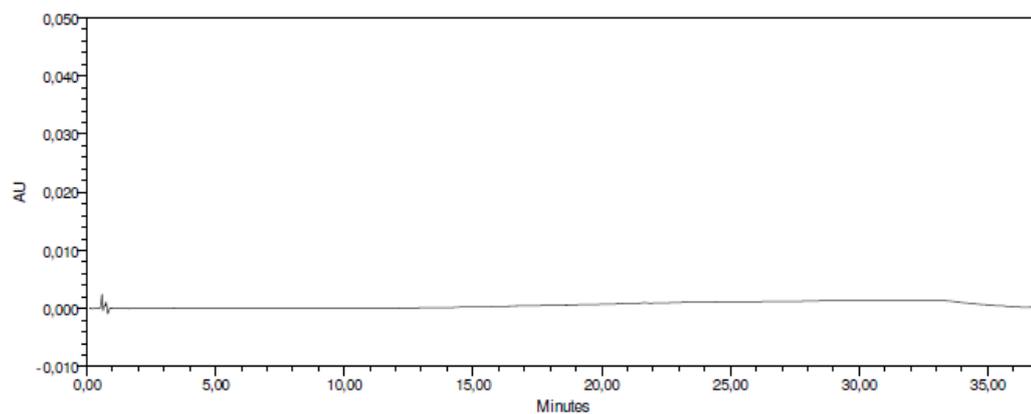
Cromatograma 7. Cromatograma da solução do excipiente tween 80 (análise excipientes).



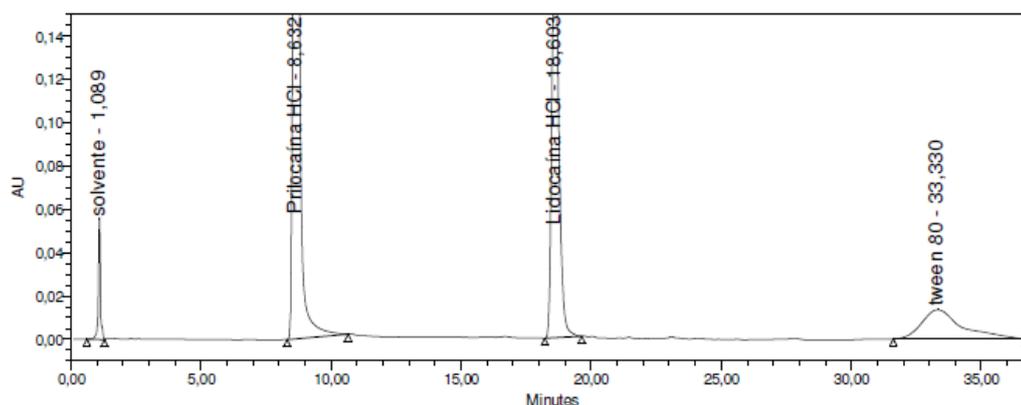
Cromatograma 8. Cromatograma da solução do excipiente propilenoglicol (análise excipientes).



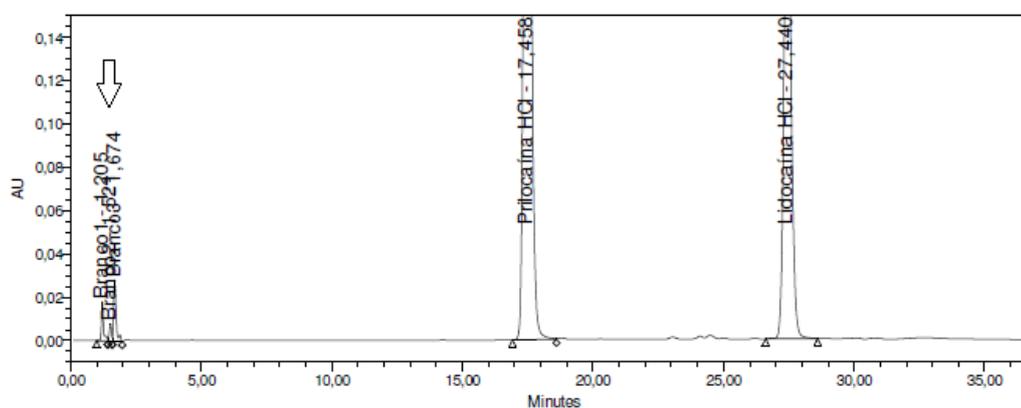
Cromatograma 9. Cromatograma da solução do excipiente oleato de etilo (análise excipientes).



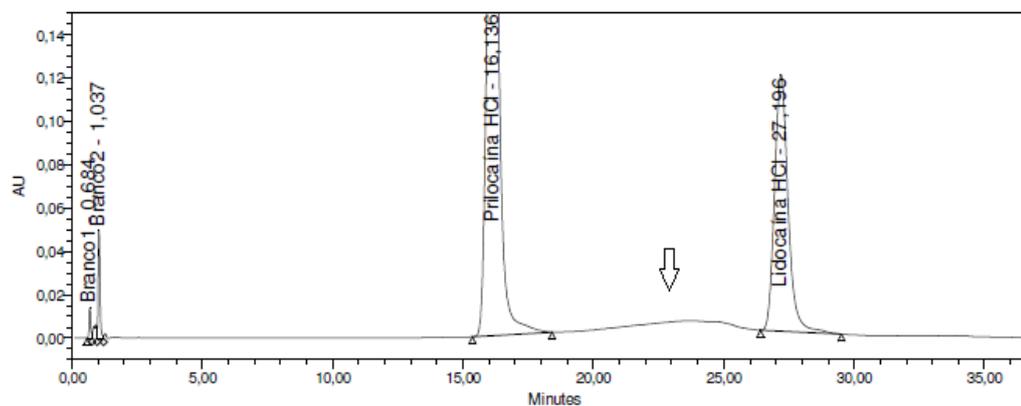
Cromatograma 10. Cromatograma representativo da experiência com a coluna BDS Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 3µm) – experiência 1; método impurezas.



Cromatograma 11. Cromatograma representativo da experiência com a coluna Zorbax RX C8 (250 x 4,6mm, 5 µm) – experiência 2; método impurezas.



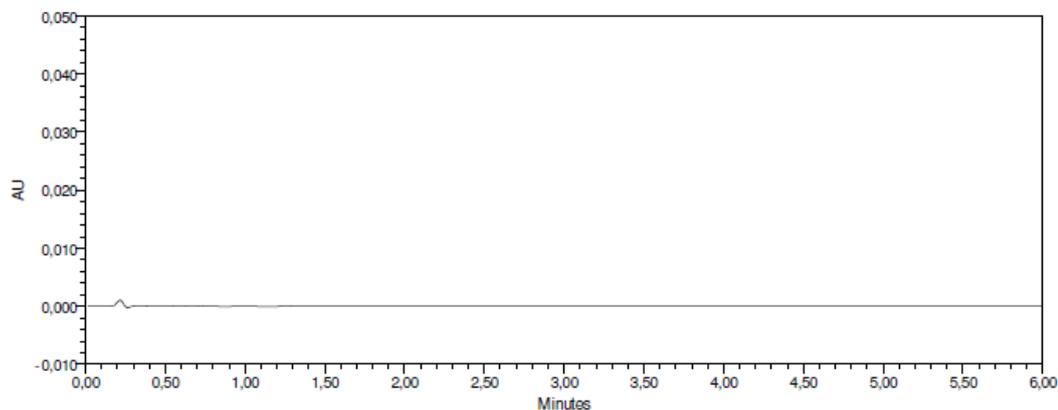
Cromatograma 12. Cromatograma representativo da experiência com a coluna Inertsil ODS-3V (250 x 4,6mm, 5 µm) – experiência 3; método impurezas.



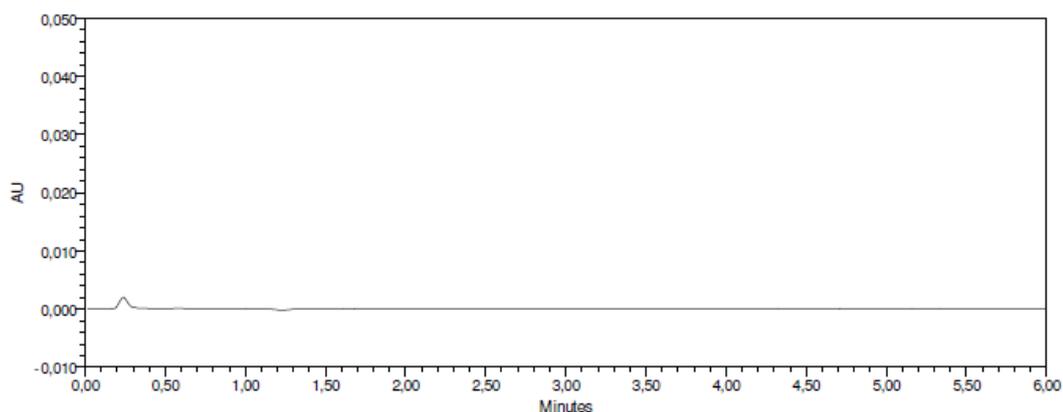
2 Cromatogramas da validação dos métodos analíticos

2.1 Validação do método analítico para quantificação de conteúdo

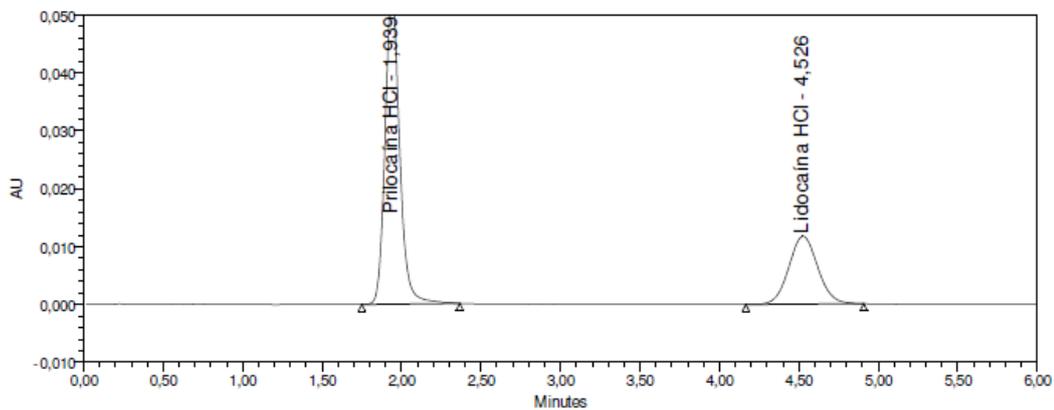
Cromatograma 13. Cromatograma obtido no branco (Solvente), Seletividade.



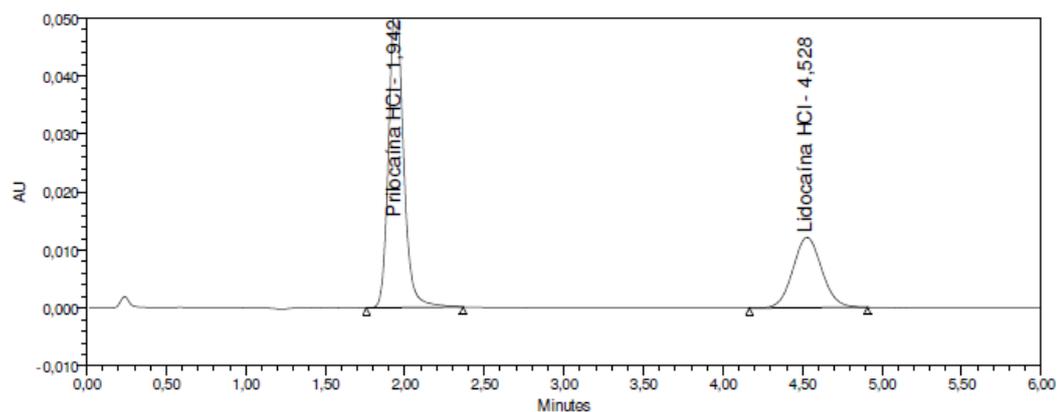
Cromatograma 14. Cromatograma da mistura de excipientes, Seletividade.



Cromatograma 15. Cromatograma da solução padrão com as duas substâncias ativas a 100% (C= 0,04 mg/mL),
Seletividade.

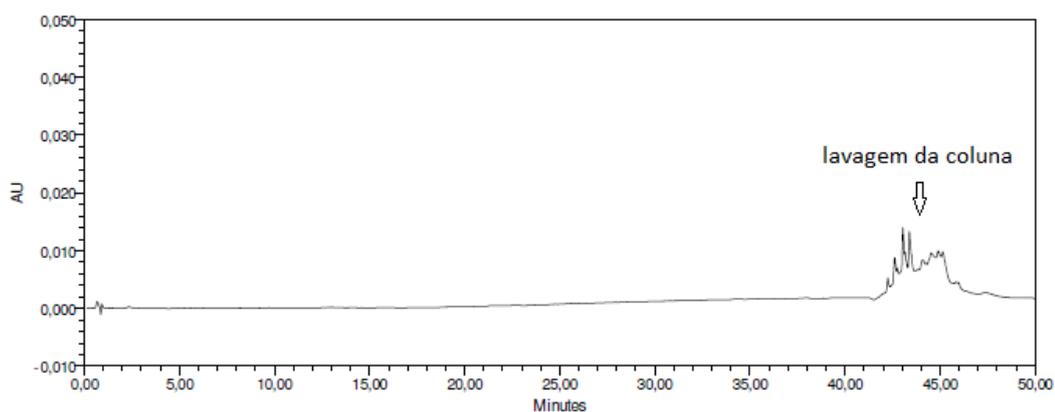


Cromatograma 16. Cromatograma da fórmula reconstituída (excipiente + substâncias ativas a 100% C= 0,04 mg/mL), Seletividade.

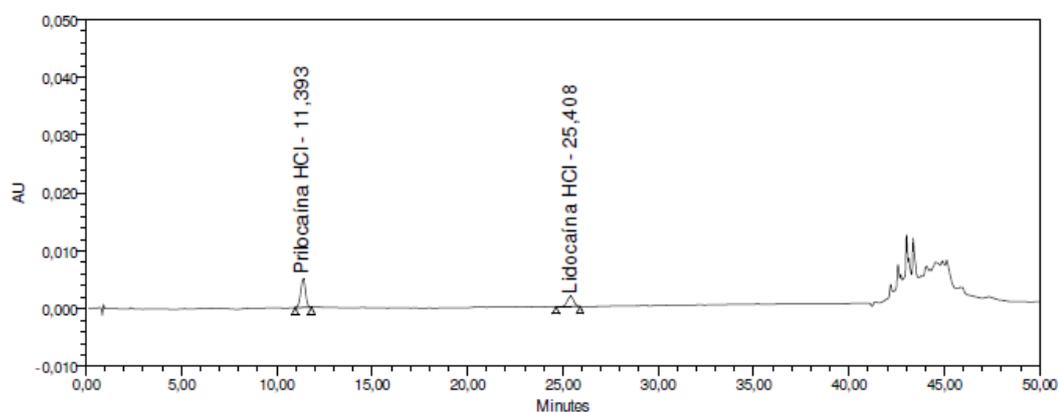


2.2 Validação do método analítico para determinação do perfil de impurezas

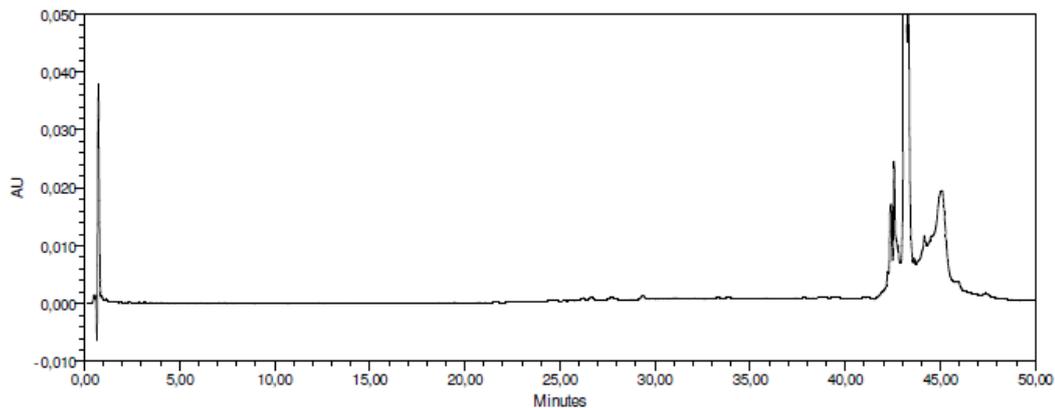
Cromatograma 17. Cromatograma obtido no branco (Solvente), Seletividade.



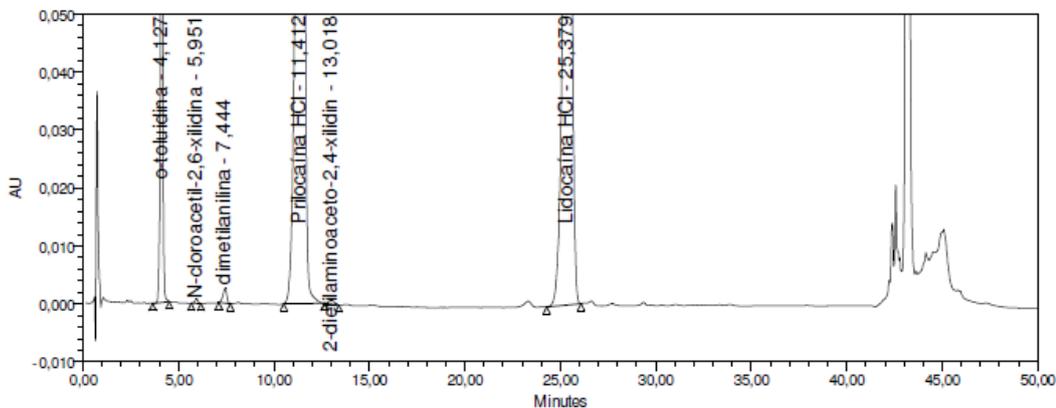
Cromatograma 18. Cromatograma da solução padrão com as duas substâncias ativas a 100% (C= 0,002 mg/mL), Seletividade.



Cromatograma 19. Cromatograma da mistura de excipientes, Seletividade.



Cromatograma 20. Cromatograma da fórmula reconstituída (excipientes + substâncias ativas a 100% C= 0,2 mg/mL), + impurezas, Seletividade.



Cromatograma 21. Cromatograma do limite de quantificação das substâncias ativas a 0,09%, a impureza o-toluidina a 0,016%, a impureza N-cloroacetil-2,6-xilidina a 0,05%, a impureza dimetilnilina a 0,019% e a impureza 2-dietilaminoaceto-2,4-xilidina a 0,025%.

