

Paulo Henrique Santos Pires Teixeira

**ESTABILIDADE DE LOTES DE
PRODUÇÃO PARA SOLUÇÕES DE
PERFUSÃO DE METRONIDAZOL**

Determinação de Substâncias Aparentadas em Solução

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de
especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente

Orientador

Dr. Jorge Luís F. S. Costa Pereira

Co-Orientador

Dr. Ricardo Campante

Julho 2013

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Este trabalho de investigação, apesar de se tratar de um trabalho individual e com uma finalidade académica, não seria possível sem um leque de pessoas tão importantes cujo contributo, directa ou indirectamente, influenciou toda a sua natureza. Deve, portanto, de ser realçada toda a sua importância. Torna-se assim um desafio escrever esta secção.

Tenho de começar por agradecer ao orientador de todo este projecto, Prof. Dr. Jorge Costa Pereira, por ter sempre uma palavra de apreço. Primeiro por ter aceite o meu convite, por todas as oportunidades divulgadas, inclusive a que me levou até aos Laboratórios Basi; depois, por ter confiado nas minhas capacidades para desenvolver um trabalho, com o seu nome associado, fora da “concha”. Fico-lhe grato, essencialmente, por nunca ter falhado e ter estado sempre presente quando necessário, pelos seus ensinamentos, pelo constante sentido de orientação e pela competência científica que sempre o acompanha.

Ao Dr. Ricardo Campante, co-orientador e director técnico do Departamento de Controlo e Qualidade dos Laboratórios Basi, por me ter incluído no seu grupo de trabalho, por ter delineado e colocado este projecto nas minhas mãos e por ter disponibilizado todo o tempo para debater qualquer tipo dúvida.

Fico grato por ter encontrado os meus dois mentores na Empresa, Ângelo Gomes e Catarina Duarte. Ao Ângelo pelos ensinamentos frutíferos, confiança e ajuda constante; à Catarina pelo acompanhamento e disponibilidade durante todo o trabalho e por me mostrar um mundo onde há tanto para descobrir.

Porque é envolto no trabalho que também se conseguem ver alguns momentos de descontração, fica um obrigado à equipa de trabalho com que todos os dias lido no Controlo e Qualidade dos Laboratórios Basi. Em especial, agradeço a amizade aos colegas do laboratório de Microbiologia – Marta, Joana, João e Gonçalo – que tornam cada dia em algo nada efémero e por me levantarem o ânimo quando julgava não ser possível. Do mesmo modo, um beijinho à Josefina e à Sara, a essas mulheres especiais que têm sempre uma palavra de consideração constante.

Ainda respeitante aos Laboratórios Basi, fica um obrigado ao Dr. Ricardo Soares, pelo companheirismo presente em cada viagem realizada.

A universidade não trouxe apenas conhecimento, abarca grandes amizades inesquecíveis para toda uma vida. Porque “um amigo é um bem” e incluo-vos nesse elevado patamar como bem sabem. Obrigado ao Tiago, André, Carlos, Rui Rodrigues e Rui Apóstolo, Diana, Ana, às minhas duas Joanas, Fábio e Diogo.

À família Furtado Alexandre deixo um agradecimento especial por me terem tratado como um de vós. Obrigado Teresa, pelos momentos, paciência e amizade inesgotáveis que possuiis.

Alguém sem o qual este trabalho e todo o percurso académico não seriam possíveis é sem os meus pais. Tenho-lhes um carinho devoto todos os dias e agradeço-lhes por todas as oportunidades que me proporcionam, ainda hoje, com a sua ajuda. Congratulo-me, principalmente por acreditarem em mim.

Por fim, quero evidenciar o afecto que partilho com a cidade de Coimbra. No que toca à Universidade, que a recente nomeação a Património da Unesco Te leve para outros horizontes e, associado ao nome de Coimbra, Te perpetue no tempo.

Objectivos

Este trabalho tem como principal objectivo realizar um estudo de estabilidade das substâncias aparentadas numa solução para perfusão de Metronidazol 5mg/ml, pelo lote de produção G36445. Não dispondo os Laboratórios Basi de um método analítico para proceder à quantificação deste tipo de substâncias, surge a necessidade de promover a sua validação que, segundo a Farmacopeia Europeia, tem de ser concretizada através de HPLC.

Ao mesmo tempo, não existe, também, um método analítico que permita o doseamento da substância activa, o metronidazol. Torna-se então necessário realizar a sua validação de modo a garantir confiança nos dados obtidos. Este método deve ser desenvolvido através de espectroscopia de absorção molecular UV/Vis.

Estando estes dois parâmetros validados, é assim possível verificar a estabilidade do produto acabado, de forma a prever o prazo de validade da solução de Metronidazol. Para tal, recorre-se a três tipos de estudo de estabilidades: em condições de longo-termo, intermédias e aceleradas.

Pretende-se executar, por fim, um estudo de fotoestabilidade do produto acabado por a substância activa ser fotossensível.

Resumo

A Indústria Farmacêutica constitui uma das indústrias mais dinâmicas a nível global. A sua importância e desenvolvimento facilitaram o seu rápido crescimento num curto espaço de tempo, movimentando volumes de negócios na ordem dos milhares de biliões de euros por ano. Com os custos na saúde a crescerem para valores alarmantes, a aposta das entidades governamentais tem recaído sobre os produtos genéricos, visto estes possuírem praticamente a mesma qualidade que os produtos de marca, mas a preços muito mais acessíveis.

A introdução da solução para perfusão de Metronidazol 5mg/ml no mercado por parte dos Laboratórios Basi levou a que fosse realizado um estudo de estabilidade do produto, de forma a fazer uma previsão do seu prazo de validade. Sabendo que a quantificação das substâncias aparentadas deve ser realizada por HPLC, o Laboratório não possuía um método analítico validado para o efeito. A determinação destas substâncias, nomeadamente a impureza A denominada de *2-methyl-4-nitroimidazole*, é importante pois tratam-se de produtos secundários presentes na substância activa do metronidazol que têm a capacidade de se interligar com o seu processo de síntese.

Foi explorada, inicialmente, a noção de como a realização de trabalho analítico para a determinação de parâmetros-chave de um universo em estudo é relevante, na medida em que um analista garante que os seus resultados são reprodutíveis com um elevado grau de confiança. Veio a verificar-se, depois, que todos os critérios de aceitação para a implementação do método são respeitados.

O reconhecimento das substâncias aparentadas fez, inicialmente, levar a cabo um estudo da matéria-prima do metronidazol que viria a ser utilizada para o fabrico do produto acabado; posteriormente, foi realizado um estudo de estabilidade do produto por um período de 12 meses (sob diferentes condições de temperatura, humidade e luz). Ao mesmo tempo, foi analisado o teor de metronidazol na matéria-prima e em todos os tempos de análise, para discutir se existia alguma relação entre as respectivas variações das espécies. Determinou-se que a quantidade de impurezas existe em porções vestigiais e o teor de metronidazol se mantém constante em todo o processo. Assim, existe uma elevada probabilidade do produto se manter inalterado por um período de, pelo menos 36 meses, sendo esta a data de correspondência do seu prazo de validade.

Como já referido, um dos parâmetros de especificação do produto acabado assenta no doseamento do metronidazol, substância activa para o qual também foi necessário realizar a validação de um método analítico. Contudo, este processo já tinha sido realizado pouco antes de este trabalho-investigação ter começado. Independentemente disso procedeu-se à análise deste critério de modo a testar a sua evolução no produto.

A solução de Metronidazol 5mg/ml foi, ainda, sujeita a um ensaio de fotoestabilidade, em condições bem definidas, uma vez que a substância activa é fotossensível. Comparando a

amostra em diferentes tipos de acondicionamento, concluiu-se que o frasco de propileno reúne as condições ideais para “acolher” a solução de metronidazol, ao gerar variações mínimas na quantidade de substâncias aparentadas presentes e mantendo a quantidade de metronidazol quase inalterável.

Abstract

The Pharmaceutical Industry is one of the most dynamic industries globally. Its importance and development facilitated its rapid growth in a short time, moving turnover in the order of thousands of billions of euros per year. With health costs grow to alarming values, the commitment of the government entities have been on generic products, since they possess almost the same quality as the name brand products at much more affordable prices.

The introduction of the infusion solution of 5mg/ml Metronidazole in the market by Basi Laboratories led to it being a study of the stability of the product, in order to provide a shelf life for the product. In the absence of an analytical method for this purpose, we created a root in order to quantify the related substances associated with metronidazole. The determination of these substances, in particular 2-methyl-4-nitroimidazole, is important because these are secondary products present in the active substance of metronidazole which have the ability to interconnect with their synthesis.

Was explored, initially, the notion of how to carry out analytical work to determine key parameters of a universe under study is relevant to the extent that an analyst ensures that the results are reproducible with a high degree of confidence. Turned out that all acceptance criteria for the implementation of the method are respected.

The recognition of these substances did initially carry out a study of the raw material of metronidazole that would be used to manufacture the finished product; later, a study of the stability of the product for a period of 12 months (under different conditions of temperature, humidity and light). At the same time, we analyzed the content of metronidazole in the raw material and all analysis times to discuss whether there was a relationship between the respective variations of species. It is determined that the amount of trace impurities exist in portions of metronidazole and the content remains constant throughout the process. Thus, there is a high probability that the product will remain unaltered for a period of at least 36 months which is the date correspond to the period of validity.

As already mentioned, one of the parameters of finished product specification is based on the determination of metronidazole, active substance for which it was also necessary to carry out the validation of an analytical method. However, this procedure was performed just prior to this work, research has begun. Regardless, we proceeded to the analysis of this criterion in order to test the product in its evolution.

A 5mg/ml solution of metronidazole was also subjected to a test for photostability under conditions well defined, once the active substance has a sensitivity to light sources. Comparing the sample in different types of packaging, it is concluded that the polypropylene bottle meeting the ideal conditions for "host" metronidazole solution, while generating minimal variations in the amount of related substances present and the amount of metronidazole while maintaining almost unchanged.

Lista de Símbolos

AL – Linhas de acção, presentes nas cartas de controlo, possuindo um grau de confiança de 95%

ANOVA – Análise da variância de um dado universo em estudo

Apifarma – Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica

Avd₆ – Solução de referência do teste de opalescência amarelo-esverdeado 6, realizado segundo a Farmacopeia Europeia

b₀ – Ordenada na origem

b₁ – Declive da recta de calibração ou sensibilidade do método

CCD – Detector acoplado carregadamente do inglês *Charge-Coupled Device*

CL – Linha central ou *Central Line*

CQ – Departamento de Controlo e Qualidade

CRM – Material certificado de referência do inglês *Certified Reference Material*

CV – Coeficiente de variação de um conjunto de dados experimentalmente obtidos

DAD – Detector de fotodiodos do inglês *Diode Array Detector*

H₀ – Hipótese nula, assumida por defeito, no caso de testes estatísticos

H₁ – Hipótese alternativa, assumida por defeito, no caso de testes estatísticos

HCl – Ácido clorídrico, espécie química

HPLC – do inglês *High-performance liquid chromatography*

I&D – Investigação e Desenvolvimento

ICEP – Instituto do Comércio Externo de Portugal

ICH – do inglês *International Conference on Harmonisation*

Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

ISO – Organização Internacional de Padronização do inglês *International Organization for Standardization*

nm – abreviatura de nanómetros, correspondente a 10⁻⁹ metros

R² – Coeficiente de correlação que indica o relacionamento linear entre duas variáveis

SRM – Material de referência padrão do inglês *Standart Reference Material*

TV – Valor experimentalmente obtido

UFC – Ensaio de contagem aeróbia de microrganismos dada por unidades formadoras de colónias

UI – Unidade de toxina por unidade internacional respeitante ao ensaio de endotoxinas bacterianas

UV-Vis – Ultravioleta-Visível, região do espectro electromagnético

WL – Linhas de aviso, presentes nas cartas de controlo, possuindo um grau de confiança de 99%

Índice

AGRADECIMENTOS	II
OBJECTIVOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	VIII
INTRODUÇÃO	1
1.1 – A Indústria Farmacêutica	2
1.1.1 – A Indústria Farmacêutica em Portugal	6
1.1.2 – Os Laboratórios Basi	6
1.2 – A Química Analítica	9
1.2.1 – Os Desafios da Actualidade	11
1.2.2 – A Necessidade do Trabalho Analítico	11
1.3 – O Metronidazol	13
1.3.1 - Composição e Especificações	14
1.3.2 – Impurezas Anexas à Substância Activa	16
CONTROLO DA QUALIDADE	19
2.1 – Técnicas Utilizadas	20
2.1.1 – HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	20
2.1.2 – Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis	22
2.2 – Validação Analítica	26
2.2.1 – Especificidade e Selectividade	27
2.2.2 – Linearidade	27
2.2.3 – Precisão	30
2.2.4 – Exactidão	31

2.2.5 – Robustez	32
2.2.6 – Validação Analítica das Substâncias Aparentadas do Metronidazol	32
2.3 – Cartas de Controlo	34
2.4 - Estudos de Estabilidade do Produto	38
2.4.1 - Estabilidade do Metronidazol 5mg/mL	38
2.4.2 – Ensaio de Fotoestabilidade	39
PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1 – Materiais e Equipamentos	41
3.2 – Procedimentos Práticos	44
3.2.1 – Solução Padrão do Metronidazol	44
3.2.2 – Matéria-Prima do Metronidazol	44
3.2.3 - Validação Analítica para as Substâncias Aparentadas do Metronidazol	45
3.2.3.1 - Adequabilidade do sistema	45
3.2.3.2 - Linearidade	45
Preparação das Soluções-Mãe	45
Preparação do Padrão de Controlo	45
Preparação da Curva de Calibração	46
3.2.3.3 - Precisão Intermédia	46
3.2.3.4 – Repetibilidade da Injecção	46
3.2.3.5 – Exactidão	46
Soluções-Placebo	47
3.2.3.6 - Robustez	47
3.2.4 - Doseamento da solução de Metronidazol 5 mg/ml	47
3.2.5 - Ensaio de Estabilidade	48
3.2.6 - Ensaio de Fotoestabilidade	50
3.3 – Procedimentos Estatísticos	53
3.3.1 – Representatividade	53
3.3.2 – Escolha do Modelo	53
3.3.3 – Diagnóstico de Outliers	54
3.3.4 – Análise da Variância (ANOVA)	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 - Metronidazol	57

4.1.1 - Validação Analítica da Curva de Calibração	57
4.1.1.1 - Adequabilidade do sistema	57
4.1.1.2 - Linearidade	58
4.1.1.3 - Repetibilidade de Injecção	63
4.1.1.4 - Precisão Intermédia	64
4.1.1.5 - Exactidão	65
4.1.1.6 - Robustez	66
4.1.1.7 – Análise da Matéria-Prima de Metronidazol	67
4.2 – Solução de Metronidazol 5 mg/ml	69
4.2.1 – Estudo de Estabilidade	69
4.2.1.1 - Condições de Longo-Termo	69
4.2.1.2 - Condições Intermédias	71
4.2.1.3 - Condições Aceleradas	73
4.2.2 - Estudo de Fotoestabilidade	75
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	84
A.1 - Classes de Risco de Solventes Residuais	84
A.2 - Validação do Método Analítico	85
A.2.1 – Escolha do Modelo	85
A.2.2 – Diagnóstico de Outliers	86
A.3 – Padrão Primário do Metronidazol	88

Capítulo 1

Introdução

1.1 – A Indústria Farmacêutica

A Indústria Farmacêutica procura, constantemente e como uma forma de sobrevivência, uma posição exigente relativamente ao seu alargamento e busca de uma posição comercial. A sua presença em mercados concorrenciais constitui uma defesa face às ameaças que os países exportadores fora da União Europeia exercem constantemente.

É, assim, através de um pensamento de *compromisso partilhado* que a Indústria Farmacêutica contribui, não só para a melhoria dos níveis de saúde e respectiva qualidade de vida da população, como para o seu bem-estar e conseqüente desenvolvimento económico. Logo à partida, há a registar o aumento da esperança média de vida, estreitamente ligada aos progressos da ciência e da indústria farmacêutica. Tal facto é verificado pela importância que advém dos produtos desenvolvidos no que se refere à redução da morbilidade/mortalidade e de uma maior eficiência desenvolvida pelos sistemas de saúde [1].

Denota-se, portanto, que o contributo da Indústria Farmacêutica assenta principalmente em dar resposta às expectativas dos doentes, gerando várias possibilidades de tratamento e melhores cuidados de saúde para um conjunto de necessidades que não se encontrem de todo satisfeitas; representar criação de valor para a Economia e sistemas de saúde associados, apresentando soluções sustentadas relativamente aos orçamentos nacionais para a segurança social e cuidados de saúde; e apresentar investimento num sector estratégico, apostando na inovação e gerando emprego qualificado.

Segundo dados já de 2013, pela *European Generic Medicines Association*, o volume de negócios deste tipo de indústria rondava os 1100 biliões de euros (Fig. 1.1). A competição entre as principais multinacionais do sector ajudou a promover uma diferenciação dos produtos, devido à sua grande aposta em I&D (*Investigação e Desenvolvimento*).

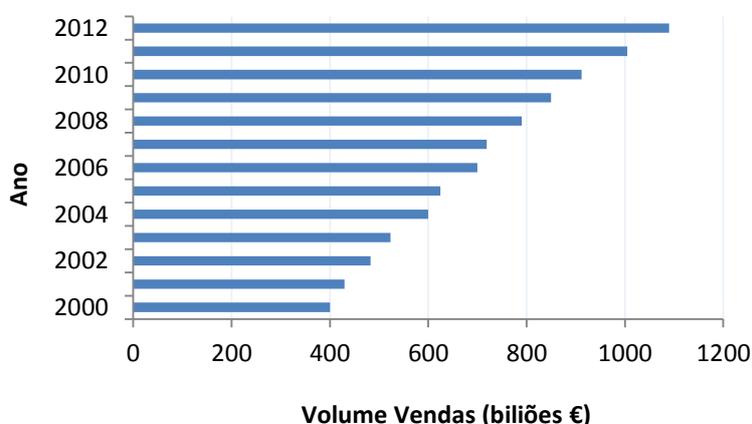


Fig. 1.1 – Vendas globais na indústria farmacêutica; valores em bilhões de euros [2].

Um dos grandes entraves nesta Indústria é o elevado investimento inicial que tem de ser realizado, especialmente para a descoberta de novos fármacos, já que cada empresa tem o direito exclusivo de comercializar os seus ditos medicamentos.

Descreve a revista *Fortune* (2012) que só as 12 maiores empresas da área presentes em todo o mundo representam um volume de negócios de aproximadamente 415 biliões de euros, empregando mais de 800 mil pessoas, conforme dados desse mesmo ano.

Tabela 1.1 – Volume de negócios e lucro líquido em milhões de euros para as 12 maiores indústrias farmacêuticas do mundo [3].

Posição	Empresa	Volume de Negócios	Lucro Líquido em relação a 2010
1	Pfizer	90763,9	13373,0
2	Johnson & Johnson	86886,6	12922,8
3	Merck	64195,6	8380,0
4	Abbott Laboratories	51909,2	6317,6
5	Eli Lilly	32449,2	5809,0
6	Bristol-Myers Squibb	28384,1	4955,6
7	Amgen	20819,1	4920,9
8	Gilead Sciences	11203,7	3745,9
9	Mylan	8190,0	717,2
10	Allergan	7240,5	1248,6
11	Biogen Idec	6745,4	1649,3
12	Celgene	6469,5	1761,2

Existe, no entanto, um crescimento e consolidação das indústrias através de processos de fusão e de aquisições. Estes procedimentos têm contribuído para o fomento e alcance de novos mercados, aumento da capacidade para investir em novos produtos e, por fim, como forma de precaver baixas de volumes de negócios devido ao término da patentes de produtos por si desenvolvidos. É assim uma forma de rapidamente aceder a novas competências, expandindo a carteira de negócios de uma empresa.

Algo que distingue a indústria farmacêutica é o investimento realizado em *I&D*, representando este tipo de indústria quase 17% da investigação realizada só a nível europeu (Fig. 1.2). O grande problema encontra-se na dependência do sucesso das inovações até então desenvolvidas, no facto do processo de *I&D* ser bastante moroso e dispendioso (pelos custos no desenvolvimento de novos fármacos) mas, contudo, de se possuir um elevado risco pelas elevadas taxas de insucesso de desenvolvimentos de medicamentos.

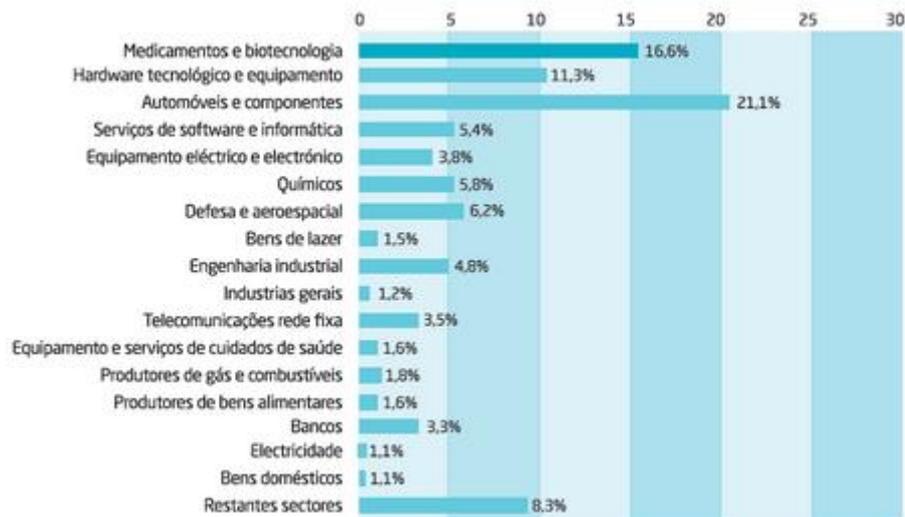


Fig. 1.2 – Investimento em I&D realizado por diferentes sectores na Europa [4], em 2012.

De forma a respeitar a devida qualidade que seus produtos devem conter, é imperativo a indústria farmacêutica ter de respeitar um conjunto de normas e regras, tanto a nível interno como internacional. Assim, principalmente devido ao conjunto de leis e regulamentações que fundamentam o sector, o incremento de novos produtos é longo e complexo em toda a sua abrangência, desde a concepção ao desenvolvimento, passando pela eficácia e terminando na sua qualidade.

Por outro lado, os custos com saúde têm crescido de uma forma excepcional e não se prevê um abrandamento nas próximas décadas [5]. Como principal efeito causador está o envelhecimento da população. Pela existência crescente, pelas razões entretanto apontadas, de um maior número de idosos em todo o mundo ocidental, parte dos próprios governos querem alterar as regras de forma a tornar menos pesada os encargos que cada nação possui com as indústrias farmacêuticas. É então que surge o uso de medicamentos genéricos como uma solução.

Estes têm a grande vantagem de possuir um custo inferior, que pode ir dos 20% aos 90%, relativamente aos produtos de marca. Este tipo de produtos é produzido aquando do fim das patentes sobre os medicamentos de marca existentes, sendo-lhes conferido um elevado grau de segurança, fiabilidade e eficácia.

Fig. 1.3 – Percentagem da quota de mercado dos genéricos na Europa, em valor (azul) e volume (amarelo) [5].

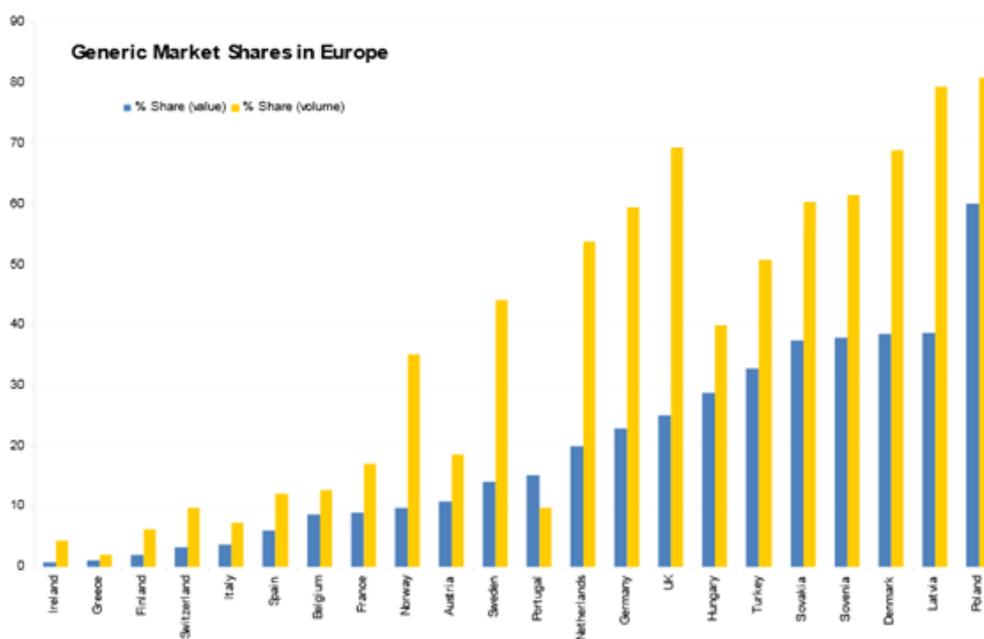


Fig. 1.3 – Percentagem da quota de mercado dos genéricos na Europa, em valor (azul) e volume (amarelo) [5].

Na Fig 1.3 são demonstrados os princípios que já são regidos em alguns países europeus no que toca à utilização de genéricos, sobressaindo o caso Polaco e Letónia. É principalmente a Polónia a que merece real destaque pela quantidade de genéricos adquiridos e gastos. Como é visualizado segundo os dados apresentados, Portugal ainda tem a necessidade de adoptar políticas que incentivem um uso mais generalizado deste tipo de produtos, na medida em que existe um maior investimento neste tipo de artigos que na sua quantidade utilizada.

1.1.1 – A Indústria Farmacêutica em Portugal

Segundo os dados divulgados apresentados pela Apifarma¹, a indústria farmacêutica em Portugal tem revelado um crescimento rápido, tanto a nível interno como externo, nomeadamente à custa de grandes investimentos em equipamentos e recursos para garantir a sua posição no mercado. Existem em Portugal 122 empresas farmacêuticas, importadores ou exportadores de medicamentos (Infarmed², Apifarma, 2012) [6], sendo que já em 2010 o sector abrangia perto de 10 mil empregados.

Verificou-se, contudo, um ligeiro recuo no volume de negócios das empresas farmacêuticas portuguesas da ordem dos 3490 milhões de euros, em 2007, para 3428 milhões de euros, em 2010. Algumas destas firmas uniram-se, entre os quais os Laboratórios Basi, estabelecendo parcerias com o ICEP – Instituto do Comércio Externo de Portugal (já extinto) – a Apifarma e o Infarmed [7], de forma a promover a exportação de medicamentos. Actualmente, o volume de exportações fazem-se sentir, essencialmente, em países de Língua Oficial Portuguesa e alguns países europeus. Desta forma, verifica-se que é possível entrar nestes mercados de forma expressiva, colocando os produtos nacionais em competição com as suas congéneres internacionais.

Pode-se assumir que a vantagem competitiva da indústria farmacêutica nacional pode ser atribuída a um sistema de ensino superior mais forte, a uma força de trabalho abundante e melhor preparada, à presença de empresas em investigação com respectivas indústrias de suporte, à forte procura do mercado interno e, por fim, ao preço relativo dos factores de produção. Tais factores são consequência, directa ou indirectamente, dos respectivos avanços científicos que se verificaram ao longo das últimas décadas, ao facto de a Indústria Farmacêutica possuir um legislação rigorosa e bem regulada [8] para satisfação final do consumidor e às próprias necessidades sociais das populações.

1.1.2 – Os Laboratórios Basi

Os Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A., foram fundados em 1956 e contam com mais de 50 anos de história no exercício da sua actividade, sendo conhecidos pelo seu

¹ Apifarma – Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica [www.apifarma.pt].

² Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. [www.infarmed.pt]

dinamismo e diferenciação na capacidade de oferecer soluções terapêuticas de alto nível de qualidade, inovação e segurança. Trata-se de uma empresa de capitais privados consolidada no mercado nacional e, ao longo das últimas décadas, no mercado de exportação.

Inicialmente sediada em Coimbra ampliou, a título provisório em 2010, as suas instalações na zona Industrial de Mortágua com a criação de novos laboratórios de controlo da qualidade, passando em definitivo para esse mesmo espaço pouco tempo depois. Este espaço mais recente é composto por um laboratório físico-químico, um laboratório de microbiologia, uma área destinada à produção de medicamentos e um armazém.

O portfólio dos Basi conta com produtos éticos³, medicamentos não sujeitos a receita médica, dermocosméticos, suplementos alimentares, entre outros. Em 2007 a empresa registou um crescimento acentuado, associado a uma profunda reestruturação organizativa e a uma nova orientação estratégica, que visou, principalmente, o alargamento do seu leque de produtos disponibilizados. Tal feito veio permitir a construção de uma Unidade de Desenvolvimento e Fabrico, com capacidade para produzir cerca de 30 milhões de unidades por ano, dedicando-se então à produção de medicamentos sólidos, semi-sólidos e líquidos não estéreis, entre os quais supositórios, xaropes, pomadas, cremes e géis.

O Laboratório Basi estabeleceu diversas parcerias estratégicas com empresas afins, nomeadamente: FHC (Farmacêutica), Phagecon (Consultoria e Serviços Farmacêuticos), Pharmaportugal e Overpharma (Produtos Médicos e Farmacêuticos Lda.). Possuem licença de funcionamento (Alvará nº 32 de 22 de Fevereiro de 1958) e a autorização de fabrico/importação número F020/S1/H/AF/AI/054/2008 de 16 de Janeiro de 2008. Este último inclui medicamentos de uso humano não estéreis, produtos líquidos para uso interno, semi-sólidos e supositórios. Dentro das operações de fabrico têm ainda autorização de embalagem secundário e de Controlo de Qualidade físico-químico e microbiológico. Relativamente à importação de medicamentos, os Basi possuem autorização de Controlo de Qualidade físico-químico, microbiológico e, adicionalmente, a certificação de lotes destes produtos importados não estéreis.

Os Basi têm uma longa tradição no fabrico para terceiros, principalmente para empresas farmacêuticas que se posicionem na área dos medicamentos genéricos. Ao mesmo tempo, a empresa oferece soluções concretas a vários níveis ao longo da cadeia de valor dos produtos farmacêuticos, incluindo o desenvolvimento de formulações e novos produtos, controlo de qualidade e estudos de estabilidade, fabrico e suporte regulamentar. Assim, existem dois tipos de serviços que suportam todo um objectivo em comum: o departamento de controlo e qualidade e o de desenvolvimento farmacêutico.

³ Medicamentos Éticos – Medicamentos de referência para os quais é requerida a prescrição médica para venda.

O departamento de controlo de qualidade está equipado com todos os recursos necessários para realizar qualquer tipo de análise a qualquer tipo de produto, material ou forma farmacêutica. Este é responsável por realizar estudos de estabilidade a tempo real, intermédio e acelerado e fotoestabilidades. Pertencentes ao Controlo e Qualidade dos Laboratórios Basi encontram-se associados dois sub-laboratórios: o laboratório Físico-Químico e o laboratório de Microbiologia. O primeiro possui os equipamentos necessários para realizar qualquer tipo de estudo, incluindo a análise por HPLC (UV-VIS, DAD, índice de refração), cromatografia gasosa com *headspace* acoplado; ensaios de desagregação e dissolução, com colector de fracções e espectrofotómetro associado; espectroscopia de UV-VIS e de infravermelho, e equipamentos potenciométricos. Já o segundo está equipado com os recursos necessários para realizar qualquer tipo de ensaio a formas farmacêuticas estéreis e não estéreis, incluindo ensaios de esterilidade, ensaios de endotoxinas, contagem de microrganismos aeróbios viáveis totais, contagem de fungos e leveduras, pesquisa de microrganismos específicos, testes de eficácia de conservantes, entre outros.

O outro sector referenciado gira em torno do desenvolvimento farmacêutico. A forte aposta na internacionalização exige uma escolha criteriosa no desenvolvimento do portfólio, bem como uma grande capacidade de adaptação às características específicas de cada mercado. A empresa garante um desenvolvimento eficiente de produtos desde a formulação inicial em laboratório até à produção em grande escala. Os processos de desenvolvimento e produção são totalmente integrados. O departamento de desenvolvimento farmacêutico actua activamente nas áreas das novas formulações e desenvolvimento de produtos, no desenvolvimento de técnicas para a melhoria dos processos de fabrico e na transferência de tecnologia e aumento de escala de produção.

Os Laboratórios Basi investem continuamente em *I&D*, promovendo a colaboração com Universidades e Institutos, garantindo que os clientes beneficiam das últimas técnicas e desenvolvimentos científicos.

A missão dos Laboratórios Basi é a de fornecer às pessoas soluções terapêuticas ajustadas às suas necessidades, ao melhor preço possível, com a garantia de excelência de décadas de actividade. Para tal, têm implementado um sistema de gestão de qualidade conforme as normas ISO 9001, que permite uma melhoria contínua de processos, garantia de bons serviços e resposta às exigências da população. Este sistema de gestão de qualidade é diariamente acompanhado pelo Responsável de Gestão da Qualidade do Departamento de Garantia da Qualidade.

1.2 – A Química Analítica

A Química Analítica é uma ciência que trata um conjunto de processos, qualitativa e quantitativamente, de modo a identificar ou quantificar uma dada substância ou os respectivos componentes de uma solução ou, ainda, permite determinar a estrutura de compostos químicos. Trata-se de um ramo multifacetado da Química que se diferencia entre métodos clássicos e instrumentais, ou seja, assume-se como um ramo intermediário entre estudos científicos e técnicos que mutuamente beneficiam de determinadas abordagens e respectivos efeitos sinérgicos (Fig. 1.4).

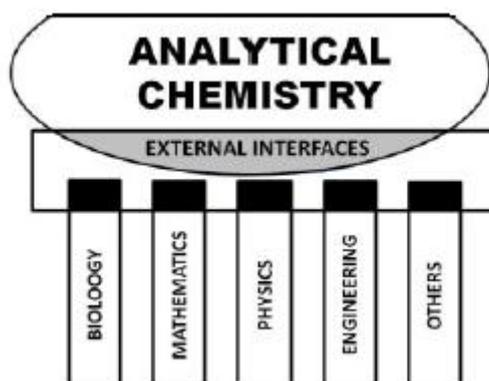


Fig- 1.4 – A Química Analítica como um âmbito multidisciplinar [9].

M. Valcárcel refere-se à Química analítica como “a disciplina científica responsável pela criação/desenvolvimento de métodos, instrumentos e estratégias para obter informação sobre a composição e natureza da matéria, no espaço e no tempo”. Trata-se de uma definição convencional, que entretanto foi reformulada, estando a Química no centro de quatro componentes (Análise, Teoria, Síntese e Aplicação) (Fig. 1.5). A estratégia da Química Analítica surge com uma disciplina de informação, tão importante e essencial para uma sociedade moderna. Como tal, suporta os seus próprios fundamentos e baseia-se nas fundações de outras áreas científicas, como a Matemática, a Física, a Biologia ou as Ciência da Computação.

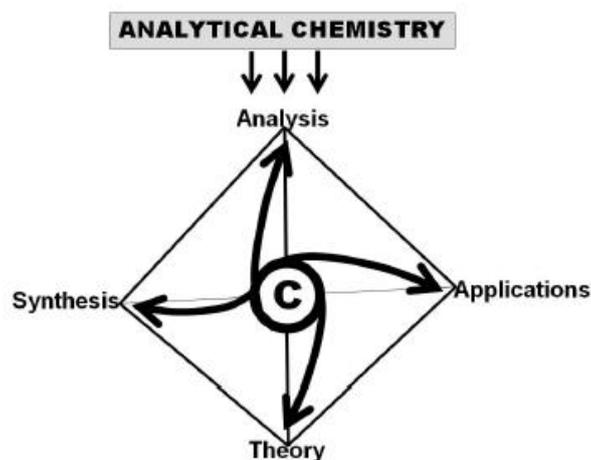


Fig. 1.5 – A Química Analítica como responsável pela análise, um componente essencial em adição à teoria, síntese e aplicações nas mais diversas áreas [10].

A Química Analítica evoluiu de uma forma notória nas últimas décadas, tornando-se um ramo activo, mas mudou mais acentuadamente a forma como a disciplina é vista relativamente às suas metas e objectivos, à sua noção mais ampla a referências básicas ou até à definição dos resultados das actividades de investigação e desenvolvimento. Na Fig. 1.6 são visualizados os principais objectivos e propósitos da Química Analítica no contexto científico, fazendo com que o conceito de Química Analítica descrito anteriormente seja coerente.

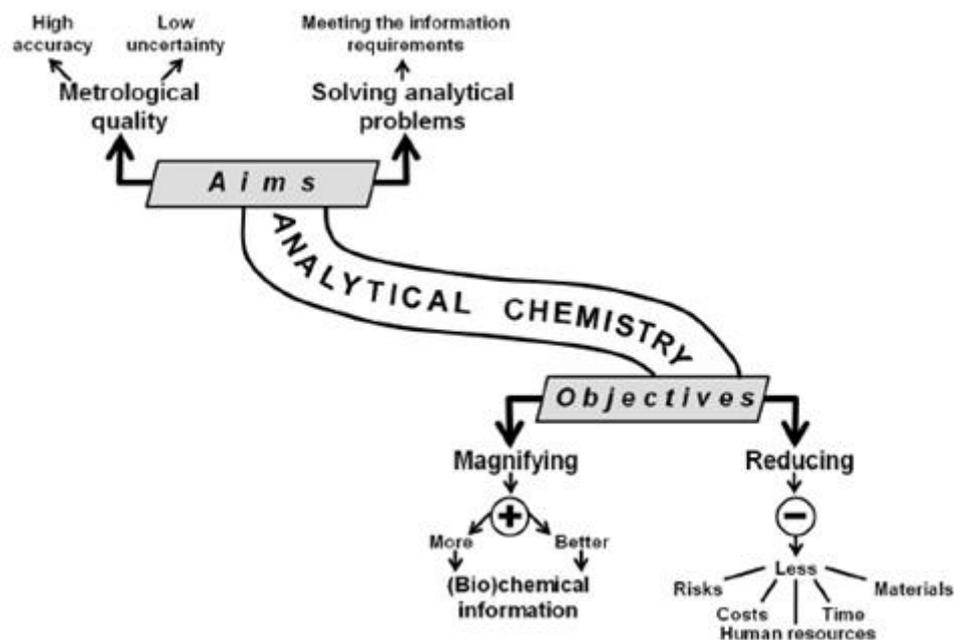


Fig. 1.6 – Metas e objectivos propostos pela Química Analítica [10].

Este ramo da Química assume dois tipos de metas: o de possuir a mais elevada qualidade metrológica, ou seja, de ter a mais elevada confiança nos resultados produzidos com

a mínima incerteza possível, e o de resolver problemas analíticos derivados de informação química. Da mesma forma, denotam-se dois objectivos principais: o de aumentar a quantidade de informação disponível de grande qualidade reduzindo, ao mesmo tempo, a quantidade de materiais usados (amostras ou reagentes), tempo ou recursos.

1.2.1 – Os Desafios da Actualidade

Tal como em qualquer ciência nada é imutável, o mesmo se passa em torno da Química Analítica. Num mundo em constante mudança, as suas metas e objectivos devem constituir meios que facilitem o desenvolvimento de novos métodos analíticos e o melhoramento dos já existentes. Alguns dos principais desafios assentam em:

i. Obtenção de informação a partir de objectos/sistemas que possuem dimensões bastante diferentes do mundo macroscópico. No caso em particular do universo *nano*, a necessidade de se estudar sistemas com esta ordem de grandeza implica um conjunto de aproximações multidisciplinares, entre as quais de ordem física, química e biológica. A extracção de informação precisa de um sistema do *espaço exterior* também representa um desafio devido à utilização de instrumentos de pequenas dimensões e que necessitem de pouca manutenção e energia. Actualmente já existem alguns tipos de escolha, entre os quais aparelhagem que analisa “pó cósmico” por pequenos espectrómetros de massa e de raios-X [11], análises realizadas por robots que operam noutros planetas [12] e realizam a monitorização das atmosferas (interna e externa) das naves [13];

ii. Deixar de confinar a análise química às fronteiras de um laboratório. A quantidade de análises realizadas de forma *in situ* ainda é demasiado pequena, no qual a comunidade de químicos analistas deve apostar na concepção e controlo de procedimentos de amostragem ou na interpretação e discussão de resultados analíticos. Outro sector, que representa o maior desafio, assenta no desenvolvimento de sensores que apresentam uma elevada robustez e confiança sobre um variado leque de analitos numa variedade de tipos de amostra [14].

1.2.2 – A Necessidade do Trabalho Analítico

Uma realidade é que, de uma forma ou de outra, a *medida* sendo vista como uma grandeza física (tudo aquilo que é passível de ser medido ou calculado – tempo, comprimento, velocidade, etc.) afecta todo o nosso quotidiano, estando sempre presente a níveis físicos, químicos ou até biológicos, tratando-se de um pilar na sociedade moderna. Tal evidência é geralmente contextualizada como a quantidade de chuva ácida que afecta os cursos de água está dependente de medidas analíticas, por exemplo, ou na forma em como as trocas comerciais internas/externas são sustentadas em resultados analíticos [15].

Tanto nos casos apresentados ou em tantas outras circunstâncias, é óbvio que é necessário conhecer a resposta correcta para uma determinada situação, tal como é essencial que o analista se assegure em apresentar resultados concretos, rastreáveis e reproduzíveis da amostra representativa do universo que estuda.

De um resultado analítico sob um dado produto advém um determinado impacto económico e social. No caso de se vir a verificar a existência de uma *análise errada*, gera-se uma sensação de falsa conclusão que pode ter consequências graves. Assim, a presença de erros nos resultados comporta custos elevados, a níveis de financeiro e de recursos, e existe a perda de confiança na validação de futuros procedimentos analíticos colocando a existência do laboratório em causa em risco, entre outros.

Quaisquer que sejam os motivos, maus resultados analíticos podem ter implicações drásticas na saúde ou na subsistência de milhões de pessoas. Contudo, com a crescente liberalização do comércio mundial, há pressão para eliminar a replicação do esforço em produtos-teste que transitam através das fronteiras nacionais, significando que os resultados analíticos quantitativos devem ser aceitáveis para todos os potenciais utilizadores, encontrem-se eles dentro ou fora da organização ou do país a gerá-los.

1.3 – O Metronidazol

O composto em estudo nesta investigação é o *2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etanol* (Fig. 1.7), também conhecido por metronidazol, uma substância terapêutica usada na indústria farmacêutica sobre a forma de uma solução para perfusão. O seu princípio activo actua sobre infecções anaeróbias (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Clostridium*) ou infecções causadas por protozoários anaeróbios (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* e *Balantidium coli*). A sua função consiste em interferir com as cadeias de ADN (ácido desoxirribonucleico) das respectivas bactérias/protozoários, levando-as à sua consequente morte.

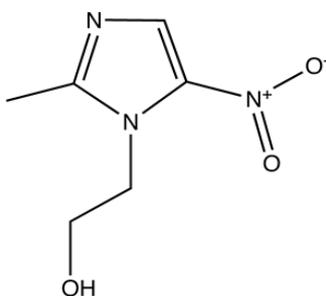


Fig. 1.7 – Estrutura química do composto de metronidazol.

Apresentando-se na forma de uma solução, é um produto comercializado pelos Laboratórios Basi que possui uma concentração de 5mg/mL (Fig. 1.8). A sua aparência é límpida e não tem cor ou então ostenta uma ligeira coloração amarelada, é estéril e livre de quaisquer tipos endotoxinas, sendo que a respectiva substância activa apresenta sensibilidade à luz (segundo a Farmacopeia Europeia) [16]. É administrada de forma intravenosa.



Fig. 1.8 – Solução para perfusão⁴ de Metronidazol 5mg/ml, salientando o pormenor da cápsula de alumínio e da tampa *flip-flop*.

Contudo, algumas advertências estão associadas ao respectivo produto acabado. Entre os principais aspectos, salientam-se a combinação do Metronidazol com a ingestão de álcool – gerador possível de náuseas, vómitos ou alteração do paladar – insuficiência hepática e risco de neuropatia periférica.

1.3.1 - Composição e Especificações

A composição da solução de Metronidazol 5mg/mL é formada pela respectiva substância activa, por agentes isotónicos e de protecção e, por fim, pelo solvente (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Composição da solução para perfusão do Metronidazol 5mg/mL.

Composição	Função
Metronidazol	Substância Activa
Fosfato Dissódico Dihidratado	Agente de Protecção
Ácido Cítrico Monohidratado	
Cloreto de Sódio	Agente Isotónico
Água para injeção	Solvente

⁴ Solução para perfusão – introdução lenta e contínua da substância farmacêutica de forma intravenosa.

Para se chegar à solução de perfusão do Metronidazol é necessário, primeiro, assegurar que as matérias-primas necessárias para a obtenção do produto sejam analisadas e, como tal, verificadas. Proceder-se, então e de acordo com a *Farmacopeia Europeia* (que possui as linhas gerais e actualizadas de todos os procedimentos analíticos a desenvolver), ao estudo individual de cada reagente para verificar se cada qual se encontra dentro das respectivas especificações.

A análise individual de cada matéria-prima é registada num boletim ou certificado de análise contendo todas as características proeminentes. Assim, o estudo de cada produto investiga, por exemplo e de uma forma muito generalizada, a aparência do produto, o seu teor de água, o doseamento do produto, pH, condutividade e a presença de um conjunto de espécies (sulfatos, nitratos, nitritos, brometos, metais pesados, entre outros).

Inicialmente, a matéria-prima é analisada segundo um conjunto de parâmetros aos quais deve respeitar (Tabela 1.3). Após a devida análise, verifica-se se os parâmetros estão conformes e, como tal, se a matéria-prima se encontra à disposição para ser utilizada no fabrico do produto acabado.

Tabela 1.3 – Parâmetros e respectivas especificações da matéria-prima do Metronidazol S.A..

Parâmetro		Especificação
Descrição */**		Pó cristalino, branco ou amarelado
Solubilidade		Pouco solúvel em água, acetona, álcool e em cloreto de metileno
Aspecto da solução */**		A solução não é mais opalescente que a suspensão referência II e não mais corada que a solução de referência Avd ₅
Identificação do Metronidazol *		Infravermelho
Substâncias Relacionadas */**	Qualquer Impureza	≤ 0,1%
	Total de Impurezas	≤ 0,2%
Metais Pesados		≤ 20 ppm
Perda por Secagem */**		≤ 0,5%
Cinzas Sulfúricas		≤ 0,1%
Doseamento */**		99,0 - 101,0%
Contaminação Microbiana **		Contagem total aeróbia ≤ 2*10 ³ UFC / g
		Fungos e leveduras ≤ 2*10 ² UFC / g
Endotoxinas Bacterianas */**		≤ 0,33 UI/mg

* - Análise Reduzida; ** - Reanálise;

Avd₅: Sol. Referência de opalescência amarelo-esverdeada 6 (Farmacopeia Europeia);

UFC: Unidades formadoras de colónias;

UI: unidade de toxina por unidade internacional.

Tal como as matérias-primas, também o produto acabado está sujeito a verificações que coincidem com as especificações do mesmo. No caso do produto acabado – solução de

Metronidazol 5mg/mL para perfusão – os requisitos que lhe estão associados encontram-se descritos na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Ensaio a realizar para o Metronidazol 5mg/ml.

Ensaio a Realizar		Especificação
Descrição do Acondicionamento		Frasco de propiileno, com rolha de borracha e cápsula de alumínio, com tampa <i>flip-flop</i> de cor branca
Volume Extraível		≥ valor nominal
Aspecto da solução		Solução límpida e incolor ou ligeiramente amarelada
Identificação do Metronidazol		Positiva
Densidade		≈ 1,0045 g/mL
pH		4,5 - 6,0
Substâncias Relacionadas	Impureza A	≤ 0,1%
	Impurezas Desconhecidas	≤ 0,5%
	Total de impurezas	≤ 1,0%
Nitritos		≤ 40 ppm
Doseamento da Substância Activa		4,75 - 5,5 g/L (95,0 - 105,0%)
Partículas não Visíveis		Partículas ≥10µm: ≤6000/frasco
		Partículas ≥25µm: ≤600/frasco
Esterilidade		O produto deve ser estéril
Endotoxinas Bacterianas		≤ 3,5 UI/mL

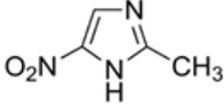
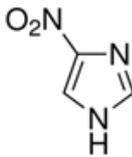
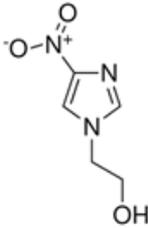
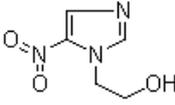
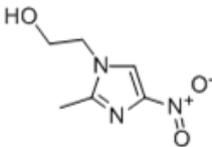
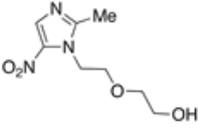
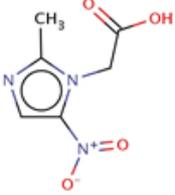
1.3.2 – Impurezas Anexas à Substância Activa

Segundo as linhas orientadoras da ICH, as impurezas devem ser controladas em qualquer matéria-prima que seja utilizada no fabrico ou na síntese de um produto e comunicadas, sempre que necessário quando existam nas respectivas matérias-primas, produto formado durante a ocorrência do processo de síntese, em reagentes ou solventes residuais ou na degradação dos produtos gerados [17].

Já sendo conhecidos os perfis das impurezas da substância activa e do produto final, da experiência com este fabrico sabe-se que não existem diferenças de relevo a salientar. Assim, a descrição das impurezas para a solução de perfusão do Metronidazol 5mg/mL é baseado no conteúdo de contaminantes descrito para a substância activa.

A substância activa do metronidazol é um composto muito estável na sua forma farmacêutica. Contudo, a Farmacopeia Europeia refere que sejam descritas as impurezas que estejam potencialmente presentes, de forma individual. Tal facto é demonstrado na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Impurezas associadas ao Metronidazol.

Impureza	Nome	Fórmula Estrutural
A	<i>2-methyl-4-nitroimidazole</i>	
B	4-nitroimidazole	
C	<i>2-(4-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol</i>	
D	<i>2-(5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol</i>	
E	<i>2-(2-methyl-4-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol</i>	
F	<i>2-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethoxy]ethanol</i>	
G	<i>2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetic acid</i>	

A impureza A, denominada de *2-methyl-4-nitroimidazole*, trata-se de um produto secundário formado que tem a capacidade de se interligar com o processo químico de síntese

da substância activa, sendo identificada no metronidazol. Para tal, é utilizada a técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) como procedimento analítico para determinar as impurezas da substância activa e no respectivo produto acabado.

Pode existir, no entanto, outro tipo de impurezas a partir dos chamados *resíduos de solventes*. Os solventes utilizados durante o processo de síntese são susceptíveis à formação de solventes residuais no produto final que se classificam como químicos orgânicos voláteis, fazendo com que os solventes não sejam completamente removidos. Este é um factor crítico durante a síntese de um dado composto, na medida em que o solvente se pode assumir como um parâmetro que tem impacto directo na solubilidade, pureza e forma cristalina do produto em estudo. O objectivo encontra-se em remover todos os tipos de *solventes orgânicos* que possam estar presentes, visto não possuírem nenhum tipo de benefício terapêutico.

De acordo com as directrizes da ICH, "*Impurities: Guidelines Residual Solvents - Q3C (R5)*" [18] e "*Good Manufacturing Practice Guide For Active Pharmaceutical Ingredients*" [19], os solventes que se encontram presentes na síntese de Metronidazol são classificados de acordo com o risco que apresentam para a saúde humana (ver Anexos A.1).

Neste caso, foi utilizado o ácido fórmico que leva à formação de um solvente residual, avaliado como pertencendo à Classe 3. No que toca ao seu risco associado, o ácido fórmico é um solvente que contém um baixo potencial tóxico. Os solventes com estas características particulares são analisados de acordo com procedimentos internos devidamente validados, levando-nos a concluir que os resultados obtidos estão abaixo dos limites máximos de concentração permitidos.

Durante o processo de fabrico da Metronidazol 5mg/mL para perfusão não existe adição de qualquer solvente orgânico. O mesmo acontece durante o fabrico dos excipientes, onde não são utilizados solventes residuais. Desta forma, os níveis dos solventes estarão sempre abaixo dos limites de concentração estabelecidos pelas Classes de risco (1, 2 e 3), fazendo com que o parâmetro "solventes residuais" seja considerado como desnecessário na apresentação das especificações do produto acabado.

Na documentação final do produto acabado, deve estar contida a documentação proveniente das entidades produtoras das matérias-primas (utilizadas durante todo o processo), relatando o facto de não terem sido utilizados quaisquer tipo de solventes orgânicos durante o respectivo processo de fabrico.

Capítulo 2

Controlo da Qualidade

2.1 – Técnicas Utilizadas

A identificação das substâncias relacionadas presentes, bem como o conhecimento da forma como estas variam nas condições de estabilidade e de fotoestabilidade, são factores importantes para uma avaliação do grau de degradação do Metronidazol enquanto substância activa e para averiguar como evoluem a presença das respectivas impurezas associadas.

Por HPLC realizaram-se a separação dos componentes e a respectiva identificação e quantificação dos analitos.

. Assim, procedeu-se à quantificação das substâncias aparentadas por este modo.

A técnica de UV-Vis é utilizada para avaliar a quantificação de metronidazol, visto ter sido implementado um método analítico para tal através desta técnica.

Neste subcapítulo irão ser descritos os métodos utilizados no decorrer deste projecto laboratorial: a técnica de HPLC e a espectroscopia de absorção molecular no UV-Visível.

2.1.1 – HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida dita de elevado desempenho, também conhecida como HPLC⁵, tornou-se um pilar essencial para a obtenção de resultados analíticos num laboratório, sendo usado de forma intensiva na indústria farmacêutica, e tendo como principal objectivo o de acelerar o processo de cromatografia líquida clássica.

Trata-se, no fundo, de uma técnica de separação de componentes de uma mistura através de um conjunto de interacções de ocorrem entre a fase móvel, no qual está incluída a amostra para análise, e a fase estacionária. Os métodos cromatográficos classificam-se de acordo com a natureza das fases móvel e estacionária, os seus respectivos estados físicos e mecanismos de separação [20].

O sistema de HPLC é caracterizado por possuir bombas de alta pressão de forma que a separação seja mais rápida, possui colunas que são reutilizáveis apresentando uma boa separação das espécies em estudo e permite um melhor controlo de todo o processo, gerando resultados mais precisos e reprodutíveis. O seu uso intensivo deve-se à elevada sensibilidade que possui, é apropriado para espécies não voláteis ou termicamente susceptíveis e é de acessível manuseamento. Além do nível de automação que apresenta, tem ainda as vantagens de usar pequenos volumes de fase móvel, bem como menores quantidades de analito.

⁵ HPLC – do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*.

Um esquema representativo de um sistema HPLC encontra-se descrito na Fig. 2.1. Inicialmente existe um conjunto de reservatórios que constituem a fase móvel. A bomba tem a função de bombear a fase móvel segundo um fluxo constante para a coluna cromatográfica, local onde ocorrem as separações dos vários componentes. O detector gera uma resposta que irá permitir observar o sinal gerado de cada componente através de um cromatograma, sinal esse representativo da intensidade relativa em função do tempo de análise.

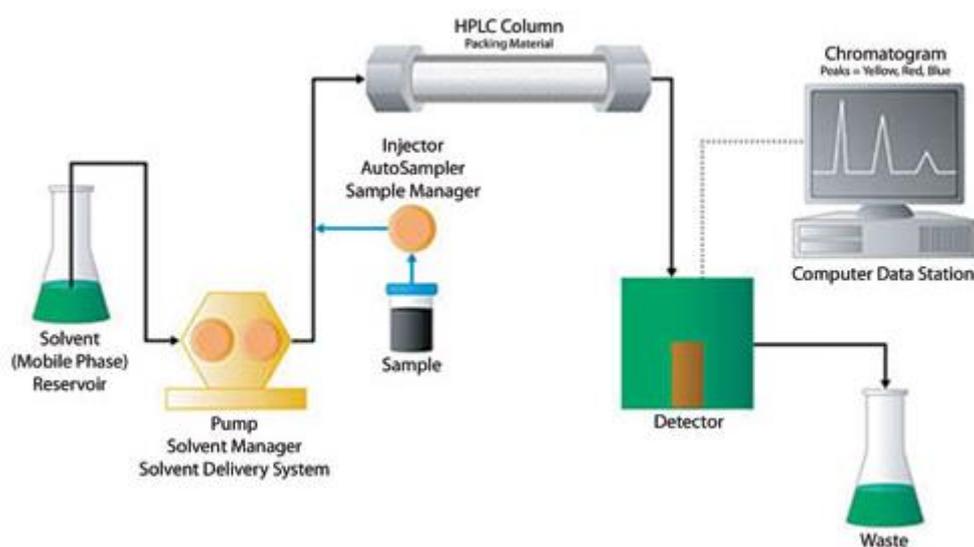


Fig. 2.1 – Esquema da instrumentação de HPLC [21].

As bombas utilizadas em HPLC geram elevadas pressões (até aproximadamente 400 bar), possui uma vazão de 0,1 a 10mL/min e apresentam uma resistência elevada relativa à corrosão efectuada por uma grande variedade de solventes.

É nas colunas cromatográficas que reside a obra-prima deste sistema [22]. A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que tem capacidade de resistir a todas as pressões que nela vão ser usadas. O material do enchimento da coluna é constituído por partículas de dimensões muito pequenas (na ordem dos 3-10 μm) proporcionando uma elevada área de superfície que confere grande eficiência na separação de compostos. A sílica gel é o material mais usado como fase estacionária ou como suporte no qual é fixado a fase estacionária. Neste ponto, de acordo com as características experimentais, o sistema de HPLC é classificado como um processo de cromatografia de fase normal ou de fase reversa.

Na cromatografia de fase normal é usado uma fase móvel que é apolar e uma fase estacionária que é polar. É um método que consiste na adsorção/dessorção do analito, onde o soluto está apenas em contacto superficial com a fase estacionária e não totalmente “contido” nela. Contrariamente, o tipo de cromatografia mais utilizado é a de fase reversa na qual a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, sendo o princípio de retenção a hidrofobicidade, em que a separação deve-se essencialmente a interacções entre a parte não-polar do soluto e

a fase estacionária. A Tabela 2.1 apresenta em resumo das separações com base na polaridade.

Tabela 2.1 – Características das fases para separações baseadas na polaridade.

Modo de Separação	Fase Estacionária (partículas)	Fase Móvel (solvente)
Fase normal	Polar	Apolar
Fase reversa	Apolar	Polar

Ao longo da eluição cromatográfica pode existir uma alteração gradual da composição da fase móvel, por aumento ou diminuição de percentagem de solvente orgânico. Fala-se, então, de uma eluição em gradiente. Nas situações em que a composição da fase móvel se mantém constante durante toda a análise, o tipo de eluição é conhecido como sendo isocrático.

Os detectores ideais para HPLC compreendem um conjunto de requisitos: elevada sensibilidade, uma resposta específica e rápida, possuir uma ligação curta e directa entre o detector e a coluna apresentar estabilidade e reprodutividade suficientes do sinal. Os detectores mais empregues são os de fotodiodos, que proporcionam um espectro de UV-Vis da eluição dos constituintes numa dada gama de comprimentos de onda. A geração de cromatogramas contribui de forma significativa para a identificação de um constituinte para um determinado pico. Existe ainda um leque de detectores também muito utilizados, entre os quais os de índice de refacção, transformadas de Fourier, de fluorescência, entre outros.

Os resultados obtidos são gerados em cromatogramas. Através destes, existe um conjunto de informação pertinente que pode ser recolhida. Uma boa resolução corresponde a uma separação satisfatória dos picos experimentais dos analitos. Cada pico possui um determinado tempo de retenção, tempo em que o soluto fica retido na fase estacionária, uma dada área e respectiva largura, dependentes de um conjunto de factores como o efeito de percursos múltiplos da fase móvel na coluna, comprimento e número de pratos teóricos da coluna, entre outros.

Um sistema de HPLC possui, assim, largas vantagens. Contudo, é um sistema complexo e que comporta elevados custos. Apresenta uma baixa sensibilidade para alguns compostos devido à velocidade do processo, e não detecta compostos adsorvidos.

2.1.2 – Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis

A espectroscopia de absorção molecular envolve absorção de luz UV-Visível por uma molécula. Utiliza uma faixa muito restrita de radiação electromagnética com comprimentos de onda (λ) situados entre 200 a 800 nm, envolvendo as regiões do UV próximo (200 a 400 nm) e a região visível (400 a 800 nm). Este tipo de radiação envolve energias electromagnéticas

adequadas para promover transições electrónicas e vibracionais das moléculas que absorvem essa radiação.

A análise prática corresponde em fazer atravessar um feixe de radiação electromagnética passa através de uma solução, onde grande parte da radiação é transmitida sem perda de intensidade. Contudo, a determinadas frequências a intensidade da radiação é atenuada, no qual a substância em estudo absorveu radiação. Um espectrofotómetro é, então, um aparelho que ao fazer passar um feixe de luz monocromática ou policromática através de uma solução, mede a quantidade de luz que foi absorvida. Trata-se, portanto, de uma técnica de excitação necessária para ocorrer transição entre orbitais moleculares [23] (Fig. 2.2). O resultado permite-nos chegar à conclusão de que quantidade de luz foi absorvida a cada comprimento de onda.

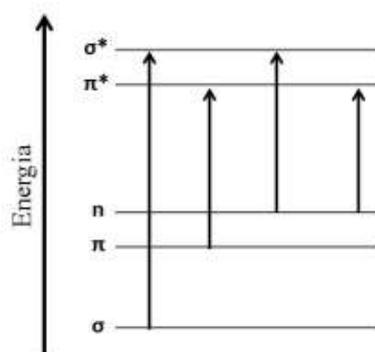


Fig. 2.2 – Diagrama das transições electrónicas das moléculas [24].

Na espectroscopia de absorção molecular, a energia total de uma molécula compreende um conjunto de energias: translacional (movimento de translação das moléculas ao longo do seu eixo), rotacional (rotação das moléculas em torno do seu centro de massa), vibracional (vibração dos átomos dentro da molécula, em torno das suas posições de equilíbrio), electrónica (distribuição dos electrões em torno dos núcleos dos átomos), nuclear (transições entre os níveis de energia do núcleo quando colocado num campo magnético) e de spin (momento angular de spin dos átomos). Uma vez que as moléculas possuem estes tipos de energia, o que se observa no espectro não é uma linha de absorção⁶ nítida, mas sim uma banda de absorção⁷.

Os electrões distribuem-se pelas orbitais moleculares ligantes⁸ e não-ligantes⁹ e possuem diferentes valores de energia. Para as moléculas mais simples, os electrões ocupam

⁶ Linha de absorção – linhas correspondentes à absorção de radiação para um dado comprimento de onda.

⁷ Banda de absorção – bandas que resultam da sobreposição dos sinais referentes às energias associadas à molécula em estudo.

⁸ Orbital ligante – combinação simétrica numa orbital de menor energia e maior estabilidade que as orbitais atómicas.

⁹ Orbitais não-ligantes – orbitais que não se sobrepõem em virtude de não apresentarem uma simetria apropriada.

as orbitais ligantes σ e π (de menor energia) e as orbitais não-ligantes n , sendo as orbitais anti-ligantes¹⁰ σ^* e π^* (de energia superior) as que normalmente se encontram desocupadas.

Assim, podem então ocorrer quatro tipos de transições electrónicas:

✓ As transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ocorrem em compostos hidrocarbonetos saturados que apenas possuem ligações σ e necessitam de uma diferença de energia muito grande, a rondar os $\lambda < 180$ nm, dando origem a bandas no UV muito difíceis de detectar.

✓ As transições $n \rightarrow \sigma^*$ ocorrem em compostos hidrocarbonetos saturados que contêm electrões não-ligantes, como o oxigénio, situando-se entre $150 \text{ nm} < \lambda < 250$ nm, dando origem a bandas no UV ainda numa zona de difícil análise.

✓ As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem em compostos que contenham ligações múltiplas isoladas, envolvendo absorvidades molares extremamente elevadas, nos quais as suas bandas encontram-se no UV próximo.

✓ As transições $n \rightarrow \pi^*$ ocorrem em compostos que possuam oxigénio, azoto ou halogéneos e uma ligação múltipla ou um anel aromático. As suas bandas de absorção encontram-se no UV próximo e visível, sendo facilmente detectadas.

A instrumentação em espectroscopia de absorção molecular pode ser descrita segundo o esquema da Fig. 2.3.

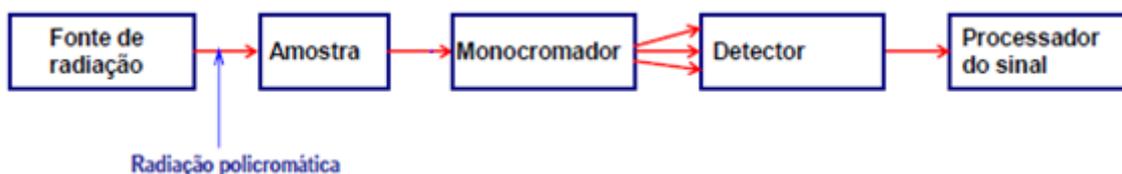


Fig. 2.3 – Esquema da instrumentação para um espectrofotómetro de absorção molecular UV/Vis.

Existem dois tipos de fonte de radiação, entre os quais fontes de energia químicas ou térmicas, sendo os últimos o género mais utilizado. Estes podem ser de chama ou de plasma, gerando temperaturas na ordem dos 2000-10000K [25]. As mais usadas são as lâmpadas de tungsténio, para a região do visível, ou de hidrogénio/deutério, para a região do ultravioleta.

A função do monocromador é isolar totalmente a linha espectral desejada, evitando que outras linhas alcancem o detector. Existem dois tipos de monocromadores: de prisma ou com rede de difracção (Fig. 2.4).

¹⁰ Orbital anti-ligante - combinação antissimétrica numa orbital de maior energia e menor estabilidade que as orbitais atómicas.

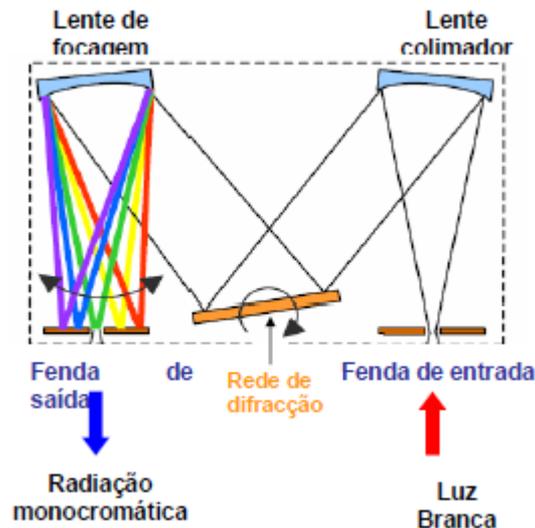


Fig. 2.4 – Monocromador de rede de difracção [26].

De todos os detectores, a matriz de Fotodiodos (*Diode Array Detector*, DAD) é o mais usado. Primeiro, porque permite o melhor comprimento de onda a ser seleccionado para uma dada análise; depois, as absorvâncias geradas sofrem um racionamento por diversos comprimentos de onda, por forma a verificar se um pico de absorção corresponde apenas a um único composto. Existem outros tipos de detectores, entre os quais os fototubos, o tubo fotomultiplicador ou o dispositivo de carga acoplada (*CCD – Charge-Coupled Device*).

A Lei de Beer-Lambert permite determinar quantitativamente a concentração de substâncias em solução que absorvem radiação, relacionando a absorção de luz com as propriedades do material atravessado por ela (Eq. 2.1). Contudo, esta formulação apresenta alguns tipos de limitações, entre as quais só ser validade para baixas concentrações de analitos. A salientar encontra-se o facto de a elevadas concentrações as partículas do analito não se comportam de forma independente umas das outras, fazendo alterar o valor da absorvidade molar [26].

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon lc \quad (2.1)$$

Onde, A corresponde à absorvância, I_0 à intensidade da radiação incidente, I à intensidade da radiação após atravessar a amostra, c refere-se à concentração da solução em moles por litro, ϵ simboliza o coeficiente da absorvidade molar e l o caminho percorrido pela radiação na célula, em cm.

2.2 – Validação Analítica

Validar um método analítico trata-se de uma actividade crítica no desenvolvimento de produtos. Levantam-se em prol disso um conjunto de questões: quando devemos validar nossos métodos analíticos? Quais os requisitos essenciais para alcançar a validação do método de uma forma que seja compatível em várias jurisdições regulatórias em todo o mundo? Para se proceder à validação de um método analítico é necessário, primeiro, promover uma diferenciação dos respectivos métodos de análise utilizados numa indústria farmacêutica: métodos de triagem e métodos de libertação do produto e de estabilidade.

Os métodos de triagem têm a funcionalidade de promover os processos de pesquisa e de desenvolvimento de um produto. Através de processos automáticos, utiliza um formato de *high-throughput* (também conhecido por alta produtividade) devido aos grandes volumes de amostras que são testadas, não seguindo nenhum tipo de validação, visto não terem a necessidade de passar por um departamento de Controlo da Qualidade (CQ). Torna-se útil, contudo, compreender as capacidades/limitações destes métodos para qualquer tomada de decisões durante o desenvolvimento de um determinado produto. Já os métodos de libertação do produto, e respectiva estabilidade, são para uso num laboratório de CQ para promover análises do produto e formais estudos de estabilidade. O objectivo passa por realizar uma verificação do produto durante o processo, permitindo assim um controlo global das suas condições para garantir a sua qualidade. Existe para qualquer um dos casos, portanto, uma validação desses métodos para demonstrar que os ditos procedimentos possuem um elevado desempenho consoante a orientação regulamentar pela qual o laboratório se encontra abrangido [27].

As boas práticas laboratoriais revelam que um método é desenvolvido para uma determinado propósito, por exemplo para validação de uma substância activa ou produto acabado. Deste modo a validação de métodos, referentes à libertação de produto e de respectivas estabilidades, pode ser considerada como um ponto central no ciclo de vida de um método. Isto, porque justifica a sua utilização em ambientes comerciais por forma a guiar decisões sobre a disposição do produto e dos lotes de estabilidade [28]. Mais, a realização da validação fornece um ponto de transferência de “propriedade” dos métodos da organização no qual foi desenvolvido para uma organização comercial alvo.

No caso desta investigação laboratorial, um dos objectivos passa pela validação do método analítico que permite a quantificação das substâncias aparentadas do metronidazol. A determinação das características do desempenho do método representa apenas uma parte do processo e os critérios de aceitação são baseados no uso intencional do método. A meta encontra-se em descrever as suas características funcionais pelos seus parâmetros de desempenho.

Assim, foram seguidos um conjunto de passos que proporcionam a caracterização de um método analítico para, então, se atingir a dita validação. Tais critérios são descritos nas próximas alíneas.

2.2.1 – Especificidade e Selectividade

A especificidade consiste na capacidade do método responder só e apenas só a um único analito. Pode, contudo, existir interferências devido à presença de outros compostos na matriz da amostra provocando ligeiros desvios; são denominados de erros sistemáticos. Segundo o ICH, *International Conference on Harmonisation*, estes erros são considerados interferentes, podendo ser avaliados sob a forma de erros absoluto ou relativo, ou ao que toca à sua taxa de recuperação.

Um método diz-se selectivo se a resposta gerada for preferencialmente sob um determinado analito, mesmo que existam outras substâncias presentes que tenham de algum modo influência na respectiva matriz da amostra [29].

Através da técnica de HPLC (Secção 2.1.1) são avaliados um conjunto de situações, como a capacidade de resolução ou a eficiência de separação dos compostos da amostra, permitindo distinguir compostos que são estruturalmente semelhantes, que possuam sinais muito próximos ou nos quais exista a contribuição de impurezas.

2.2.2 – Linearidade

Ao se proceder à análise da gama de trabalho do universo em estudo, estamos a limitar o intervalo de concentrações onde o analito apresenta elevada precisão, exactidão e linearidade, definindo assim a gama de trabalho no qual a resposta é linear (Fig. 2.5).

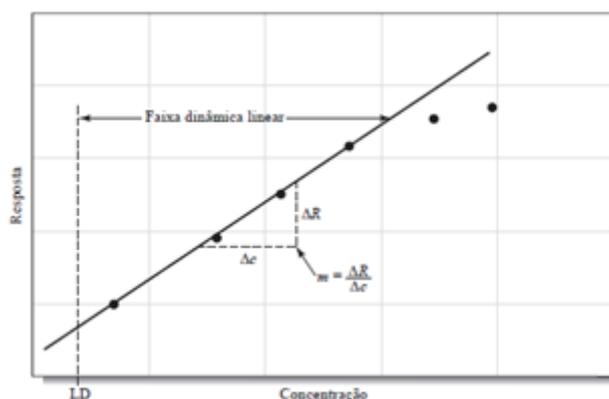


Fig. 2.5 – Caso geral para traçar a curva de calibração e respectiva informação gerada [30].

Conforme a ISO 8466 – calibração e avaliação de métodos analíticos dividido em duas partes (1990 e 2001, respectivamente) – devem ser utilizados 10 padrões para traçar a curva de calibração, juntamente com 10 réplicas de branco do padrão. Neste trabalho foi utilizada como referência os critérios da ICH, onde foram usados pelo menos cinco padrões por forma a conseguir traçar a linearidade da gama de trabalho.

Representando uma linha tendência correspondente aos dados obtidos é possível obter, logo à partida, os limites de detecção e de quantificação do método. O limite de detecção corresponde ao menor valor de concentração do analito que pode ser estatisticamente detectado, mas não quantificado; o limite de quantificação faz uma observação quantitativa daquilo que analisa, devendo o menor padrão ser superior a este limite. Temos, então, a geração de uma resposta instrumental.

A linearidade corresponde, então, à capacidade do procedimento produzir resultados directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, no qual está contemplada a faixa de concentração esperada para o universo em estudo. Uma forma de verificar se a curva de calibração criada cumpre com os requisitos exigidos é através da execução do teste de Mandel [31], por regressão linear.

A equação da recta que relaciona as duas variáveis é dada por:

$$y = b_0 + x \cdot b_1 \quad (2.2)$$

Onde y representa a resposta medida (absorvância, altura/área do pico, etc.), x a concentração do analito, b_0 e b_1 referem-se aos parâmetros da recta de calibração (ordenada na origem e sensibilidade) respectivamente.

A qualidade dos dados gerados para delinear a curva de calibração pode ser realizada por uma de duas vias: pela execução de teste de Mandel ou pela análise da variância através de testes ANOVA.

Simplificando, a execução do teste de Mandel assenta em analisar a representatividade da amostragem, determinando se existe homogeneidade da variância. Posteriormente são comparados dois métodos através de modelação por mínimos quadrados¹¹ – um linear e outro polinomial – para testar a linearidade do conjunto de dados que proporciona um melhor ajuste dos pontos da curva de calibração. Para tal, são analisadas um conjunto de variáveis como a soma dos quadrados¹², o número de graus de liberdade¹³ e a variância do ajuste¹⁴.

¹¹ Modelação dos mínimos quadrados – técnica que procura o melhor ajuste para minimizar a soma dos quadrados entre o valor estimado e os dados observados.

¹² Soma dos quadrados – variabilidade total do conjunto de dados.

Por fim, realiza-se um diagnóstico de *outliers*¹⁵ através da utilização de uma regressão robusta que tem a função de complementar a modelação por mínimos quadrados, na medida em que permite evidenciar valores discrepantes preservando a forma, a dispersão e a simetria dos dados reais; outro factor consiste no caso de permitir uma análise rigorosa aos pontos extremos que possuem influência nos resultados.

A regressão linear tem por objectivo modelar uma dada variável (quantitativa) à custa de outras variáveis que possam depender de várias variáveis, ou seja, que se encontrem dependentes de outros factores. Para este tipo de situações existe uma ferramenta analítica que corresponde à análise da variância através do teste ANOVA. Este tipo de análise permite, através de um teste único, determinar se existem variações entre populações, ao invés do que acontece com o teste *t de Student* onde as comparações têm que ser realizadas directamente, duas a duas [32]. Assim, a análise da variância por este meio torna-se um processo dinâmico na medida em que pode ser alargada a mais que uma variável. O uso da análise ANOVA é assim utilizado para estimar a homogeneidade de uma amostragem e a variância dos valores usados na regressão linear.

A análise da variância possui um pressuposto, no qual todos os dados analisados advêm de uma população normal, sendo as variâncias homogéneas. A sua análise é bastante robusta e tem a vantagem de não ser afectada por desvios moderados do pressuposto anteriormente apresentado. Existem, consoante o número de variáveis ou factores em causa, três tipos de análise da variância mais frequentes através do teste ANOVA: de factor único e de factor duplo sem e com repetição. O teste mais simples através do ANOVA corresponde ao de factor único pois as observações recaem sobre dados grupos classificados apenas por uma variável. Um teste ANOVA de duas vias já usado para conjuntos de dados mais complexos, verificando a compatibilidade que existe entre duas variáveis (por exemplo, analisar os dados gerados por um analista em função do dia de análise). Para ambos os casos a análise é feita por testes de uma via apenas. No caso de não haver repetição, o efeito da interacção consiste no relacionamento entre os dados de cada analista com o dia de análise. Quando existe repetição, o teste ANOVA consiste numa estrutura de medidas repetidas com um efeito de interacção entre si.

¹³ Graus de Liberdade – quantidade de variáveis que estão associadas ao processo.

¹⁴ Variância do ajuste – variância resultante do ajuste dos pontos da curva de calibração.

¹⁵ *Outliers* – Valores discrepantes em relação ao conjunto de dados obtidos.

2.2.3 - Precisão

A precisão é considerada como uma das mais importantes características no desempenho de um método, pois gera uma informação directa ou analista do grau de certeza/incerteza dos seus resultados, estabelecendo uma relação entre réplicas da mesma amostra [33].

A precisão avalia a concordância e proximidade dos resultados sucessivos sobre a mesma amostra em condições similares, isto é, corresponde à menor variação entre os resultados de testes independentes obtidos sob determinadas condições. A medida quantitativa da precisão depende das condições em que são realizadas os ensaios, colocando a *repetibilidade* e *reprodutibilidade* em extremos opostos.

A *repetibilidade* avalia a precisão obtida entre ensaios realizados em condições idênticas (mesmo operador, mesma instrumentação, mesmo laboratório), no menor espaço de tempo possível. O resultado é expresso em termos de coeficiente de variação da repetibilidade, CV, e em percentagem (Eq. 2.3). A *reprodutibilidade* corresponde a dispersão de valores obtidos através de ensaios interlaboratoriais, relativamente à mesma amostra, mas com um outro operador e num espaço de tempo diferente do caso mencionado anteriormente. Permite ter uma noção da existência de erros aleatórios.

$$\% CV_r = 100 * \left(\frac{s_r}{\bar{X}} \right) \quad (2.3)$$

Onde s_r corresponde ao desvio-padrão da amostra e \bar{X} diz respeito à respectiva média.

Tal como viria a acontecer neste estudo, nos casos em que só é possível realizar um estudo da repetibilidade, surge como alternativa a *precisão intermédia*. Tem a vantagem de expressar as variações laboratoriais como as condições de reprodutibilidade, ou seja, esta estimativa de dispersão pode ser realizada tanto dentro do laboratório como a nível interlaboratorial, os ensaios são executados em dias diferentes, por operadores diferentes, etc.. Consiste, portanto, numa avaliação suplementar da precisão que não pode propriamente ser classificada de repetibilidade ou de reprodutibilidade.

$$\% CV = 100 * \left(\frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}{\bar{X}}} \right) \quad (2.4)$$

Onde x_i é o valor suspeito e \bar{X} é a média.

2.2.4 – Exactidão

A exactidão tem por objectivo comparar a proximidade de uma estimativa com o respectivo valor verdadeiro, ou assumido como correcto. A exactidão pode ser avaliada segundo três critérios: erro absoluto, erro relativo e pela taxa de recuperação.

Através do cálculo do erro absoluto (Eq. 2.5) ocorre a comparação entre o valor em causa (μ) com o valor verdadeiro (τ).

$$\Delta = \mu - \tau \quad (2.5)$$

O erro relativo relaciona a proporção entre o erro absoluto (Δ) e o valor considerado como verdadeiro (τ).

$$\% RE = 100 * \frac{\Delta}{\tau} = 100. \left(\frac{\mu - \tau}{\tau} \right) \quad (2.6)$$

A taxa de recuperação tem por objectivo realizar a dopagem de uma amostra para verificar a quantidade de analito que se consegue obter (Eq. 2.7), onde X_i é a quantidade final experimentalmente obtida, X_0 o teor inicial de uma amostra e X_{add} representa a dopagem realizada.

$$\% TR = 100. \frac{(X_i - X_0)}{X_{add}} \quad (2.7)$$

A exactidão permite estimar a presença de erros sistemáticos que podem ser verificados através da análise de amostras cegas, de testes de recuperação, da análise com um CRM (*Certified Reference Material*) ou com um SRM (*Standart Reference Material*) de matriz equivalente ou segundo ensaios interlaboratoriais.

As *amostras cegas* [34] correspondem a uma simulação de amostras, examinadas de forma periódica e com resultados já conhecidos na rotina, para posterior comparação dos resultados obtidos. Seguindo os mesmos critérios, o seu procedimento de análise deve ser o mais semelhante com aquilo que é praticado para a análise inicial.

Os testes de recuperação (Eq. 2.7) constituem o método mais utilizado na validação de métodos analíticos. A “recuperação” relaciona-se com a quantidade de analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extracção, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra.

A utilização de CRM's (*Certified Reference Materials*), materiais certificados por processos tecnicamente válidos e rastreáveis, deve ser assegurada sempre que se consiga

num processo de validação de um método, pois possui para cada parâmetro uma incerteza associada. O uso destes materiais permite a averiguação de possíveis desvios existentes nos equipamentos em uso no laboratório, permitindo uma averiguação para a causa do erro e eliminando-o.

Por fim, a realização de ensaios interlaboratoriais também permite chegar a conclusões sobre a exactidão, referentes à mesma amostra, em condições já pré-definidas. Para tal, podem ser efectuados três tipos de ensaios: os de aptidão, de forma a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes no estudo; de certificação, tendo como objectivo chegar ao valor certificado para um material candidato a CRM; e de normalização, de forma a estudar as características de um método analítico para o analito em causa, calculando a incerteza do seu resultado em função do valor verdadeiro e de um determinado intervalo.

2.2.5 – Robustez

Num método analítico, a robustez avalia a sensibilidade do método face a pequenas alterações deliberadas das suas condições operacionais (ex.: variação de temperatura, pH, mistura de solventes, etc.). Assim, um procedimento diz-se robusto quando essas pequenas variações não têm influência naquilo que se pretende analisar [35]. A grande vantagem de um método robusto é exactamente o facto nos conduzir a valores concordantes apesar de, experimentalmente, se efectuarem pequenas alterações [36]. Temos, portanto, uma relação directa entre a robustez e a precisão, pois quanto maior a robustez de um método analítico, maior é a confiança que um analista deposita nos seus resultados.

Uma forma de verificar a robustez é através do teste de Youden, também conhecido por *design experimental*. Este teste tem a capacidade, além de avaliar a robustez de um método, de determinar de modo cada parâmetro influencia ou não os resultados finais, indicando de que modo tal acontece. Para tal, os principais elementos são divididos em unidades experimentais (pessoas, parâmetros físico-químicos, etc.), factores (subdivididos em níveis) e numa variável-resposta. Assim, e com o objectivo de otimizar a resposta de um método analítico, é um processo em que ocorre determinação dos factores críticos dum conjunto de variáveis que influenciam o método (ex.: condições de operação) e há optimização dos factores de forma a atingir os objectivos pretendidos no que toca ao comportamento da variável-resposta.

2.2.6 – Validação Analítica das Substâncias Aparentadas do Metronidazol

Como observado na presente secção, a validação de um método analítico implica a sua aprovação para um dado processo ou composto, para posteriormente poder ser tratado/analísado consoante um conjunto de parâmetros, dos quais o analista tem

conhecimento sobre a confiança gerada pelos resultados então gerados através método implementado.

Os critérios de especificação, ou de aceitação, são considerados indicadores pré-definidos e documentados mediante os quais um resultado é considerado se se encontra dentro do limite ou excede o limite, indicado na especificação. Assim, por especificação entende-se o conjunto de requisitos com os que uma substância ou produto farmacêutico tem que cumprir para assegurar uma qualidade adequada.

A avaliação da adequabilidade dos resultados produzidos são baseados em critérios, ou seja, trata-se de limites que são específicos para cada parâmetro a averiguar e representam os intervalos nos quais os resultados obtidos se devem localizar, para conseguir um desempenho considerado como adequado ou aceitável. Deste modo, a avaliação dos resultados para verificar se estes estão compreendidos dentro dos seus respectivos critérios pertinentes é uma forma de um laboratório realizar uma actividade de controlo e qualidade.

A *Farmacopeia Europeia*, através da monografia 01/2008:0675, estabelece um conjunto de critérios para que o método analítico correspondente às substâncias aparentadas do metronidazol seja passível de validação (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Critério de aceitação para validação do método para o metronidazol, segundo a Farmacopeia Europeia.

Parâmetro	Critério de aceitação
Adequabilidade do sistema	Resolução ≥ 2 entre os picos do metronidazol e impureza A
Linearidade	$R^2 \geq 0,98$
	F Significância $< 0,05$
	Ordenada na origem próxima de zero ($P > 0,05$)
	Declive não muito diferente de 1 ($P < 0,05$)
Repetibilidade da Injecção	CV $\leq 1,0 \%$
Precisão Intermédia	CV $\leq 10,0 \%$
Exactidão	Taxa de Recuperação: 90 - 110%
Robustez	CV $\leq 2,0 \%$

2.3 – Cartas de Controlo

Já no processo de utilização de um método analítico, após a sua devida utilização, pode dar-se o caso de ser necessário recorrer ao uso de cartas de controlo.

As cartas de controlo são utilizadas para acompanhar e avaliar, de uma forma contínua, o desenvolvimento qualitativo de um processo em estudo, pondo em evidência quando é que o processo se altera e/ou necessita de uma acção correctiva. As cartas de controlo não são um fim em si [37], são antes uma “constante meta por atingir” e que se pode melhorar continuamente através de um esforço constante, por eliminação das causas especiais de variação e redução das causas comuns.

Existem um conjunto de normas ISO que instituem directrizes e pontos específicos para a formulação de cartas de controlo. Entre esses modelos encontram-se a ISO 7870:2007 (guia genérico e de introdução a cartas de controlo), ISO 8258:2004 (estabelece o diagnóstico do processos por cartas de controlo do tipo *Shewhart* – médias e de amplitudes) e a ISO 7966:2004 (respeitante à utilização das cartas de controlo e ao estabelecimento de procedimentos gerais para a determinação da dimensão de amostragem, estimativa dos limites de acção e respectivos critérios de decisão).

Associado a qualquer tipo de processo encontra-se sempre inerente um determinado tipo de variação, sendo estes denominados de causas comuns ou por causas especiais [38]. As causas comuns são caracterizadas por variações aleatórias que se encontram sempre presentes, por se tratar de ser algo intrínseco ao processo (variações naturais). A sua eliminação pode ter uma elevada influência no processo, podendo ser reduzidas através da aquisição de novos equipamentos, alteração de metodologias de trabalho, etc.. Já as causas especiais devem-se a mudanças não-aleatórias resultantes de condições instáveis e irregulares, conseqüentes de situações imprevisíveis e, até, inaceitáveis.

A Tabela 2.3 mostra alguns exemplos de causas comuns e especiais que podem afectar o processo.

Tabela 2.3 – Exemplos de variações que podem ocorrer durante o controlo de um processo.

Causas Comuns	Causas Especiais
> Variações de intensidade/voltagem da corrente eléctrica;	> Corte de Energia;
> Desgaste gradual das ferramentas;	> Equipamento descalibrado;
> Variações conhecidas e aceitáveis nas medições realizadas	> Quebra de uma ferramenta durante uma operação de fabrico;
	> Operador não reinado para manusear um equipamento;

As cartas de controlo diferenciam-se em dois tipos: de variáveis ou de atributos. As cartas referentes a variáveis correspondem a parâmetros que podem ser expressos numa escala contínua, como os casos da massa, pH, medida, entre outros. Já no que toca a atributos, estes são nomeados pelo número de defeitos ou defeitos por unidade, diferenciando-se entre “bom” e “mau” e/ou “conforme” ou “defeituoso”. A decisão que recai sobre a escolha de qual o tipo de carta de controlo a usar é facilitada pelo uso de fluxogramas, como o exemplo apresentado na Fig. 2.6.

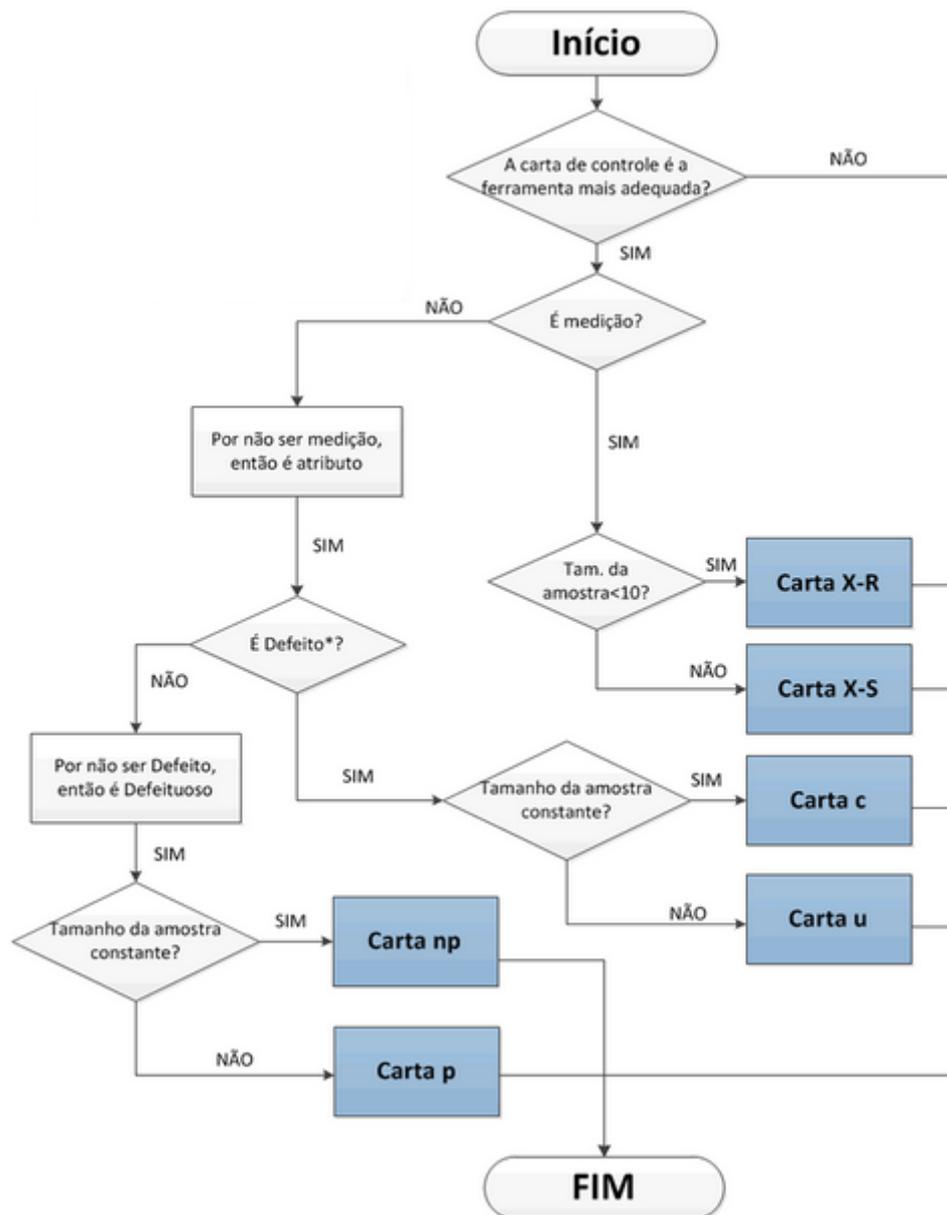


Fig. 2.6 – Fluxograma para decisão sobre a utilização do tipo de carta de controlo [39].

Como se pretende com este estudo laboratorial, ir-se-á proceder à análise de cartas de controlo para variáveis (Fig. 2.7). Este tipo de cartas possui uma série de vantagens, entre as quais a de constituir uma ferramenta de fácil aplicação que permite ver o desenrolar de um processo de forma contínua; de melhorar os processos no sentido de reduzir a sua

variabilidade, verificando a capacidade do processo; estabelecer uma linguagem simples e comum no estudo das melhorias do processo, tal como na relação empresa-cliente; e a representação gráfica facilita a identificação das causas que afectam o sistema, havendo a possibilidade de existir indicações precisas de acções correctivas.

Ainda que consistente mas menos significativa, este conjunto de dados tem tendência a gerar uma confusão entre limites de controlo e de especificação e, ao contrário do que se passa com as cartas de controlo de atributos, os dados não podem ser classificados como “conforme” ou “não conforme”.

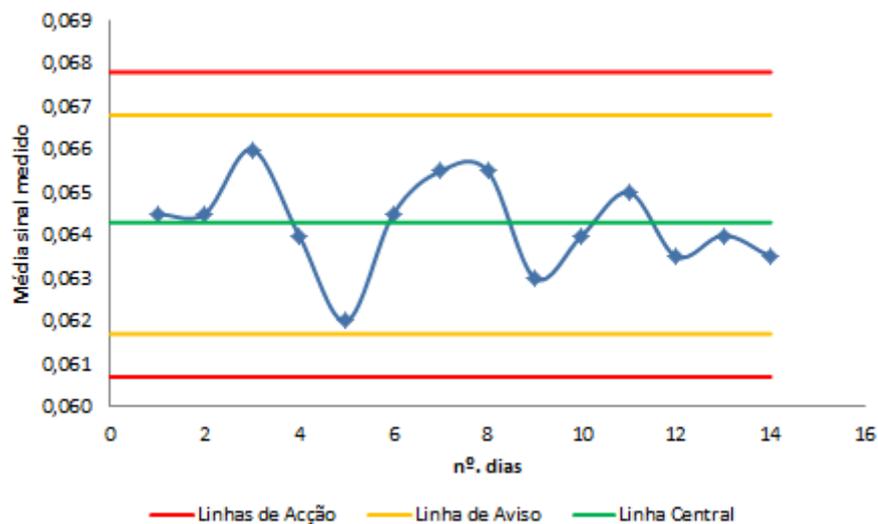


Fig. 2.7 – Representação de uma carta de controlo de variáveis para um dado processo.

As cartas de controlo de variáveis distinguem-se, ainda, por dois tipos [40]: cartas de posição (como a *X-Chart* onde se representam, por exemplo, as médias diárias) e as cartas de dispersão (que traduzem a variabilidade diária, por exemplo, a carta de amplitudes ou *R-Chart*). Encontra-se na Tabela 2.4 a forma de chegar aos valores para traçar uma carta de controlo, sendo que a linha central especifica o valor mais provável, as linhas de aviso estabelecem um limite de confiança a 95% e, por fim, as linhas de acção correspondem a um limite de confiança a 99%.

Tabela 2.4 – Resumo dos procedimentos para o estabelecimento de cartas de controlo de médias (X-Chart) e amplitudes (R-Chart) de um processo em controlo estatístico.

Médias	Parâmetros a Analisar	Amplitudes
$\bar{x}_i = \frac{1}{m} \sum_j^m x_{ij}$	1. Estimativas Iniciais	$R_i = Máx(x_i) - Mín(x_i)$
$CL = \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_i^n \bar{x}_i$	2. Estimativa Global (<i>Central Line</i>)	$CL = \bar{R} = \frac{1}{n} \sum_i^n \bar{R}_i$
$\sigma_{\bar{x}_i} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_{i_1} - x_{i_2})^2}{(n-1)}}$	3. Análise da Dispersão	$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_i^n (R_i - \bar{R})^2}{2n}}$
$AL_X = CL_X \pm 3 * \sigma_{\bar{x}_i}$	4. Estabelecer Linhas de Acção (AL)	$AL_R = D_4 * \bar{R}$
$WL_X = CL_X \pm 2 * \sigma_{\bar{x}_i}$	5. Estabelecer Linhas de Aviso (WL)	$WL_R = CL_X \pm \frac{2}{3} (AL_R - \bar{R})$
6. Representar os valores experimentais na carta de controlo.		

Onde \bar{X} corresponde à média, R_i é a amplitude, CL diz respeito à linha central, $\sigma_{\bar{x}}$ e σ_R estão associados à dispersão das médias e amplitudes, respectivamente, e D_4 é um parâmetro estatístico calculado por uma determinada dimensão de réplicas.

Da mesma forma que as cartas de controlo permitem visualizar a evolução de um determinado processo, é necessário saber reconhecer quando estamos perante uma anomalia. Assim, é fácil de as identificar segundo as características representativas de anomalia (Tabela 2.5), devendo ser imediatamente reconhecidas. A prova de irregularidades é mais facilmente detectada numa *R-Chart*, principalmente devido a alterações com a precisão do processo. Contudo, o reconhecimento de anomalias é semelhante de acordo se se trata de *X-Chart* ou *R-Chart*.

Tabela 2.5 – Eventuais anomalias que podem ser detectadas em cartas de controlo.

Anomalias
> 1 valor fora da linha de acção;
> 2 de 3 valores sucessivos fora da mesma linha de acção;
> 7 valores consecutivos do mesmo lado da linha central;
> 7 valores seguidos com a mesma tendência;
> 10 de 11 valores do mesmo lado da faixa central;
> detecção de padrões não aleatórios.

2.4 - Estudos de Estabilidade do Produto

Outro dos objectivos deste trabalho reside em seguir a estabilidade de um lote de Metronidazol 5mg/mL, contido numa embalagem propileno de 100 mL. Este estudo irá permitir estabelecer um perfil da estabilidade do produto, verificando se o conteúdo do produto se mantém inalterado durante o seu prazo de validade (correspondente à duração do estudo – 36 meses), e investigar se determinadas mudanças submetidas possam ter impacto [41].

Será enunciada a metodologia para um estudo de fotoestabilidade, no qual se procura estabelecer o grau requerido à protecção de luz pelo produto acabado, fornecendo assim a informação útil ao conseqüente manuseamento, acondicionamento e devida rotulagem do produto.

2.4.1 - Estabilidade do Metronidazol 5mg/mL

Os estudos de estabilidade realizados nos Laboratórios Basi seguem as normas da ICH “*Stability Testing of New Drugs and Products – Q1A (R2)*” [42]. O propósito deste estudo é o de mostrar de que modo a qualidade do produto acabado varia com o tempo, sob influência de uma variedade de factores ambientais (temperatura, humidade e luz), bem como estabelecer o prazo de validade para o produto acabado e as condições de conservação mais recomendadas.

As condições de conservação do produto a analisar e o tipo de estudos escolhidos são os adequados para estabelecer as condições de armazenamento, transporte e respectivo uso. As embalagens do produto são mantidas em câmaras climáticas, respeitando as condições de armazenamento dos produtos com recipientes semi-permeáveis, nas condições descritas e com os respectivos factores de correcção referentes aos dados de estabilidade alusivos à perda de água (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Condições de armazenamento do produto acabado com respectivo factor de correcção para perda de água.

Temperatura de Conservação	Humidade Relativa do Estudo	Factor de Correcção da Perda de Água
25°C ± 2°C	60% HR ± 5% HR	1,5
30°C ± 2°C	65% HR ± 5% HR	1,9
40°C ± 2°C	70% HR ± 5% HR	3

2.4.2 – Ensaio de Fotoestabilidade

Este estudo tem a finalidade de demonstrar que a exposição do produto acabado a uma fonte luminosa não resulta numa alteração considerável do produto acondicionado em frasco de propileno, visto que o metronidazol possui sensibilidade a fontes luminosas. Ao mesmo tempo, pretende-se demonstrar o uso deste tipo de material em detrimento de outro tipo de embalagem.

O estudo foi realizado segundo as condições descritas na ICH Q1B (opção 2) [43] durante o tempo suficiente para se obter as seguintes condições:

- Iluminação geral de não menos do que $1,2 \times 10^6$ lux.hora¹⁶ de luz visível (gama visível de 400nm a 800nm);
- Pelo menos 200 W.h/m² de luz Ultravioleta¹⁷ (de 320 a 400nm).

O estudo baseia-se em duas fases: uma dita de estudo confirmatório, ao qual o produto está sujeito a condições bem determinadas, e a um estudo de degradação forçada. De forma a levar a cabo este último estudo, serão usadas as condições descritas na parte experimental Capítulo 3, onde a sua correspondência equivale a duas vezes as condições requeridas para o estudo de fotodegradação normal.

¹⁶ Lux.hora – unidade de fluxo luminoso por hora; 1 lux corresponde a 1 lumens.m⁻².

¹⁷ W.h/m² – Unidades de irradiação a que está sujeita a amostra.

Capítulo 3

Parte Experimental

Será realizada uma referência a todo o suporte experimental que susteve esta investigação.

3.1 – Materiais e Equipamentos

As análises em HPLC, para as substâncias aparentadas, foram realizadas num HPLC *Waters E2695 – Separations Module*. As fases móveis utilizadas e as soluções-padrão entretanto preparadas englobaram todas o uso água desionizada ultrapura obtida pelo sistema Millipore *Milli-Q System* (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$), Millipore S.A..



Fig. 3.1 – Fotografia dos equipamentos de HPLC *Waters E2695 – Separations Module* (esquerda) e sistema Millipore *Milli-Q* (direita).

A fase móvel utilizada em todos os ensaios corresponde a uma mistura composta por metanol e dihidrogenofosfato de potássio 1,36 g/L (30:70 v/v) que posteriormente é filtrada sob vácuo.

A amostragem a ser utilizada durante o estudo corresponde a um lote da solução de Metronidazol 5mg/ml para perfusão, G36645.

Tabela 3.1 – Características dos equipamentos e condições de trabalho.

Nome	Características
Sistema <i>Milli-Q</i>	Filtros 0.22 µm
Balança analítica	Mettler Toledo DV250, Precisão de 0,01mg
HPLC	DAD
Coluna	Waters, Simmetry, 250mm x 4,6mm
Pré-coluna	C18, 5µm
Fluxo	1,0 ml/min
Temperatura do forno	25°C
Temperatura do auto-injector	10°C
Volume da injeção	10 µl
Detector	DAD - 315 nm
Vials para HPLC	2 ml
Septos para vials	N.A.
Seringas	N.A.
Filtros para seringas	Millipore Millex - Gn, Nylon 0.20 µm

As amostras preparadas respeitantes para analisar o teor de metronidazol foram executadas no espectrofotómetro de UV/Vis *Perkin-Elmer, Lambda 35*, utilizando a mesma solução de HCl 0,1M empregue na diluição das soluções como líquido de compensação.



Fig. 3.2 – Espectrofotómetro de UV/Vis *Perkin-Elmer, Lambda 35*.

As condições de operação no espectrofotómetro de UV/Vis basearam-se no estudo a um comprimento de onda de 277 nm, com células de quartzo com 1 cm de comprimento

O teor de Metronidazol é obtido da seguinte forma:

$$[\text{Metronidazol}] (g/L) = \frac{Aa}{Ap} * Pp * Pt * \frac{Fda}{Fdp} \quad (3.1)$$

Onde, *Aa* corresponde à absorvância da solução amostra, *Fda* é o factor de diluição da amostra (250), *Ap* é a absorvância da solução padrão, *Fdp* trata do factor de diluição do padrão

(1250), *Pp* associa-se à massa do padrão pesada para o balão de 50mL (mg) e *Pt* representa a pureza do padrão tal e qual.

3.2 – Procedimentos Práticos

Serão focados todos os passos práticos realizados.

3.2.1 – Solução Padrão do Metronidazol

Através do site <http://crs.edqm.eu> do fabricante do padrão primário de Metronidazol é possível extrair informação sobre o produto em questão por um comprovativo gerado electronicamente. No subcapítulo A.3, encontra-se um exemplo em como o produto se encontra válido para uso. Aquando das análises com este padrão primário, teve de se recolher uma cópia do mesmo, onde se encontra especificado que o produto se encontrava dentro do prazo de validade e, assim, pode ser utilizado.

Uma substância primária é um composto que é estável tanto em solução como no estado sólido, não reage com a luz, não é volátil, deve possuir um grau de pureza superior a 99,95%, entre outros. Aquando da utilização do referido padrão, o seu grau de pureza era de 99,99%.

3.2.2 – Matéria-Prima do Metronidazol

A matéria-prima de metronidazol, Metronidazol S.A., utilizada para o fabrico do respectivo produto acabado foi analisada segundo uma série de parâmetros descritos na Tabela 1.3. Após a devida análise do produto, chega-se à conclusão de que o produto se encontra dentro das condições exigidas para a produção do produto acabado.

Para tal, foi preparada uma solução-teste onde se dissolveram 50,3 mg da amostra em 50,0 ml de fase móvel.

Para a solução de referência (a), de modo a verificar se os componentes se encontravam acima do limite de exclusão¹⁸, diluiu-se 1,0 ml da solução-teste em 100,0 ml de fase móvel. Posteriormente, foi diluído 1,0 ml da solução obtida em 10,0 ml de fase móvel. Já para a solução de referência (b), dissolveu-se 1,1 mg do padrão primário da Impureza A do metronidazol em 2,0 ml de solução-teste, completando o volume para 20,0 ml com a fase móvel.

¹⁸ Limite de exclusão – limite acima do qual todas as moléculas são muito grandes para penetrar nos poros da fase estacionária.

3.2.3 - Validação Analítica para as Substâncias Aparentadas do Metronidazol

Foram realizados um conjunto de procedimentos para os parâmetros a seguir referenciados, utilizando o padrão primário de Metronidazol.

3.2.3.1 - Adequabilidade do sistema

Realizou-se uma solução-teste, dissolvendo-se 50,3 mg da matéria-prima de metronidazol em 50,0 ml de fase móvel.

Posteriormente, foi preparada a solução de referência (b), onde se dissolveu 1,1 mg do padrão primário da Impureza A do metronidazol em 2,0 ml de solução-teste, completando o volume para 20,0 ml com a fase móvel.

3.2.3.2 - Linearidade

Para a curva de calibração preparam-se duas soluções-mãe, de diferentes concentrações, e uma solução-padrão de controlo juntamente com as restantes soluções-padrão.

Preparação das Soluções-Mãe

Preparação das soluções-mãe de 25 µg/ml (alínea 1 e 2) e de 5 µg/ml (alínea 3) referentes ao padrão primário de Metronidazol e respectiva Impureza A do metronidazol:

- Dissolveram-se 2,4 mg de Impureza A em 100,0 ml de fase móvel;
- Dissolveram-se 25,3 mg de Metronidazol S.A. em 50,0 ml de fase móvel. De seguida, diluiu-se 5,0 ml desta solução na solução contendo a Impureza A;
- Foram diluídos 5,0 ml das soluções-mãe 25 µg/ml de Metronidazol S.A. e Impureza A, respectivamente, em 25,0 ml de fase móvel.

Preparação do Padrão de Controlo

Para o padrão de controlo, dissolveu-se 25,2 mg de padrão primário de Metronidazol em 50 ml de fase móvel, sendo depois retirados 5,0 ml desta solução para ser completados em 100 ml de fase móvel. Por fim, a esta última solução foram diluídos 5,0 ml em 50 ml de fase móvel.

Preparação da Curva de Calibração

De forma a chegar à curva de calibração, foram preparados um conjunto de soluções-padrão para traçar as rectas correspondentes à de metronidazol e da impureza A. Tal feito foi concretizado através das seguintes diluições para cada um dos compostos:

- 0,5 ml da solução-mãe 5 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,01%);
- 2,5 ml da solução-mãe 5 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,025%);
- 0,5 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,05%);
- 1,0 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,1%);
- 3,0 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,3%);
- 5,0 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,5%);
- 6,0 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 50,0 ml de fase móvel (0,6%).

3.2.3.3 - Precisão Intermédia

Foram preparadas doze soluções-teste independentes (seis soluções-teste num dia e outras seis num dia depois), com uma concentração de 0,5 µg/ml, da seguinte forma:

- Diluição de 5,0 ml da amostra em 50,0 ml de fase móvel;
- Diluição de 1,0 ml da solução anterior em 100,0 ml de fase móvel;
- Diluição de 1,0 ml da solução anterior em 50,0 ml de fase móvel.

3.2.3.4 - Repetibilidade da Injecção

Foi preparada uma solução-padrão a 100%, no qual foram dissolvidos 25,1 mg do padrão de Metronidazol em 50,0 ml de fase móvel. Posteriormente, transferiram-se 5,0 ml da solução preparada para um balão de 100,0 ml, completando o respectivo volume com fase móvel.

Realizaram-se cinco leituras independentes da solução-padrão preparada.

3.2.3.5 - Exactidão

Foi preparada uma solução-mãe com uma concentração de 25 µg/ml. Para tal, dissolveram-se 25,1 mg do padrão de Metronidazol em 50,0 ml de fase móvel, do qual foram extraídos 5,0 ml para completar para 100,0 ml com a mesma fase móvel. Por fim, diluiu-se 5,0 ml da última solução em 50,0 ml de fase móvel.

Para a preparação do placebo foram dissolvidos 298,38 mg de hidrogenofosfato disódico dihidratado, 125,41 mg de ácido cítrico monohidratado e 3,95 g de cloreto de sódio em 500,00 ml de água ultra purificada *Milli-Q*. Desta solução, retiraram-se 5,0 ml para completar a 50,0 ml com fase móvel.

Soluções-Placebo

Foram preparadas três soluções placebo a 80%, 100% e 120%, em triplicado.

- Placebo a 80%: diluição de 2,5 ml do placebo preparado e 2,0 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 25,0 ml de fase móvel;
- Placebo a 100%: diluição de 2,5 ml do placebo preparado e 2,5 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 25,0 ml de fase móvel;
- Placebo a 120%: diluição de 2,5 ml do placebo preparado e 3,0 ml da solução-mãe 25 µg/ml em 25,0 ml de fase móvel.

3.2.3.6 - Robustez

Para este ensaio, foram injectadas duas soluções-amostra preparadas para o ensaio da precisão e a solução-padrão a 100% realizada para o ensaio da repetibilidade da injeção. Das soluções-amostra referidas, guardou-se um *vial* com uma solução-teste que foi analisada passadas 48h a ser concretizada. Outros dois *vials* foram analisados passado 24h após serem preparados, no qual um deles ficou guardado no auto-injector e o outro ficou guardado em condições ambiente, a 10°C e 25°C, respectivamente.

Cada amostra foi processada (analisada) em duplicado.

3.2.4 - Doseamento da solução de Metronidazol 5 mg/ml

Começou por se preparar a solução-padrão, pesando 25,0 mg do padrão primário de Metronidazol e dissolvendo-o em 10,0 ml de HCl 0,1M. Completou-se o volume para 50,0 ml com o mesmo solvente. Desta solução pipetaram-se 10,0 ml para um balão âmbar de 250,0 ml, completando-se o volume com HCl 0,1M. A solução apresenta uma concentração de 20 µg/ml. Ensaio realizado em duplicado.

Para a solução-amostra, transferiram-se 5,0 ml de amostra, completando-se para 50,0 ml com HCl 0,1M. Daqui, pipetaram-se 10,0 ml para um balão âmbar de 250,0 ml preenchendo o seu volume com HCl 0,1M. A solução apresenta uma concentração de 20 µg Metronidazol/ml. Ensaio realizado em duplicado.

3.2.5 - Ensaio de Estabilidade

Foram realizados três tipos de estudos de estabilidade, que se diferenciam entre si nos parâmetros de temperatura e de humidade: estabilidades de longo-termo, em condições intermédias e em condições aceleradas ou de envelhecimento acelerado.

➤ Estabilidade a Longo-Termo

Os estudos de estabilidade a longo termo efectuam-se nas condições $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ e duram o tempo que se pretende comprovar a estabilidade do produto. Como tal, o planeamento das análises decorre trimestralmente no primeiro ano, semestralmente no segundo ano e anualmente nos anos posteriores.

O tipo de ensaios a executar varia consoante a fase temporal que se atravessa e que se encontra descrito em planos de estabilidades (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Planeamento dos ensaios a realizar em condições intermédias e de longo-termo, em cada fase temporal.

Parâmetro	Tempo (meses)				
	0	3	6	9	12
Descrição	X	X	X	X	X
Identificação	X	---	---	---	X
Volume Extraível	X	---	---	---	X
Densidade	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X
Perda de Água (%)	---	X	X	X	X
Nitritos	---	X	X	X	X
Doseamento Metronidazol	X	X	X	X	X
Impurezas (%)	X	X	X	X	X
Contaminação de Partículas	X	---	---	---	X
Endotoxinas Bacterianas	X	---	---	---	X
Ensaio de Esterilidade	X	---	---	---	X

X: ensaio a realizar

➤ Estabilidade em Condições Intermédias

Este tipo de estudo só é realizado durante um período de 12 meses, no seguinte contexto: $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$. Na apresentação de resultados devem existir, pelo menos, quatro pontos, dos quais o inicial e o final têm de estar incluídos (correspondendo ao tempo “zero” e ao tempo final – 12 meses – respectivamente).

O tipo de ensaios a realizar encontra-se descrito na Tabela 3.2. No caso dos ensaios de estabilidade em condições intermédias, o estudo termina ao fim de doze meses. Deste

modo, aos doze meses é necessário executar as análises relativamente a todos os parâmetros e especificações que existem para o produto acabado.

➤ Estabilidade de Envelhecimento Acelerado

Esta espécie de estudo só é realizado durante 6 meses e o produto armazenado está sujeito às seguintes circunstâncias: 40°C ± 2°C/75% RH ± 5% RH. Devem existir um mínimo de três pontos incluindo os tempos inicial e final, ou seja, os resultados finais englobam todos os tempos de análise (tempo “zero”, três meses e seis meses). Pode ser necessário adicionar amostras ao ponto de amostragem e, assim, abarcando um quarto tempo de análise no estudo.

O plano de análises a realizar para este tipo de estudo de estabilidade encontra-se descrito na Tabela 3.3. Este termina ao fim de 6 meses e, tal como acontece no estudo em condições intermédias, é necessário realizar todos os tipos de ensaios como que de uma análise normal ao produto acabado se tratasse.

Tabela 3.3 – Planeamento dos ensaios a realizar em condições aceleradas, em cada fase temporal.

Parâmetro	Tempo (meses)			
	0	1	3	6
Descrição	X	---	X	X
Identificação	X	---	---	X
Volume Extraível	X	---	---	X
Densidade	X	---	X	X
pH	X	---	X	X
Perda de Água (%)	---	---	X	X
Nitritos	X	---	X	X
Doseamento Metronidazol	X	---	X	X
Impurezas (%)	X	---	X	X
Contaminação de Partículas	X	---	---	X
Endotoxinas Bacterianas	X	---	---	X
Ensaio de Esterilidade	X	---	---	X

X: ensaio a realizar

Os ensaios de estabilidade do lote G36445 da solução de Metronidazol 5mg/ml para perfusão tiveram uma duração de 12 meses, 6 meses no caso da estabilidade em condições aceleradas. As amostras analisadas foram mantidas numa câmara de estabilidade *FITOClima S600 PLH Pharma* (Aralab) como demonstra a Fig. 3.3.

Na execução dos ensaios de substâncias aparentadas da solução de Metronidazol 5mg/ml para perfusão, a preparação das soluções-teste consistiram na diluição de 5,0 ml da amostra em 50,0 ml de fase móvel.

No que toca às soluções de referência, para a solução (a) foi diluído 1,0 ml da solução amostra em 100,0 ml de fase móvel, ao qual foi retirado 1,0ml para ser diluído em 10,0 ml de fase móvel. Para a solução de referência (b), dissolveu-se 1,1 mg do padrão primário da Impureza A do metronidazol em 2,0 ml de solução-teste, completando o volume para 20,0 ml com a fase móvel. De referir que o limite de exclusão corresponde a 0,1 vezes a área do pico principal no cromatograma que foi obtido através da solução de referência (a).

A adequabilidade do sistema foi efectuada a partir da solução de referência (b), mencionada aquando da análise da matéria-prima do Metronidazol S.A., a par do que aconteceu com a solução de referência (a).

Aquando da concretização deste trabalho experimental, a validação analítica para o doseamento do metronidazol já tinha sido conseguida. Contudo, a sua análise foi realizada de forma a verificar as variações existentes entre a quantidade de substância activa e substâncias relacionadas presentes.

De referir que o limite de exclusão corresponde a 0,1 vezes a área do pico principal no cromatograma que foi obtido através da solução de referência (a). A adequabilidade do sistema foi efectuada a partir da solução de referência (b), mencionada aquando da análise da matéria-prima do Metronidazol S.A., a par do que aconteceu com a solução de referência (a).

Os dados obtidos serão comparados com os do doseamento da substância activa do metronidazol (um método já anteriormente validado), de forma a verificar a estabilidade do produto em estudo.

Este projecto ainda se encontra em andamento e tem uma durabilidade total de 36 meses (3 anos), podendo ainda ser alargado. Contudo, os resultados que serão apresentados adaptam apenas os primeiros 12 meses do estudo, permitindo tirar já algumas conclusões.

3.2.6 - Ensaios de Fotoestabilidade

O produto acabado é mantido numa câmara de fotoestabilidade sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante um determinado período e com uma determinada radiação.

Para a execução do estudo de degradação forçada e respectivo estudo confirmatório para o produto acabado são usadas as seguintes condições:

- Nível de irradiação: 15000 LUX (Vis) e 15 W/m^2 (UVA) – nível de irradiação médio;
- Duração total do estudo: 160 horas (Vis) + 28 horas (UVA), dividido em duas fases com as mesmas fontes luminosas:
 - a) 1ª fase: 80 horas (VIS) + 14 horas (UVA) – estudo confirmatório;
 - b) 2ª fase: 80 horas (VIS) + 14 horas (UVA) – estudo degradação forçada.

Este ensaio é realizado utilizando a câmara de fotoestabilidade *FITOClima S600 PLH Pharma* (Aralab) (Fig. 3.3.), a qual está equipada com lâmpadas fluorescentes HF *cool white* (potência de iluminação 3 a 30.000 Lux) e lâmpadas fluorescentes HF *Near UV* (potência de radiação 3 a 30 W/m²), e sensores de radiação de espectro global 400-800nm e UV 295-400nm.



Fig. 3.3 – Câmara de estabilidade (esquerda) e câmara de fotoestabilidade (direita).

Ao fim do tempo de estudo, as amostras são recolhidas e analisadas, sendo que a amostragem deve ser realizada sobre as condições normais de utilização. Os parâmetros físico-químicos susceptíveis de sofrerem alterações durante o tempo de análise são determinados segundo o estudo de fotoestabilidade (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Ensaios a realizar no tempo inicial, estudo confirmatório e degradação forçada.

Parâmetro	Tempo (horas)		
	Tempo inicial	Estudo Confirmatório	Degradação Forçada
Descrição	X	X	X
Identificação	X	X	X
Substâncias Aparentadas	X	X	X
Doseamento SA	X	X	X
pH	X	X	X
Contaminação de Partículas	X	X	X

X: ensaio a realizar

O estudo de fotoestabilidade seguiu uma abordagem sistemática e sequencial, entre os quais: ensaios da substância activa em frasco de vidro incolor e frasco de vidro âmbar; o ensaio do medicamento em frasco de polipropileno com rolha de borracha, cápsula de alumínio

de *Flip-off* e rótulo; e o ensaio da substância activa em frasco de propileno envolto em folha de papel de alumínio (para controlo negativo¹⁹).

Na preparação das soluções-amostra, respeitantes aos ensaios a realizar para as fases 1 e 2, realizou-se uma diluição 5,0 ml de amostra em 50,0 ml de fase móvel, correspondendo a uma concentração de 0,5 µg/ml. Este procedimento foi repetido e transferido para os frascos incolor, de âmbar e para frascos de propileno sem revestimento alumínio (simulando as condições onde se encontra a solução para perfusão do metronidazol) e com revestimento, respectivamente.

No que toca às soluções de referência, para a solução (a) diluiu-se 1,0 ml da solução amostra em 100 ml de fase móvel, ao qual foi retirado 1,0 ml para ser diluído em 10,0 ml de fase móvel. Para a solução de referência (b), dissolveu-se 1,1 mg do padrão primário da Impureza A do metronidazol em 2,0 ml de solução-teste, completando o volume para 20,0 ml com a fase móvel. De referir que o limite de exclusão corresponde a 0,1 vezes a área do pico principal no cromatograma que foi obtido através da solução de referência (a).

A adequabilidade do sistema foi efectuada a partir da solução de referência (b), mencionada aquando da análise da matéria-prima do Metronidazol S.A., a par do que aconteceu com a solução de referência (a).

Aquando da concretização deste trabalho experimental, a validação analítica para o doseamento do metronidazol já tinha sido conseguida. Contudo, a sua análise foi realizada de forma a verificar as variações existentes entre a quantidade de substância activa e substâncias relacionadas presentes.

Os dados obtidos serão comparados com os do doseamento da substância activa do metronidazol (um método já anteriormente validado), de forma a verificar a fotoestabilidade do produto em estudo.

¹⁹ Controlo negativo – onde se espera que não seja observado o efeito adverso.

3.3 – Procedimentos Estatísticos

Para traçar a curva de calibração irei recorrer ao teste de Mandel para a verificação dos respectivos dados.

3.3.1 – Representatividade

Estando delineado o caminho para verificar se existe homogeneidade da variância, recorreu-se a um sistema de hipóteses onde se comparou os desvios-padrão da amostra (Eq. 3.2).

O teste de homogeneidade da variância na curva de calibração permite comparar directamente as duas dispersões dos padrões extremos (σ_1^2 e σ_2^2) através de um teste estatístico. Como hipótese inicial assume-se que estas são estatisticamente equivalentes ($H_0 = \sigma_1^2 \approx \sigma_2^2$) e como hipótese alternativa que elas são distintas ($H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$).

O valor de teste é calculado através de Eq. 3.2.

$$TV = \left(\frac{\sigma_N}{\sigma_1}\right)^2 \leq F_{\alpha=0,01}^b(v_1; v_2) \quad (3.2)$$

Onde, σ_1 e σ_2 se tratam dos respectivos desvios para v_1 e v_2 graus de liberdade associados. A hipótese nula é considerada como aceite se o valor obtido for compatível com o previsto pela distribuição de Fisher bilateral com um nível de confiança de 99% ($TV = F_{\alpha=0,01}^b(v_1; v_2) = F_{\alpha=0,005}^u(v_1; v_2)$)

3.3.2 – Escolha do Modelo

Após a construção dos modelos linear (P01) e polinomial (P012) descritos na (subcapítulo A.2.1), conclui-se qual o modelo a seguir para a detecção de *outliers*.

$$\begin{aligned} H_0 &= \sigma_{fit}^2(P01) \leq \sigma_{fit}^2(P012) \\ H_1 &= \sigma_{fit}^2(P01) > \sigma_{fit}^2(P012) \end{aligned} \quad (3.3)$$

$$TV = \frac{\Delta_{SS}/q}{\sigma_{p.e.}^2} \leq F_{\alpha=0,01}^u(\Delta_v; \Delta_{pe}) \quad (3.4)$$

Onde, σ_{fit}^2 trata da variância do ajuste, Δ_{SS} representa a diferença da função de ajuste entre os modelos, q a diferença entre o número de graus de liberdade e $\sigma_{p.e.}^2$ refere-se à menor variância do ajuste. Segundo o sistema de hipóteses criado, de o valor experimental (TV) for inferior ao valor crítico, estamos então perante um conjunto de dados abrangido por um modelo linear.

3.3.3 – Diagnóstico de Outliers

Os valores considerados discrepantes são avaliados de uma forma semelhante ao teste de Mandel, no qual ocorre a comparação da variabilidade. Assim, compara-se o aumento da variância do ajuste (no qual o *outlier* está incluído) no universo em estudo a estimativa da menor variância do ajuste (Eq. 3.4).

Se o valor experimentalmente obtido superar o valor crítico significa que a probabilidade de o valor em causa se tratar de um *outlier* é bastante elevada, uma vez que existe uma elevada possibilidade de a hipótese nula não ser válida. Deste modo, a remoção de quaisquer pontos da curva de calibração tem impacto em todas as estimativas subsequentes. Portanto, daí surgir a necessidade de realizar o teste de Fisher com um grau de confiança de 99%.

No sentido de estimar os eventuais valores discrepantes é recomendável realizar uma análise de regressão por estimativa robusta. No caso de a hipótese nula ser válida usa-se a abordagem P01 robusta (calculando derivadas de 1º grau, mediana de b_1 , avaliar valores para b_0 e sua respectiva mediana, entre outros); se for P012 o modelo aceite, a perspectiva a seguir é a do modelo polinomial (cálculos de segundas e primeiras derivadas, etc.).

3.3.4 – Análise da Variância (ANOVA)

Sendo o teste ANOVA um tipo de análise bastante robusta utilizou-se este teste para confirmar se os valores de probabilidade obtidos são válidos, bem como outros parâmetros referentes às especificações do produto.

Mais concretamente, foi usado o teste ANOVA de factor único, visto que o objectivo estava em compreender a relação que existia entre a concentração e as respectivas áreas.

Para o caso em que o teste ANOVA é de um factor, a componente puramente aleatória diz respeito à dispersão dos valores experimentais enquanto o efeito do factor se transmite pela combinação linear de variáveis independentes. Desta forma, a dispersão total (SS_T) é dada pela Eq. 3.5.

$$SS_T = SS_0 + SS_A \quad (3.5)$$

Onde SS_0 corresponde à dispersão aleatória e SS_A refere-se à dispersão do efeito em causa. Cada quantidade é obtida segundo o demonstrado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Construção de tabela para teste ANOVA de um factor [44].

Fonte de variação	SS	v	MQ
Entre níveis	$SS_A = \frac{S_{x^2}}{n} - \frac{(S_x)^2}{\sum_{i=1}^n m_i}$	$(n - 1)$	$s_A^2 = \frac{SS_A}{(n - 1)}$
Dentro dos níveis	$SS_0 = SS_T - SS_A$	$\sum_{i=1}^n m_i - n$	$s_0^2 = \frac{SS_0}{\sum_{i=1}^n m_i - n}$
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} x_{ij}^2 - \frac{(S_x)^2}{\sum_{i=1}^n m_i}$	$\sum_{i=1}^n m_i - 1$	$s_T^2 = \frac{SS_T}{\sum_{i=1}^n m_i - 1}$

Onde S_x representa o somatório de todos os valores, S_{x^2} é o somatório dos valores mencionados ao quadrado, m é o número de réplicas, n o número de níveis e x_{ij} corresponde ao valor médio da réplica j num dado nível i .

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 - Metronidazol

A análise dos resultados começou com os dados referentes à substância activa do metronidazol, necessária para um conjunto de ensaios como a validação do método para as substâncias aparentadas.

4.1.1 - Validação Analítica da Curva de Calibração

Nos próximos subtópicos vão ser descritos os passos que levaram à validação do método analítico. Para tal, fizeram parte os ensaios correspondentes à adequabilidade do sistema, linearidade, repetibilidade da injeção, repetibilidade do método, precisão intermédia, exactidão e robustez do sistema, utilizando o padrão primário Metronidazol S.A..

4.1.1.1 - Adequabilidade do sistema

Realizou-se o ensaio da adequabilidade do sistema de forma a verificar a resolução dos picos. De modo a verificar as condições iniciais do sistema, foi traçado um cromatograma da fase móvel (Fig. 4.1).

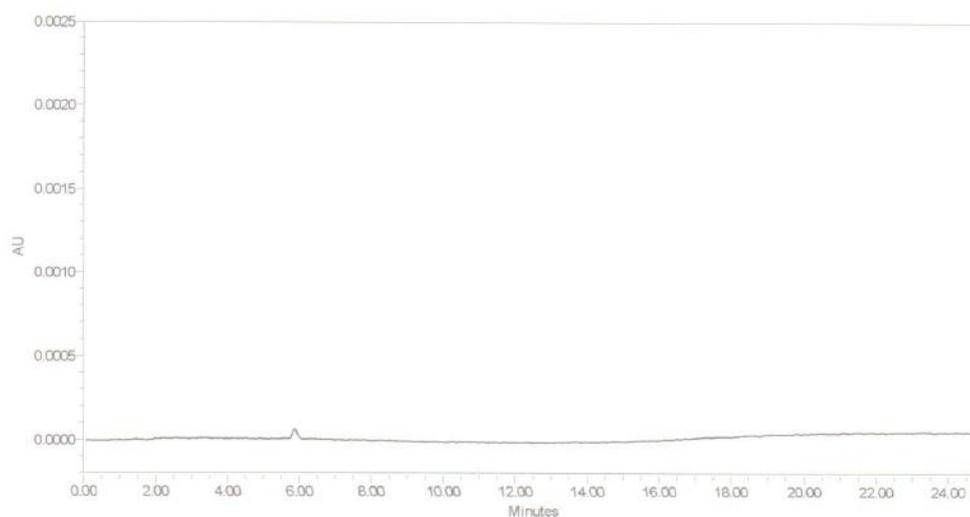


Fig. 4.1 – Cromatograma correspondente à fase móvel.

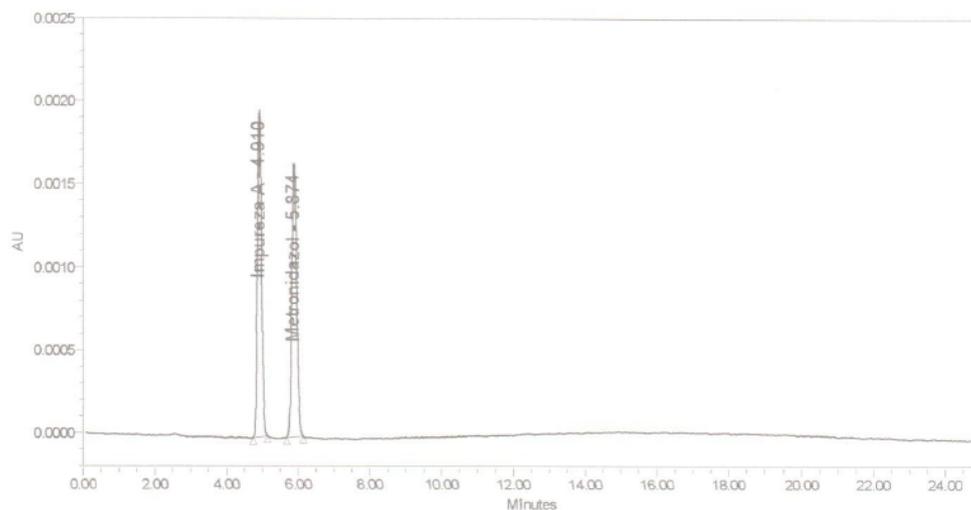


Fig. 4.2 – Solução de referência (b) entre o metronidazol e a Impureza A.

A resolução dos picos é de 3,8, muito superior à resolução de 2 entre os dois picos exigida pela monografia. Assim, o parâmetro da adequabilidade cumpre com o critério de aceitação.

4.1.1.2 - Linearidade

Na Tabela 4.1 encontram-se os valores obtidos, por HPLC, para a verificação da respectiva linearidade. Foram analisados os valores para o metronidazol e para a impureza A, respectivamente, visto a impureza ter a capacidade de se interligar com a substância activa durante o seu processo de síntese. Os valores de concentração para ambas as espécies surgem da relação efectuada entre os volumes transferidos inicialmente e os volumes finais, com as soluções-mãe de 25 µg/ml e 5 µg/ml então preparadas.

Ao mesmo tempo, traçaram-se os gráficos correspondentes à curva de calibração e devidos resultados gerados pela ferramenta ANOVA.

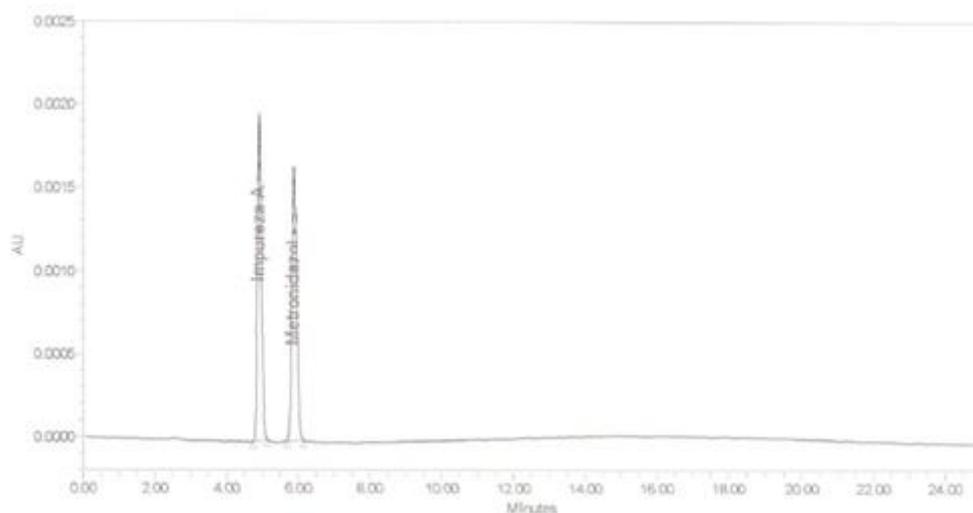


Fig. 4.2 – Cromatograma da solução-padrão a 100% de Metronidazol e a Impureza A.

Tabela 4.1 – Valores obtidos para cada injeção respeitantes à curva de calibração.

INJEÇÃO	Metronidazol		Impureza A	
	T. Retenção	Área	T. Retenção	Área
P_0,01%	5,7	5616	4,7	5427
	5,7	6210	4,7	5166
P_0,025%	5,7	31112	4,7	25489
	5,7	30464	4,8	25093
P_0,05%	5,7	30348	4,7	25082
	5,7	30392	4,8	25329
P_0,1%	5,7	61206	4,8	50164
	5,7	60916	4,7	50474
P_0,3%	5,7	182082	4,7	150355
	5,7	183300	4,7	150229
P_0,5%	5,7	302527	4,7	249682
	5,7	302021	4,8	249002
P_0,6%	5,7	365905	4,7	301296
	5,7	368165	4,8	301524

Tabela 4.2 – Obtenção das respectivas concentrações de metronidazol e impureza A para representar os pontos da curva de calibração.

Injecção	Metronidazol		Impureza A	
	ug/ml	Área (Med)	ug/ml	Área (Med)
0,01%	0,05	5913	0,05	5297
0,03%	0,13	30788	0,12	25291
0,05%	0,25	30370	0,24	25206
0,10%	0,50	61061	0,48	50319
0,30%	1,51	182691	1,44	150292
0,50%	2,52	302274	2,40	249342
0,60%	3,02	367035	2,88	301410

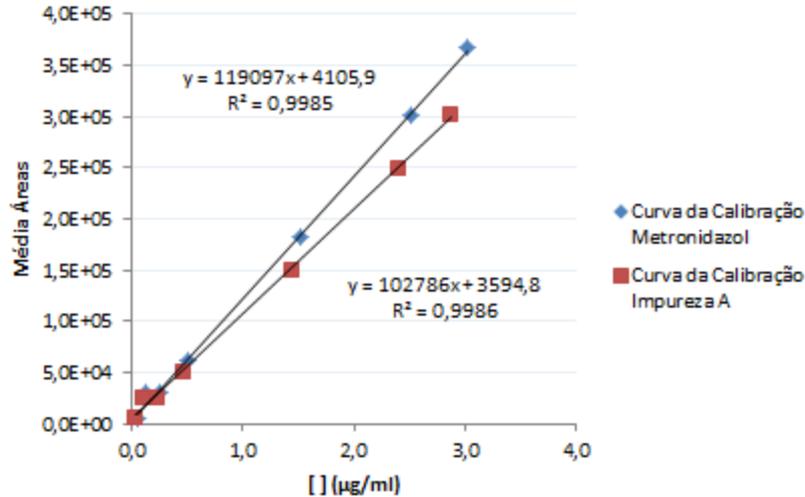


Fig. 4.3 – Curvas de calibração do Metronidazol e Impureza A, respectivamente.

Obteve-se, então, as curvas de calibração presentes na Fig. 4.3. De seguida, foi executado o teste ANOVA para verificar os dados obtidos.

Dos parâmetros estatísticos mais relevantes salientam-se, no caso do metronidazol, o valor experimental gerado pelo teste de Fisher (2,94E-08). No que se refere aos valores de prova, temos 27,1% de o valor da ordenada na origem ser zero e uma probabilidade de 2,94E-08 para o declive ser diferente de zero. O mesmo se passa para a impureza A, onde o F de significância é de 2,45E-08 e o valor de b_0 é 23,0% e o de b_1 corresponde a 2,45E-08.

Segundo a Fig. 4.3 e os dados fornecidos pela ferramenta ANOVA, verifica-se que os valores de correlação para cada curva de calibração são bastante elevados e possuem um grau de certeza, gerado pelo valor de prova, bastante optimista. Isto porque, segundo os critérios de aceitação do parâmetro facultados pela Farmacopeia Europeia, os valores já se encontram dentro do limite de especificação. Contudo, o padrão de 0,025% apresenta um ligeiro desvio em ambas as curvas de calibração. Assim feito, realiza-se o teste de Mandel por forma a averiguar se se trata de um valor discrepante (*outlier*).

Através do teste de Mandel, pretende-se verificar se existem valores discrepantes. O processo inicia-se pela representatividade do método. Comparando os desvios-padrão do primeiro padrão de cada espécie (X_1) com o último (X_7), conclui-se que existe homogeneidade da variância (Tabela 4.3), ou seja, a variância existente é pequena perante todo o conjunto de dados fazendo com que a hipótese nula seja válida (Eq. 3.2).

Tabela 4.3 – Representatividade da amostra.

Metronidazol		Impureza A	
TV	14,476	TV	0,76311
F ^b (0,01)	16211	F ^b (0,01)	16211

Segue-se a escolha do método a utilizar, através do teste de Mandel, onde se verifica qual o modelo a ser utilizado: um modelo linear (P01) ou um modelo polinomial (P012). Esta análise consiste em comparar as séries de dados obtidas entre os dois modelos criados. Para tal, são comparados alguns parâmetros de cada modelo, entre os quais a soma dos quadrados (SS), o número de graus de liberdade (*ndf*), a variância do ajuste (*Var_fit*) e o ajuste padrão (*Std_fit*).

Tabela 4.4 – Comparação entre modelos P01 e P012, segundo o teste de Mandel.

	Metronidazol			Impureza A	
	P01	P012		P01	P012
SS	1,91E+08	1,71E+08	SS	1,20E+08	1,08E+08
ndf	5	4	ndf	5	4
Var_fit	3,82E+07	4,28E+07	Var_fit	2,40E+07	2,71E+07

Tal como a comparação entre os métodos demonstra, o valor experimental é muito inferior ao valor crítico gerado pelo teste de Fisher, isto é, segundo o sistema de hipóteses apresentado na Eq. 3.4, para ambos os compostos estamos perante casos de modelos lineares P01. Assim, tanto para o metronidazol como para a impureza A, vai ser utilizado este método para verificar a presença de valores anormais no conjunto de dados.

De modo a analisar possíveis valores que se encontrem fora da gama de trabalho, realiza-se uma regressão linear por meio de uma regressão robusta (Subcapítulo A.2.2), no qual se consegue obter uma representação gráfica dos valores que mais se afastam do conjunto de dados (Fig. 4.4).

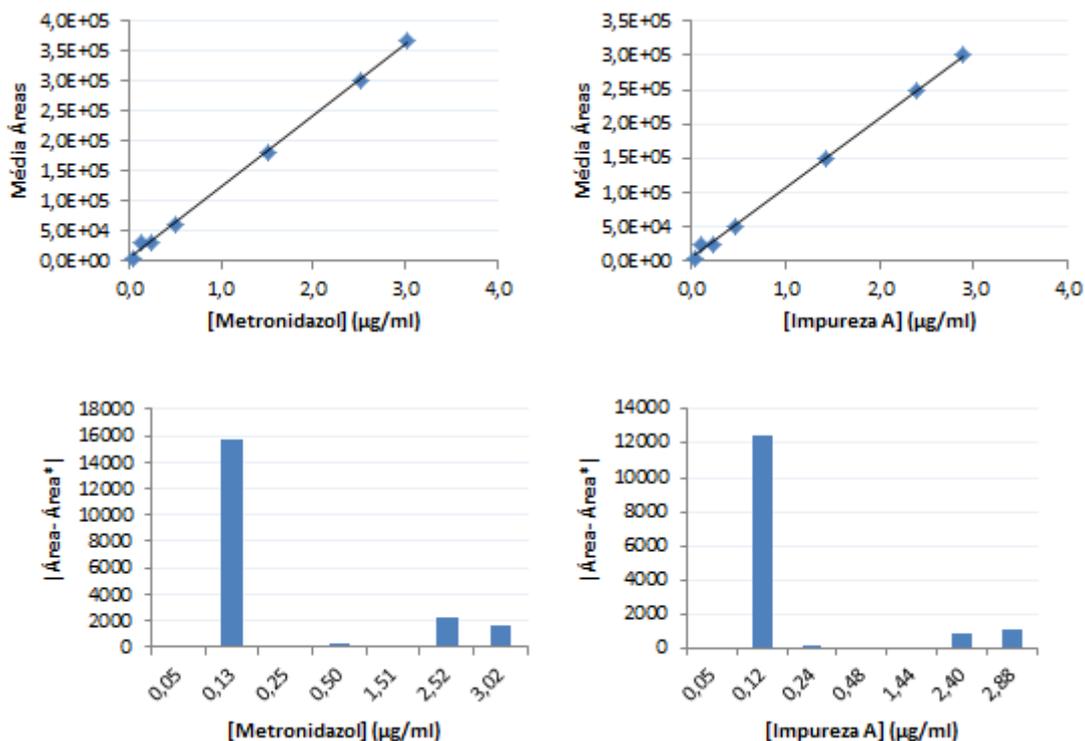


Fig. 4.4 – Gráfico com as áreas geradas em função da concentração dos padrões (cima) por comparação com os valores absolutos gerados a partir de regressão robusta (baixo).

Existe uma elevada possibilidade de o padrão X_2 se tratar de um *outlier*. Para se proceder a tal verificação, executa-se novamente o teste de Mandel pondo em causa X_2 , como demonstra a Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Reavaliação do conjunto de dados colocando em causa o valor X_2 .

	Metronidazol			Impureza A	
	N=7	X2 ??		N=7	X2 ??
SS	1,91E+08	7,60E+06	SS	1,20E+08	2,07E+06
ndf	5	4	ndf	5	4
Var_fit	3,82E+07	1,90E+06	Var_fit	2,40E+07	5,18E+05

Utilizando a Eq. 3.4 obteve-se um valor experimental (TV) de 96,61 e 228,06 para o metronidazol e impureza A, respectivamente. Já para o valor crítico, com um grau de confiança de 99%, os resultados ficaram-se por 21,20 para ambos os casos. Assim, o valor suspeito corresponde a um valor discrepante, para ambos os casos. Fazendo jus àquilo que foi verificado, os valores deste padrão são removidos das séries de dados, verificando novamente a curva de calibração do metronidazol e da impureza A. O resultado dessa análise encontra-se descrito na Fig. 4.5 e é interpretado segundo as Tabelas 4.8 e 4.9.

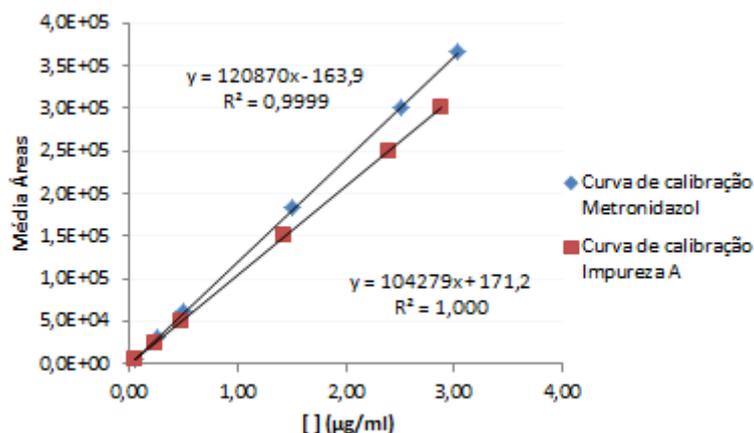


Fig. 4.5 – Curvas de calibração do Metronidazol e Impureza A, respectivamente.

Recorrendo novamente ao teste ANOVA, verifica-se a qualidade dos novos dados.

Para o metronidazol, o valor F de significância teve um decréscimo para $1,67E-09$, tal como acontece com o valor de prova do parâmetro b_1 que possui a mesma verba. A probabilidade do valor da ordenada na origem ser igual a zero é de 85,8%.

No que se refere à impureza A, verificou-se uma diminuição do valor experimental de Fisher e do valor de prova referente ao declive para $2,72E-10$, em ambos os casos. Já a probabilidade do parâmetro b_0 ser nulo é de 72,1%.

Com estas novas regressões realizadas, é perceptível em como o valor de prova aumentou de aproximadamente 27,0% para 85,7% no caso de metronidazol e de 22,9% para 72,1% para a impureza A. Da mesma forma se observa que o coeficiente de correlação melhorou ligeiramente. Assim, pode dizer-se que os dois compostos apresentam excelentes curvas de calibração no qual se pode depositar uma elevada confiança nos resultados então obtidos.

Tal como já tinha sido referenciado os valores limite para validação do método no subcapítulo 2.2.6, demonstra-se que todos os valores se situam dentro dos critérios de aceitação para a linearidade. Em suma, tem-se que para o Metronidazol tem-se $R^2 = 0,9999$, F de significância $= 1,67E-09$, valor p ($y=0$) $= 0,86$ e valor p (declive) $= 1,67E-09$. Já para a Impureza A obteve-se $R^2 = 1,000$; F de significância $= 2,71E-10$, valor p ($y=0$) $= 0,72$ e valor p (declive) $= 2,17E-10$.

4.1.1.3 - Repetibilidade de Injecção

Este ensaio advém da necessidade de saber qual a variação que o método apresenta para um dado número de repetições.

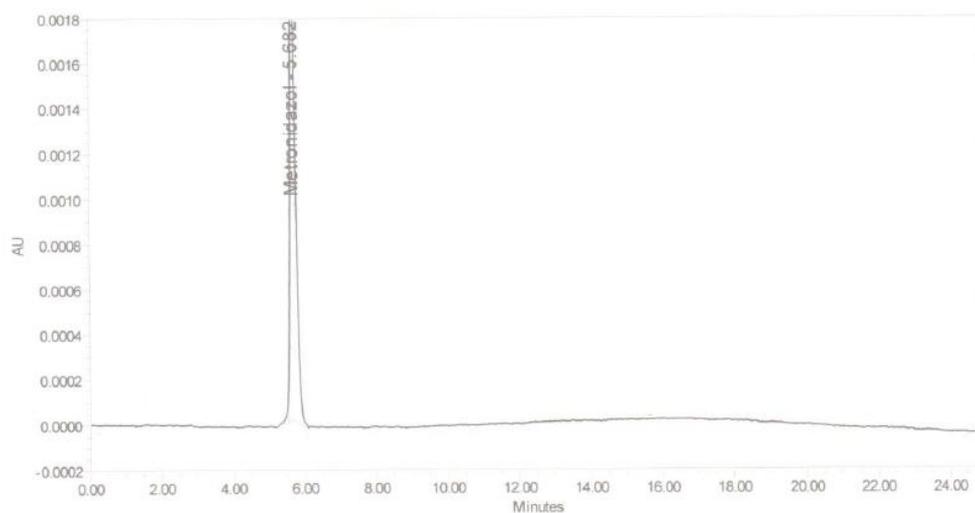


Fig. 4.6 – Cromatograma da solução-padrão a 100% de Metronidazol.

Tabela 4.6 – Repetibilidade de 5 injeções da solução-padrão a 100% de Metronidazol.

Injeção	Área Metronidazol
1	304370
2	306083
3	307900
4	310508
5	310273
Média	307827
CV	0,8

Segundo a Tabela 4.6 averigua-se que, ao fim de 5 injeções independentes de uma mesma solução, o coeficiente de variação do método é de apenas 0,8%. A repetibilidade de injeção torna-se deste modo um parâmetro aceitável visto o critério não ultrapassar o limite de aceitabilidade de 1,0.

4.1.1.4 - Precisão Intermédia

Analisando as doze soluções-teste preparadas, agora em conjunto, investiga-se a precisão intermédia da série de dados (Tabela 4.7). As soluções foram preparadas pelo mesmo analista, em dias diferentes.

Tabela 4.7 – Precisão intermédia de doze amostras independentes de Metronidazol.

	TR	Área	[] (mg/mL)	%
Dia 1	5,6	61617	0,511	102,2
	5,6	60546	0,502	100,5
	5,6	61107	0,507	101,4
	5,6	62511	0,519	103,7
	5,6	60599	0,503	100,5
	5,6	62198	0,516	103,2
Dia 2	5,7	60106	0,499	99,7
	5,7	61611	0,511	102,2
	5,7	60797	0,504	100,9
	5,7	61116	0,507	101,4
	5,7	58626	0,486	97,3
	5,7	59516	0,494	98,8
Média	5,7	60863	0,505	101,0
CV	0,5	1,8	1,8	1,8

O coeficiente de variação total é de 1,8%. Realizando uma análise da variância pelo ANOVA, o grau de similaridade entre os resultados obtidos é de 50%, fazendo com que exista uma probabilidade de os valores serem concordantes.

Assim, este critério cumpre com os critérios de aceitação na medida em que o limite é de 10,0%.

4.1.1.5 - Exactidão

Foram preparadas três soluções-placebo a 80%, 100% e 120% de modo a compreender a recuperação de metronidazol que se consegue obter.

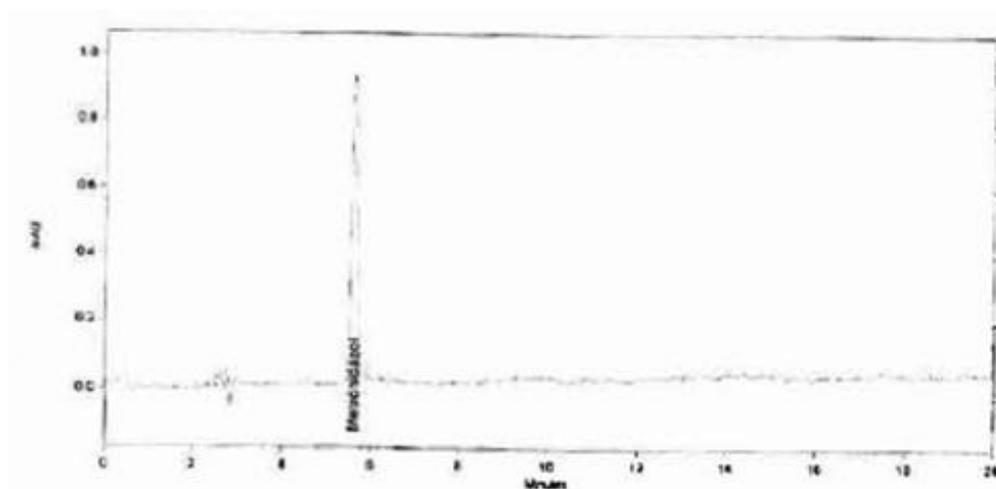


Fig. 4.7 – Solução-placebo fortificada a 120% com Metronidazol S.A..

Tabela 4.8 – Percentagem de recuperação de três soluções-placebo fortificados com Metronidazol S.A..

Placebo a 80%				
	[] teórica (µg/ml)	Área	[] obtida (µg/ml)	% Recuperação
Amostra 1	0,201	25055	0,209	104
Amostra 2		25354	0,210	105
Amostra 3		25255	0,210	104
Placebo a 100%				
	[] teórica (µg/ml)	Área	[] obtida (µg/ml)	% Recuperação
Amostra 1	0,251	31331	0,264	105
Amostra 2		31825	0,266	106
Amostra 3		32288	0,268	107
Placebo a 120%				
	[] teórica (µg/ml)	Área	[] obtida (µg/ml)	% Recuperação
Amostra 1	0,301	36531	0,307	102
Amostra 2		37079	0,309	102
Amostra 3		37261	0,309	103

De acordo com a Tabela 4.8, temos uma taxa de recuperação média de 104% para a solução-placebo a 80%, de 106% para a solução-placebo a 100% e uma recuperação de 102% para a solução-placebo fortificada a 120%.

Realizando o teste *t* de Student, averigua-se que as concentrações obtidas são semelhantes às concentrações teóricas.

Verifica-se, então, que a exactidão cumpre com as normas estabelecidas de aceitação.

4.1.1.6 - Robustez

O ensaio da robustez foi realizado com soluções-padrão a 100%.

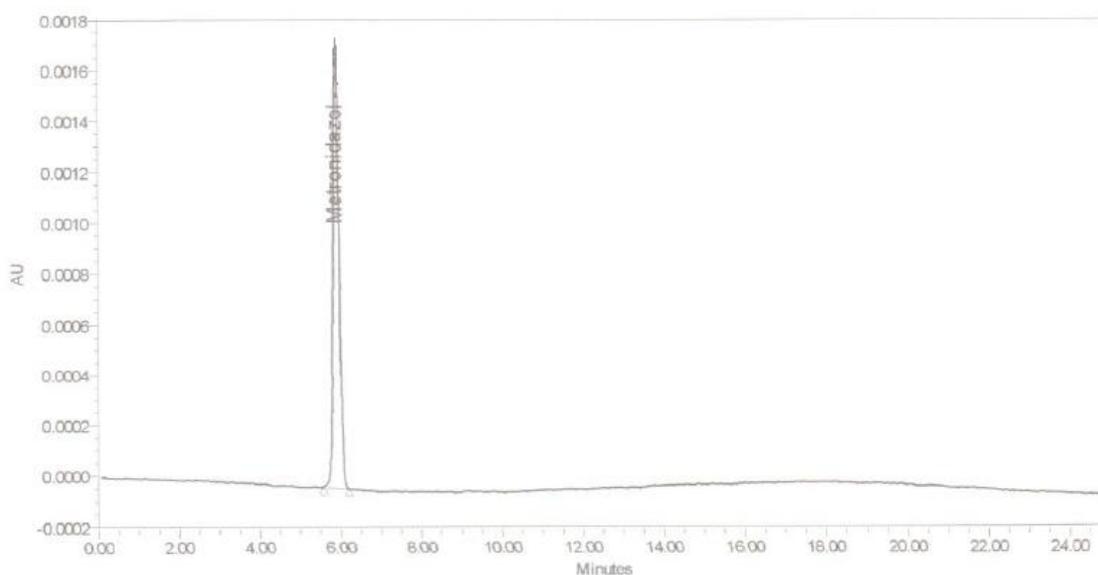


Fig. 4.8 – Solução-amostra a 100% de metronidazol, após 48h, em bancada.

Tabela 4.9 – Estabilidade das soluções-teste, após 24h e 48h, mantida no auto-injector e em bancada.

Solução - Teste	Área média	Factor de similaridade	CV
Pad_100%	60066		
24h_10°C	60278	100,4	0,7
24h_25°C	60471	100,7	0,4
48h_25°C	60025	99,9	0,2

Segundo os coeficientes de variação calculados, após 48h o factor de semelhança com a solução-padrão a 100% é de praticamente 100%, o que evidencia que quase não existiu nenhuma alteração. Outra prova disso deve-se ao baixo coeficiente de variação de que existe 48h depois de a solução-padrão ter sido preparada.

O critério da robustez está de acordo com o critério de aceitação ($CV \leq 2,0\%$), estabelecidos pela Farmacopeia Europeia.

4.1.1.7 – Análise da Matéria-Prima de Metronidazol

Chegada à conclusão de que todos os parâmetros encontram-se dentro dos seus níveis de aceitação, é já possível afirmar que a validação do método para as substâncias aparentadas do metronidazol foi conseguida.

Sendo a matéria-prima do metronidazol utilizada para o fabrico do produto acabado, procedeu-se à sua respectiva análise.

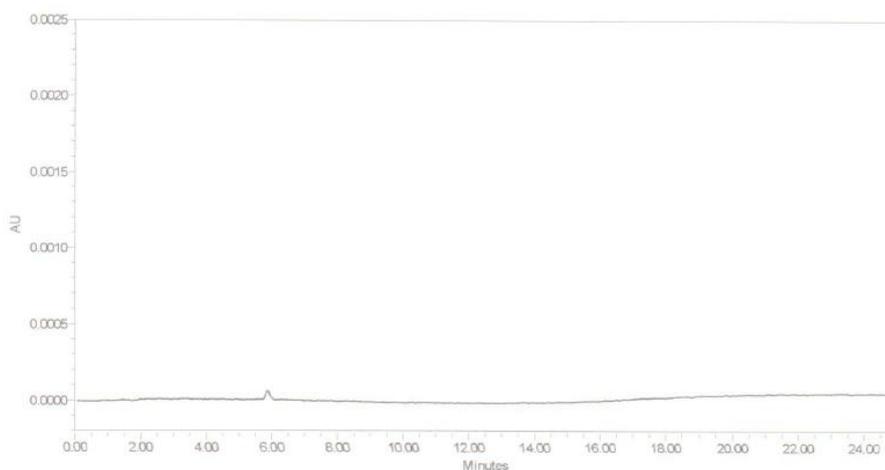


Fig. 4.9 – Cromatograma correspondente à fase móvel.

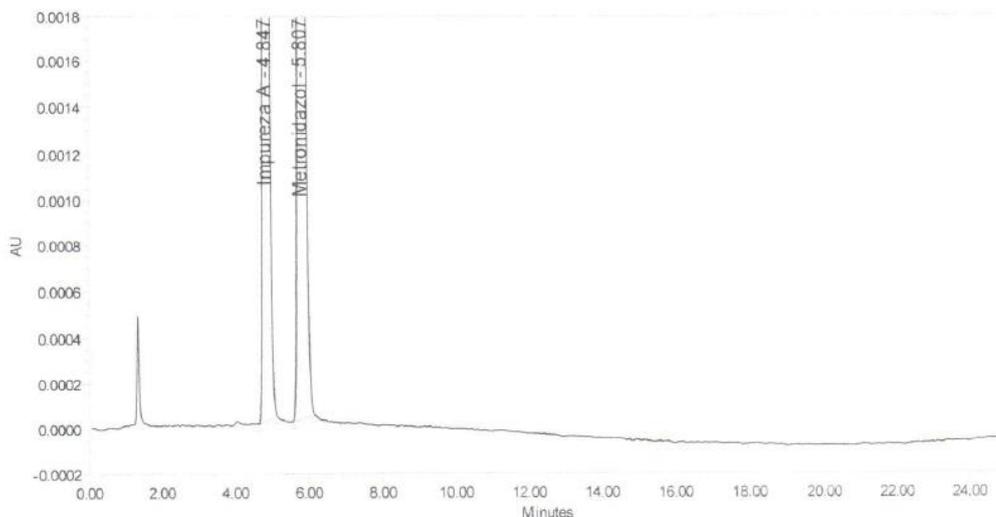


Fig. 4.10 – Adequabilidade do sistema.

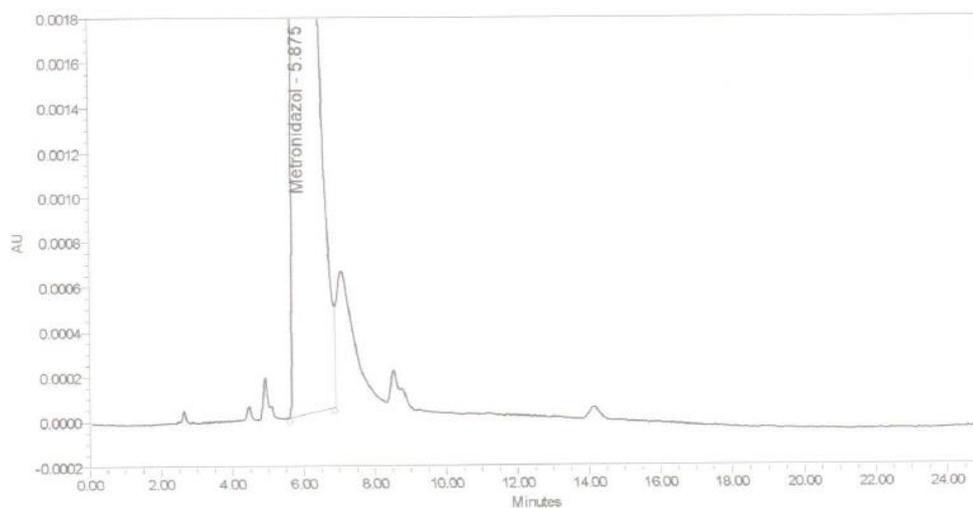


Fig. 4.11 – Análise da matéria-prima de metronidazol.

Tabela 4.10 – Resultados correspondentes ao Metronidazol.

	Valor obtido	Valor Crítico
Metronidazol (%)	100,7%	99,0 - 101,0%
Qualquer Impureza Individual (%)	n.d.	0,1%
Total Impurezas (%)	n.d.	0,2%

Como se verifica, esta matéria-prima pode ser utilizada, na medida em que todos os valores experimentais se encontram abaixo dos respectivos valores limite.

4.2 – Solução de Metronidazol 5 mg/ml

Através de cartas de controlo serão demonstrados os estudos de estabilidade do produto acabado durante os períodos de 6 meses – estudo de estabilidade em condições aceleradas – e de 12 meses – estudos em condições de longo-termo e em condições intermédias.

Por fim, serão apresentados os resultados referentes ao estudo de fotoestabilidade.

4.2.1 – Estudo de Estabilidade

Sempre com o objectivo focado em prever qual a validade do produto acabado, desenvolveram-se três tipos de estudo: em condições de longo-termo, intermédias e aceleradas. A adequabilidade do sistema é comum a todas as experiências a seguir detalhadas, apresentando uma resolução de 3,7, resultado esse superior ao critério referenciado de ser superior a 2.

Chega-se assim à conclusão de que os picos apresentam uma boa resolução e que se encontram bem diferenciados entre si.

4.2.1.1 - Condições de Longo-Termo

Ao fim de doze meses, a estabilidade do processo resume-se à Tabela 4.10 e à Fig. 4.13 tratando-se da média dos ensaios realizados, em duplicado, para cada tempo.

Tabela 4.10 – Resultados do estudo de estabilidade em condições de longo-termo, em percentagem.

	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Doseam. Metronidazol (%)	99,2	99,9	96,2	100,7	98,8
Impureza A (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas (%)	0,02	0,02	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Totais (%)	0,02	0,02	n.d.	n.d.	n.d.

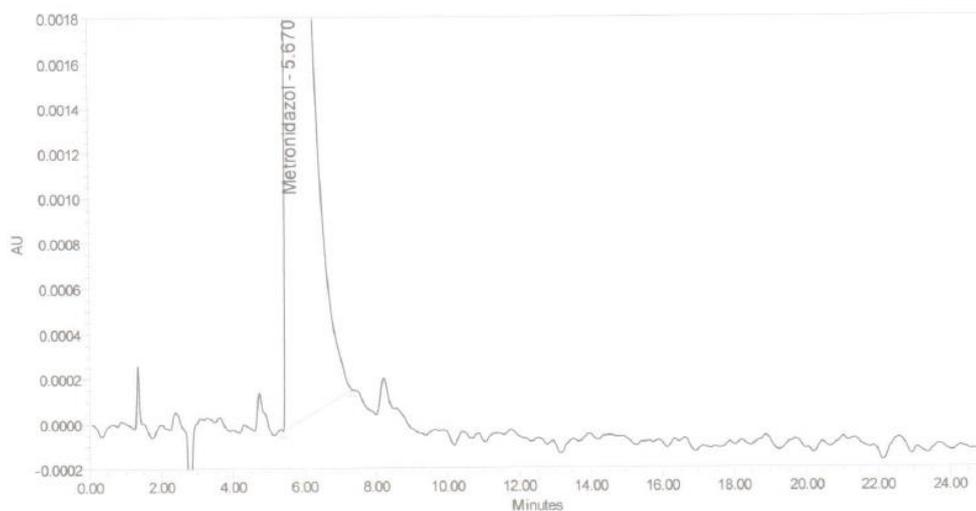


Fig. 4.12 – Cromatograma-tipo obtido para quantificar a substância activa e as substâncias relacionadas.

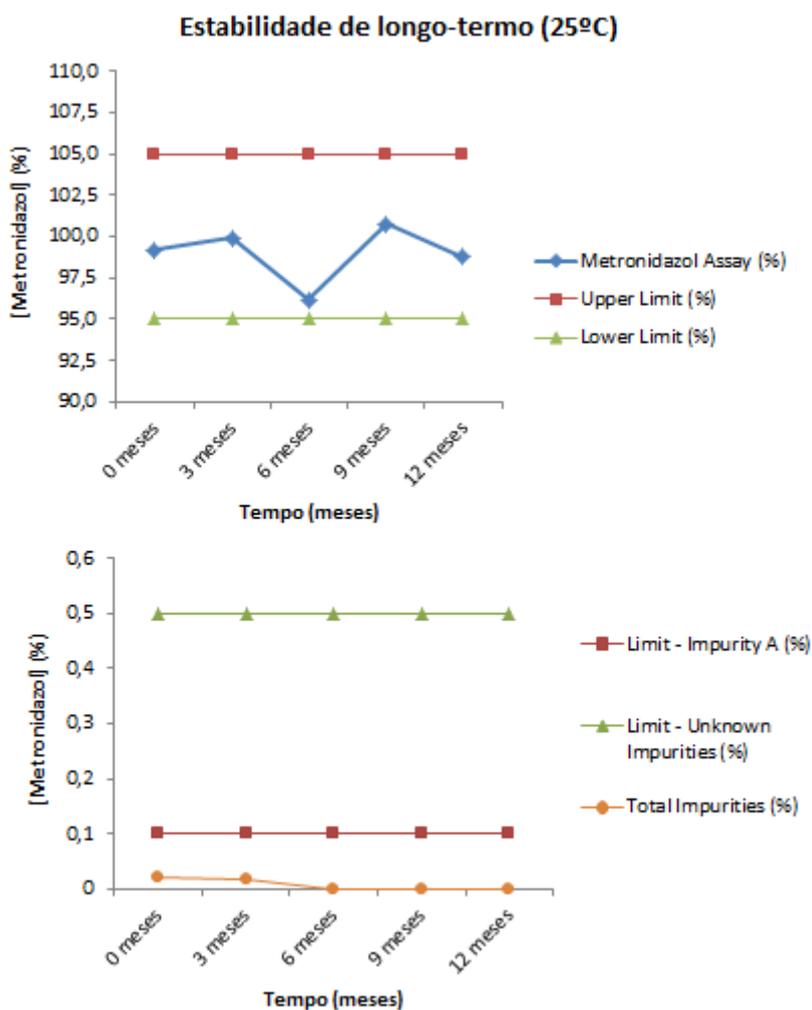


Fig. 4.13 – Estudo de estabilidade em condições de longo-termo.

Segundo os dados apresentados, os valores são concordantes tanto para o teor de metronidazol como para a quantidade de substâncias relacionadas. Enquanto os níveis de metronidazol flutuam ligeiramente entre os limites de especificação, as substâncias relacionadas assentam em valores muito baixos que, com o tempo, tornam-se indefinidos por apresentarem picos inferiores ao limite de exclusão através do pico base da solução de referência (a). Os valores atribuídos têm em conta o factor de correcção, correspondente à perda de água, de 1,5.

Por esta altura, em tempo real, o estudo de estabilidade de longo-termo continua a decorrer até uma duração de, pelo menos, 36 meses. Assim, no tempo decorrido apenas podemos concluir que o lote de produto acabado possui resultados estáveis ao fim de 12 meses.

4.2.1.2 - Condições Intermédias

Ao fim de doze meses, a estabilidade do processo resume-se à Tabela 4.11 e à Fig. 4.15. Tratam-se da média dos ensaios realizados, em duplicado, para cada tempo.

Tabela 4.11 – Resultados do estudo de estabilidade em condições intermédias.

	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Doseam. Metronidazol (%)	99,2	100,7	99,7	101,4	99,1
Impureza A (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas (%)	0,02	0,01	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Totais (%)	0,02	0,01	n.d.	0	0

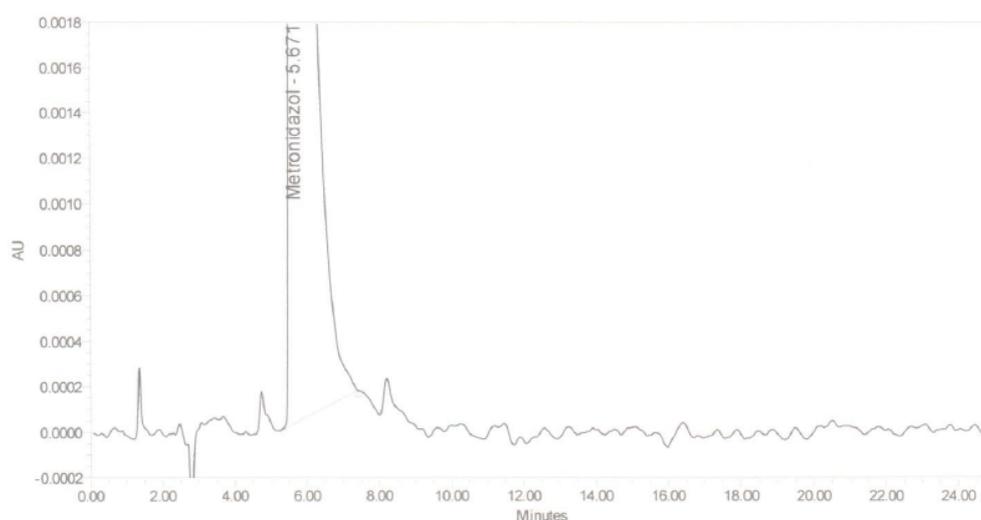


Fig. 4.14 – Cromatograma-tipo obtido para quantificar a substância activa e as substâncias relacionadas.

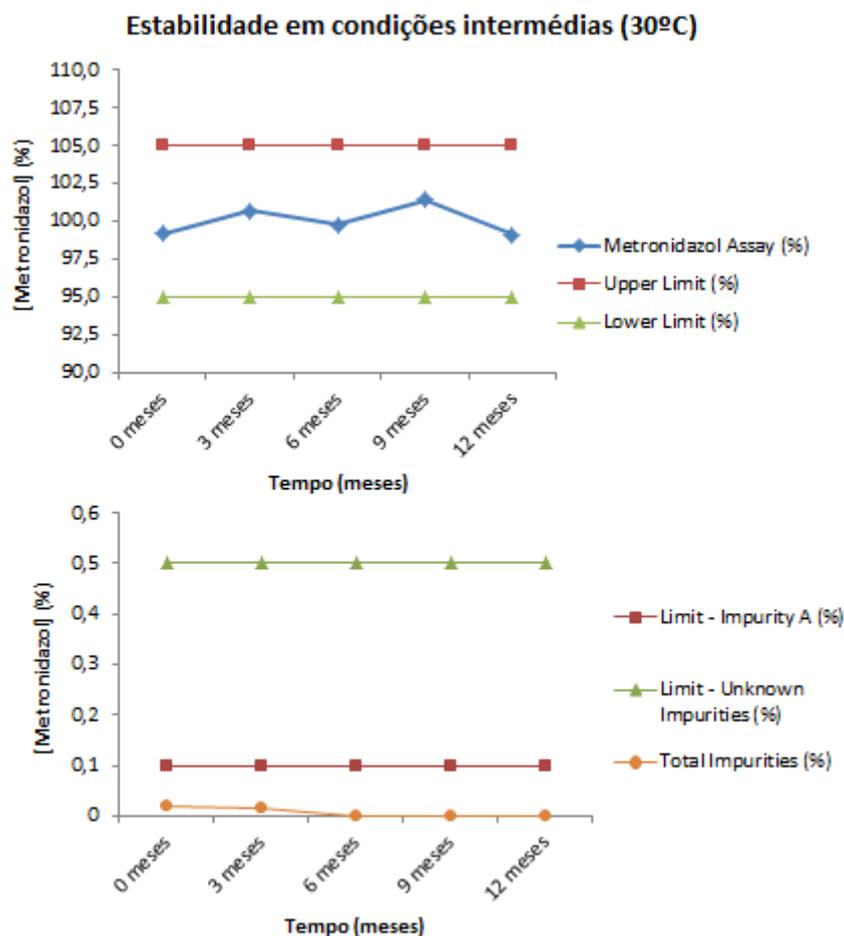


Fig. 4.15 – Estudo de estabilidade em condições intermédias.

O estudo de estabilidade em condições intermédias apresenta resultados concordantes com os critérios de especificação do produto acabado. A concentração de metronidazol situa-se em torno dos 99-100%, enquanto as substâncias aparentadas se apresentam níveis muito baixos – tanto que a partir dos 6 meses já nem é possível quantificar a sua presença por apresentar picos inferiores aos do limite de exclusão, proporcionado pela solução de referência (a). Os valores atribuídos têm em conta o factor de correcção, correspondente à perda de água, de 1,9.

Este tipo de estudo termina aos 12 meses. Deste modo, tratando-se de um estudo em que as condições de degradabilidade do produto são mais susceptíveis de acontecerem, é possível admitir que a solução de Metronidazol 5mg/ml para perfusão tem, pelo menos, uma validade de três anos (36 meses – duração do estudo).

4.2.1.3 - Condições Aceleradas

Ao fim de doze meses, a estabilidade do processo resume-se à Tabela 4.12 e à Fig. 4.17, tratando-se da média dos ensaios realizados, em duplicado, para cada tempo.

Tabela 4.12 – Resultados do estudo de estabilidade em condições aceleradas.

	0 meses	3 meses	6 meses
Doseam. Metronidazol (%)	99,2	100,6	99,1
Impureza A (%)	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas (%)	0,02	0,02	n.d.
Impurezas Totais (%)	0,02	0,02	n.d.

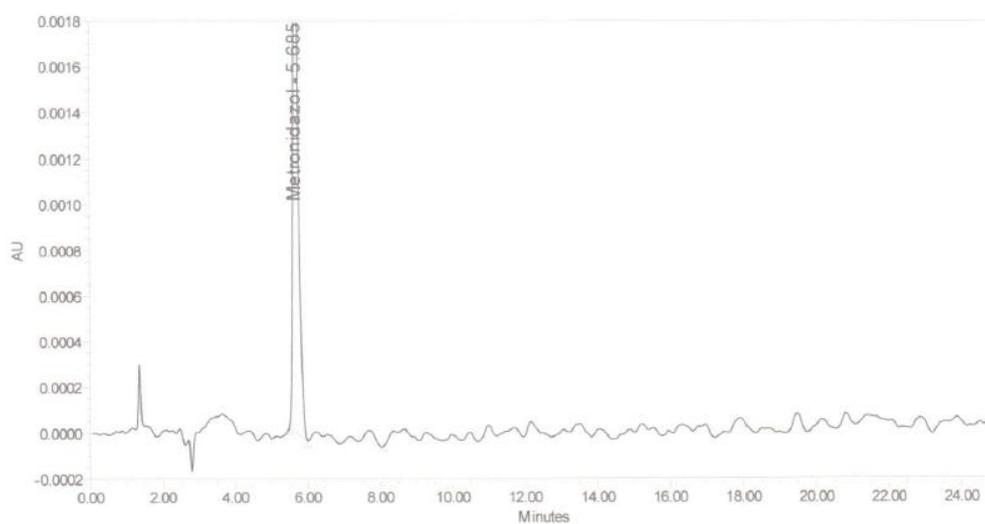


Fig. 4.16 – Cromatograma-tipo obtido para quantificar a substância activa e as substâncias relacionadas.

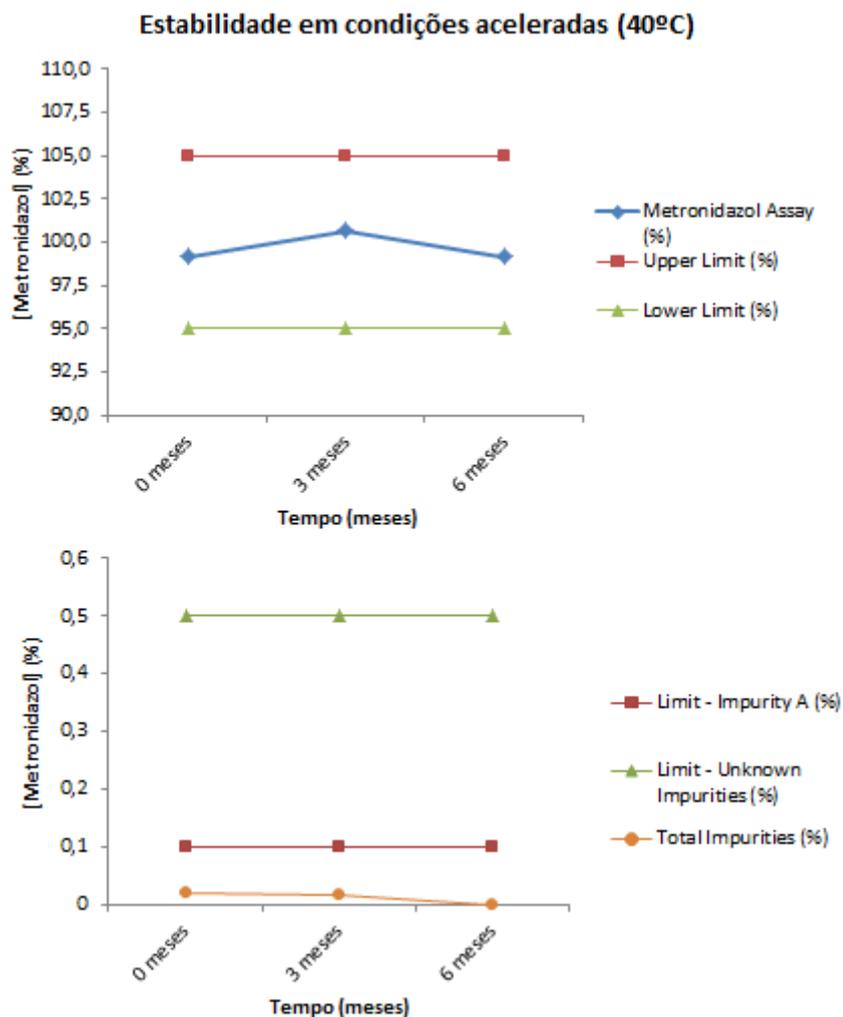


Fig. 4.17 – Estudo de estabilidade em condições aceleradas.

Os resultados gerados por este estudo demonstram que o produto acabado se encontra dentro dos seus respectivos critérios de especificação. A quantidade de metronidazol presente oscila entre 99-101% e as substâncias aparentadas encontram-se a níveis muito baixos. Os valores atribuídos têm em conta o factor de correcção, correspondente à perda de água, de 3,0.

Sendo o estudo de estabilidade em condições aceleradas uma investigação do produto acabado que termina ao fim de 6 meses, conclui-se que nenhum parâmetro analisado foge dos limites de especificação. Este tipo de estudo comporta um nível de degradação muito rápida do produto servindo para estimar, num curto espaço de tempo, se o produto se mantém fidedigno às suas propriedades originais. Tal acontece e leva-nos a concluir que o prazo de validade da solução de Metronidazol é de pelo menos 36 meses, havendo uma grande possibilidade de este prazo ser expandido, verificando entretanto com os resultados obtidos no estudo de estabilidade em condições de longo-termo (por exemplo, adicionando um tempo de análise aos 48 meses para confirmar as características do produto acabado).

4.2.2 - Estudo de Fotoestabilidade

Nesta secção, o objectivo reside em verificar como evolui o comportamento da substância activa do metronidazol presente no produto acabado, visto ser uma espécie fotossensível, e qual o impacto traduzido no número de impurezas presente em solução, sob condições muito específicas.

Foi realizada a adequabilidade do sistema, a qual se veio a verificar que apresenta uma resolução de 3,7, resultado esse superior ao critério referenciado de ser superior a 2.

Os resultados obtidos para este tipo de estudo encontram-se descritos na Tabela 4.17. Apesar de existem mais parâmetros a assinalar, eu foquei-me nos de mais relevo, como forma de continuação relativamente aos temas abordados anteriormente neste trabalho.

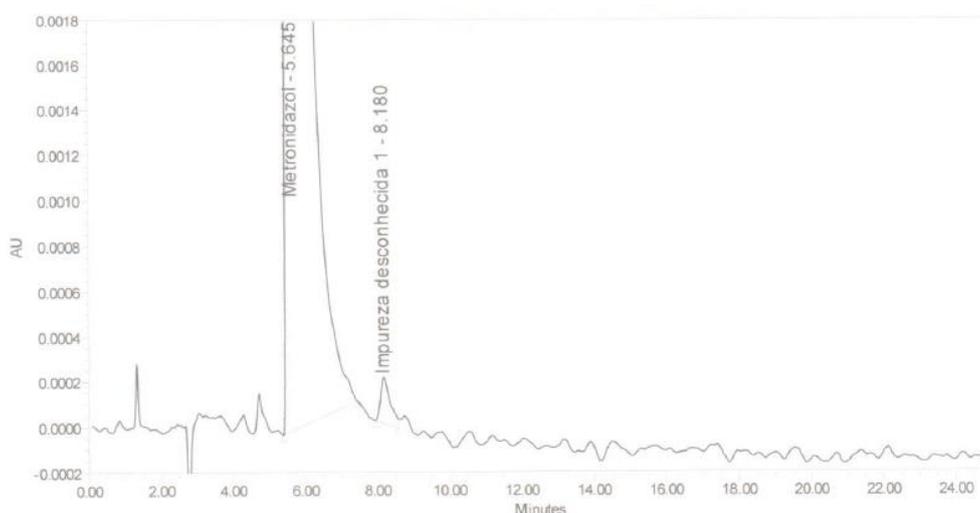


Fig. 4.18 – Cromatograma associado a todos os tipos de estudos de fotoestabilidade.

Como tal, todos os parâmetros assinalados encontram-se dentro dos limites de especificação para o produto acabado. Mantendo a concentração de Metronidazol ligeiramente constante, na ordem dos 99-100%, a presença das substâncias aparentadas também são perseverantes representando, no máximo, 0,02% da quantidade total de impurezas.

Uma conclusão evidente a retirar deste estudo é o facto de mostrar que as condições de acondicionamento do produto acabado, em frasco de propileno, são óptimas. Comparando os valores obtidos com os casos do frasco de âmbar e com o controlo negativo (frasco com revestimento de alumínio), temos uma elevada semelhança nos resultados gerados. Temos, então, a demonstração em como o frasco de propileno protege a substância activa de metronidazol, presente na solução de Metronidazol 5 mg/ml para perfusão, da luz. Outro factor a salientar, além da protecção que exerce contra a luminosidade, assenta no estado das substâncias aparentadas se manterem inalteráveis.

Tabela 4.13 – Sumário do estudo de fotoestabilidade em duas fases para o lote G36445 – estudo confirmatório e de degradação forçada.

Descrição do Acondicionamento	Frasco de vidro incolor 100ml			Frasco de vidro âmbar 100ml			Frasco de propileno 100ml, selada com rolha de borracha e com tampa flip-flop de cor branca			Frasco de propileno 100ml, selada com rolha de borracha e com tampa flip-flop de cor branca, envolto em alumínio		
	Estudo			Estudo			Estudo			Estudo		
Especificações	Tempo Inicial	1ª Fase	2ª Fase	Tempo Inicial	1ª Fase	2ª Fase	Tempo Inicial	1ª Fase	2ª Fase	Tempo Inicial	1ª Fase	2ª Fase
Descrição	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Doseam. Metronidazol (95,0 - 105,0%)	99,2%	99,2%	98,6%	99,2%	100,2%	100,0%	99,2%	100,0%	99,4%	99,2%	99,8%	100,0%
Impureza A $\leq 0,1\%$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas $\leq 0,5\%$	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%
Total de impurezas $\leq 1,0\%$	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%

Capítulo 5

Conclusão

As substâncias aparentadas são produtos secundários formados no fabrico do metronidazol e, como tal, devem ser quantificadas. A impureza A tem capacidade de se interligar com a substância activa durante o seu processo de síntese. Existe, portanto, a necessidade de averiguar a influência desta impureza, bem como o de outras também associadas ao metronidazol.

O primeiro objectivo deste trabalho, a validação de um método analítico para as substâncias aparentadas do metronidazol, foi conseguido. Através da realização de ensaios específicos para um conjunto de parâmetros (como a adequabilidade do sistema, linearidade, repetibilidade da injeção, precisão intermédia, exactidão e robustez) verifica-se que os valores obtidos se encaixam dentro dos critérios estabelecidos, segundo a *Farmacopeia Europeia*, para a validação deste método. Assim, esta aprovação permite realizar posteriormente os estudos de estabilidade e fotoestabilidade da solução para perfusão de Metronidazol 5 mg/ml, no qual o operador sabe que pode ter confiança nos resultados que produz.

O estudo da estabilidade do lote G36645 foi dividido em três partes: estabilidade em condições de longo-termo, intermédias e aceleradas. Veio a confirmar-se que ao fim de 12 meses o teor de metronidazol situa-se nos 99-100% e a quantidade de substâncias relacionadas (impureza A e impurezas desconhecidas) coloca-se em valores mínimos, inferiores ou iguais a 0,02%. O estudo de estabilidade só termina ao fim de 36 meses. Contudo, a qualidade dos resultados gerados pelos estudos em condições intermédias e aceleradas, entretanto já terminados, transmitem a garantia em como o prazo de validade do produto – associado ao seu tempo de estudo da estabilidade – pode ser alargado.

O estudo da fotoestabilidade pretende averiguar como “reage” o metronidazol, enquanto substância activa em solução, à presença de luminosidade, visto ser uma espécie que é fotossensível. Realizando a amostragem em diversos tipos de acondicionamento, confirma-se que o teor de metronidazol gira em torno dos 100% e as substâncias relacionadas registam valores mínimos. Isto leva à conclusão de que a embalagem de acondicionamento do produto acabado reúne as condições ideais para “acolher” a solução de Metronidazol 5 mg/ml, após comparação nas mesmas condições com frascos incolor e de âmbar e realizando um controlo negativo, através de um frasco de propileno revestido em alumínio.

Referências Bibliográficas

- [1] “A Indústria Farmacêutica e a Saúde Global: Factos e Números – 2011”; International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations; Suíça; 2011.
- [2] “Company Report: Generic Drug in Europe and The United States for Year 2013”; *European Generic Medicines Association*; Brussels, Belgium; 2013.
- [3] “Fortune 500 – Annual Ranking of America’s Largest Corporations”; *Fortune Magazine*; USA; 2012.
- [4] “Research and Development in the Pharmaceutical Industry”; Congressional Budget Office, Congress of the United States; USA; 2010.
- [5] “Generic Drugs: World Market 2013-2023”; Global Generic Drug Industry; 2012.
- [6] – “A Indústria Farmacêutica em Números”, 1ª Edição; Apifarma – Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica; 2012.
- [7] “Inovação e I&D na Indústria Farmacêutica Portuguesa – Caso Bial”; Lídia M. M. T. Carvalho, Hélder V. Silva; Faculdade de Economia da Universidade do Porto; Portugal; 2007.
- [8] “As Estratégias de Comunicação da Indústria Farmacêutica em Portugal”; Inês M. M. Aroso; Biblioteca On-line de Ciências da Comunicação; Universidade Fernando Pessoa; Lisboa, Portugal; 2011.
- [9] “Analytical Chemistry Today and Tomorrow” in “Analytical Chemistry”; Ira S. Krull, Miguel Valcárcel, Isydr Apostol, Drew Kelner; Northeastern University, Boston; Boston, USA; - First Edition; Croácia; 2012.
- [10] “Analytical Chemistry” – 2nd Edition; R. Kellner, J.M. Mermet, M. Otto, H.D. Widmer, M. Valcárcel; Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha; 2004.
- [11] “Dustbuster: a Compact Impact-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer for *in situ* Analysis of Cosmic Dust” in *Rev. Sci. Instrum.* ; D.E. Austin, T.J. Ahrens, J.L. Beauchamp; 2002.
- [12] “Mars Watery Mysteries” in *C&E News (ACS)*, December 1; E.K. Wilson; 2008
- [13] “Gas Standards Development in Support of NASA’s Sensor Calibration Program Around the Space Shuttle” in *Analytical Chemistry* (2009); G.G. Rhoderick, W.J. Thor III, W.R. Miller Jr. F.R. Guenther, E. J. Gore, T.O. Fish; 2011.
- [14] “Analytical Connotations of Point-of-Care-Testing” in *Analyst*; E. Aguilera-Herrador, M. Cruz-Vera, M. Valcárcel; 2010.
- [15] “Quality Assurance In Analytical Chemistry – Analytical Techniques in the Sciences”; E. Prichard, V. Barwick; John Wiley & Sons, Ltd.; LGC, Teddington, UK; 2007.

- [16] "Farmacopeia Europeia – 7th Edition"; Farmacopeia Europeia Commission; 2010.
- [17] "Impurities in New Drug Substances Q3A(R2)" – Current Step 4 Version; ICH Harmonised Tripartite Guideline; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2006.
- [18] "Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5)" – Current Step 4 Version; ICH Harmonised Tripartite Guideline; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2011.
- [19] "Good Manufacturing Practice Guide For Active Pharmaceutical Ingredients" – Current Step 4 Version; ICH Harmonised Tripartite Guideline; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2000.
- [20] "Determinação de Antioxidantes por HPLC com Detecção Electroquímica"; Sara Margarida da Costa Gomes; Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; 2010.
- [21] "Drug Profiling: O Caso da Heroína"; Tânia Afonso Pais; Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; 2011.
- [22] "Desenvolvimento e Operação de Programas de Ensaio de Proficiência"; Gilberto B. Souza; Embrapa Pecuária Sudeste; Brasil; 2010.
- [23] "Principles and Practice of Analytical Chemistry", Fifth Edition; F. W. Fifield, D. Kealey; Kingston University, University of Surrey, UK; 2000.
- [24] "Síntese e Aplicação de Nanocompostos de Titânio na Fotodegradação de Alprazolam"; Diana Rosa de Oliveira Freitas; Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; 2013.
- [25] "Modern Analytical Chemistry"; David Harvey; DePauw University, Indiana, USA; 2000.
- [26] "Principles of Instrumental Analysis" – Fifth Edition; Skoog, Holler & Nieman; Saunders College Publishing; 1998.
- [27] "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry" – 6th ed.; J. Miller, J. Miller; 2010.
- [28] "Valid Analytical Methods and Procedures"; Christopher Burgess; Burgess Consultancy, Royal Society of Chemistry; County Durham, UK; 2000.
- [29] "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications – Vol. 162; Somenath Mitra, J. D. Winefordner; Department of Chemistry and Environmental Science; New Jersey Institute of Technology; USA; 2003.
- [30] "Robust Regression and Outlier Detection with the ROBUSTREG Procedure" – Statistics and Data Analysis; Colin Chen; SAS Institute Inc.; Cary, NC, USA; 1999.

- [31] “Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão”; Pesticidas: R. Ecoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, pp. 129-146, Jan/Dez, 2003; Natilene M. Brito, Ozelito P. A. Junior, Luciana Polese, Maria L. Ribeiro; Curitiba, Brasil; 2003.
- [32] “Vogel’s Textbook of Quantitative Chemical Analysis” – Fifth Edition; G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney; School of Chemistry, Thames Polytechnic; London, UK; 1989.
- [33] “Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos” Andréia de Paula Silva, Míriam C. C. Alves; ENQUALAB – Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia; Escola SENAI Mário Amato, São Bernardo do Campo, Brasil; Environ Científica Lda., São Bernardo do Campo, Brasil; São Paulo, Brasil; 2006.
- [34] “Controlo de Qualidade Analítica Aplicado a Laboratórios de Controlo e Qualidade da Água”; Gean P. G. Motta; 19º Congresso ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; 2001.
- [35] “Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos” – Revisão 02; INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Portugal; 2007.
- [36] “Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation; Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste and D.L. Massart; Vrije Universiteit Brussel, ChemoAC, Pharmaceutical Institute, Brussel, Belgium; Unilever Research Vlaardingen, Vlaardingen, The Netherlands; 2008.
- [37] “Quality Control in Analytical Chemistry”, Second Edition; G. Kateman, L. Buydens; Department of Analytical Chemistry, Catholic University of Nijmegen; Netherlands; 1993.
- [38] “Controlo Estatístico do Processo”; José Luis Duarte Ribeiro, Carla Schwengber tem Caten; Escola de Engenharia Federal do Rio Grande do Sul, Brasil; 2012.
- [39] “Dean’s Analytical Chemistry Handbook”, Second Edition; Pradyot Patnaik; McGraw-Hill Handbooks; 1995.
- [40] “Controlo da Qualidade”; Manuel António Facas Vicente”; Departamento de Matemática, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; 2009.
- [41] “Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica”; K. E. R. Silva, L. D. S. Alves; M. F. R. Soares, A. R. Faria, P. J. Rolim Neto; Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2009 – 30(2), pp. 129-135; 2009.
- [42] “Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q1A(R2)” – Current Step 4 Version; ICH Harmonised Tripartite Guideline; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2003.
- [43] “Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B” – Current Step 4 Version; ICH Harmonised Tripartite Guideline; International Conference on

Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 1996.

[44] “Validação de um Método Analítico: Determinação do Fósforo Total”; Maria do Rosário da Silva Almeida; Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal; 2012.

[45] “Ensaio de Tratamentos Térmicos em Vinhos Tintos – Efeitos na Composição Físico-Química e Análise Sensorial”; Manuel Maria Rosado Louret Ezequiel; Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa; Faculdade de Ciências, Universidade do Porto; Portugal; 2010.

[46] “Guia de Validação e Controlo da Qualidade Analítica – Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários”; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Brasil; 2009.

[47] “Quantificação das Incertezas nas Medições Analíticas” – Segunda Edição; Maria Filomena G. F. C. Camões; Guia Eurachem/Citac; 2000.

[48] “Estimação Robusta para o Modelo de Regressão Linear Logística”; Natália B. Barbieri; Instituto de Matemática, Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil; 2012.

[49] “Ensaio de Proficiência em Condutividade Electrolítica”; Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Brasil; 2006.

[50] “Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC para Determinação de Midazolam em Formulações Farmacêuticas de Uso Humano e Veterinário”; Nájla Mohamad Kassab, Lisandra G. R. Langue; Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil; 2009.

[51] “Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy”; T. Owen; Hewlett-Packard; 1996.

[52] “Princípios de Análise Instrumental” – 5ª Edição; Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman; Bookman; São Paulo, Brasil; 2002.

[53] “Métodos Instrumentais para Análise de Soluções” – 4ª Edição; Maria de Lurdes Gonçalves; Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa; 2001.

[54] “Physicochemical Principles of Pharmacy” – Third Edition; Alexander T. Florence, David Attwood; Pharmaceutical Press; London; 2011.

[55] “Especificações da Qualidade Analítica”, José Carlos Basques; Labtest; 2009.

[56] “Aplicação do Controlo Estatístico de Processo na Indústria Farmacêutica”; Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 27, nº. 3, pp177-187, 2006; A. A. N. Lima, J. R. Lima, J. R. B. Alencar, J. L. Soares-Sobrinho; Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil; 2006.

[57] “Desenvolvimento Farmacêutico e Validação do Método Analítico de uma Suspensão Contendo Paracetamol”; Ana Filipa Pinheiro Vilela Ferreira; Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal; 2010.

Anexos

A.1 - Classes de Risco de Solventes Residuais

Como já anteriormente mencionado, os solventes susceptíveis de se considerarem *solventes residuais*, além de não constituírem nenhuma forma terapêutica benéfica, a sua remoção permite satisfazer as especificações do produto, práticas de produção ou outros requisitos de qualidade. Assim, os produtos farmacêuticos produzidos não devem conter solventes residuais mais elevados do que possam ser suportados, por uma questão de segurança.

Assim, as classes de risco associadas a solventes residuais classificam-se nas seguintes categorias:

- Classe 1: solventes a evitar utilizar por se tratar de agentes cancerígenos, ou com forte suspeita de serem cancerígenos, e que possuem um elevado risco para o meio ambiente (ex.: dicloroetano ou tricloroetano);
- Classe 2: solventes a ser limitados por se tratar de agentes cancerígenos não-genotóxicos ou por serem agentes causadores responsáveis por outros tipos de toxicidade irreversível, como neurotoxicidade (ex.: clorobenzeno, clorofórmio, piridina);
- Classe 3: solventes com baixo potencial tóxico para os humanos, sendo que não é necessário impor um limite de exposição a uma dada espécie (ex.: etanol, heptano, acetato de isobutilo).

Os solventes presentes em cada tipo de Classe são usados na produção ou purificação de um produto, podem provavelmente ser produzidos durante o fabrico de um produto ou resultar de impurezas presentes nas espécies iniciais usadas para a génese de um produto.

A.2 - Validação do Método Analítico

Relativamente à linearidade, são descritos em mais pormenor a construção dos modelos polinomiais de 1º grau (P01) e 2º grau (P012) referidos na Secção 3.3.2.

A.2.1 - Escolha do Modelo

Para se proceder à escolha do método, primeiro, existiu a necessidade de se construírem duas ferramentas: os modelos P01 e P012. Tais ferramentas permitem chegar à conclusão de determinadas propriedades da função em causa. Tal encontra-se descrito em mais pormenor nas próximas alíneas.

- Método polinomial de 1º grau P01

Inicialmente é construída uma matriz projecto ampliada (A), que leva ao cálculo dos respectivos determinantes para cada matriz (Fig. A.1).

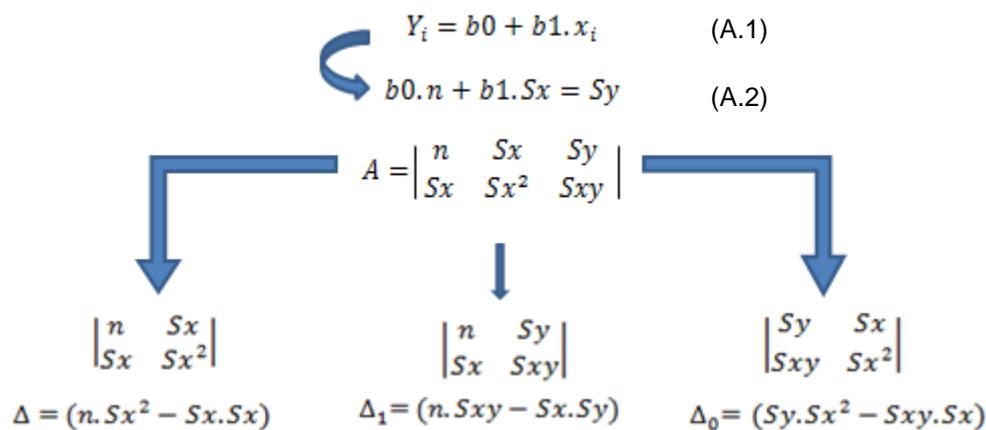


Fig. A.1 – Anagrama dos determinantes formados a partir da matriz projecto a partir de uma equação linear.

Os valores de b_0 e b_1 (Eq. A.3 e Eq. A.4) são calculados a partir dos obtidos anteriormente.

$$b_0 = \frac{\Delta_0}{\Delta} \quad (A.3)$$

$$b_1 = \frac{\Delta_1}{\Delta} \quad (A.4)$$

Por fim, para chegar ao valor experimental (TV) é necessário sabermos a função de ajuste (SS), o número de graus de liberdade (ndf) e a variância do ajuste σ_{fit}^2 .

$$SS = \sum_{i=1}^n (y_i - n_i)^2 \quad (A.5)$$

$$\sigma_{fit}^2 = \frac{SS}{ndf} \quad (A.6)$$

- Método polinomial de 2º grau P012

É uma ferramenta muito semelhante ao sistema de equações de P01, apenas difere por ser um modelo que trata de equações polinomiais.

$$y_i = b_0 + b_1.x_i + b_2.x_i^2 \quad (A.7)$$

$$A = \begin{matrix} n & Sx & Sx^2 & Sy \\ Sx & Sx^2 & Sx^3 & Sxy \\ Sx^2 & Sx^3 & Sx^2y & Sx^2y \end{matrix} \quad (A.8)$$

Uma vez mais, os valores de b_0 , b_1 e b_2 são obtidos pelas equações seguintes (Eq. A.9 – Eq. A.11).

$$b_0 = \frac{\Delta_0}{\Delta} \quad (A.9)$$

$$b_1 = \frac{\Delta_1}{\Delta} \quad (A.10)$$

$$b_2 = \frac{\Delta_2}{\Delta} \quad (A.11)$$

Para chegar ao valor experimental da ferramenta P012, utiliza-se as Eq. A.12 e A.13.

$$SS = \sum_{i=1}^n (y_i - n_i)^2 \quad (A.12)$$

$$\sigma_{fit}^2 = \frac{SS}{ndf} \quad (A.13)$$

A.2.2 – Diagnóstico de Outliers

O teste de Mandel permite, ainda, verificar se existem valores discrepantes no conjunto de dados em estudo. Tal facto pode ser observado através da construção de um esquema de regressão robusta por regressão linear (Tabela A.1). Vamos, por comparação, verificar a relação existente entre os valores da média das áreas (valores de ordenada) com os valores da média das áreas calculados experimentalmente. Isto tendo sempre por base a equação da recta, $y = b_0 + x.b_1$.

Inicialmente, tomam-se os valores de abcissas e ordenadas, ou como neste estudo, concentração em função da média das áreas. À direita, em formato de escada, temos o resultado que corresponde a:

$$\omega = \frac{(y_{n+1}-y_n)}{(x_{n+1}-x_n)} \quad (\text{A.14})$$

Tabela A.1 – Representação de um esquema de regressão robusta por regressão linear.

[] (µg/mL)	Área Média						
0,0504	5616						
0,126	31112	337249					
0,252	30348	-6063,5	122679				
0,504	61206	122452	79613,8	122553			
1,512	182082	119917	120424	108925	120735		
2,52	302527	119489	119703	120008	113373	120226	
3,024	365905	125750	121576	120912	121052	115526	121163

Ao conjunto de valores ω executa-se a mediana desses valores, permitindo-nos obter o valor do parâmetro b_1 . Assim, associando-se cada valor de concentração e respectiva média da área com o cálculo já realizado de b_1 , calcula-se o valor experimental de b_0 (Eq. A.15).

$$b_0 = y_i - x_i \cdot b_1 \quad (\text{A.15})$$

Agora é possível calcular o valor de y_i experimental para, posteriormente, ser comparado com o valor médio da área obtido inicialmente (Eq. A.16). Traçando um gráfico de barras, os valores que apresentarem maior dispersão devem ser analisados novamente, pelo teste de Mandel por exemplo, de forma a verificar se devem ser incluídos na gama de trabalho.

$$y_i^* = b_0^* + x_i \cdot b_1 \quad (\text{A.16})$$

A.3 – Padrão Primário do Metronidazol

Antecedendo a utilização do padrão primário de metronidazol, deve ser verificado se o padrão disponível se encontra em condições de ser usado. A sua verificação é realizada através do *site* <http://crs.edqm.eu>. Encontra-se, a seguir, um exemplo em como é gerado este tipo de comprovativo.



BATCH VALIDITY STATEMENT
EUROPEAN PHARMACOPOEIA REFERENCE STANDARDS (CRS) & (BRP)

*This Batch Validity Statement has to be used in conjunction
with Ph. Eur. general chapter 01/2008:51200 Reference Standards.*

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) – Council of Europe
Postal address: 7 Allée Kastner CS 30026 F - 67081 STRASBOURG (France)
Phone: +33 (0)3 88 41 30 30
Fax: +33 (0)3 88 41 27 71
Internet : <http://www.edqm.eu>

Name	Metronidazole
Catalogue code	M1850000
Batch number*	2
Assigned value	n/a
Validity	Batch 2 is valid at the printing date: 2013-8-13
Storage conditions	The standard is intended for immediate use. Recommended EDQM storage conditions for unopened containers : +5°C
Safety data	Safety Data Sheet is available from the detailed view or upon request. Click on the hyperlink to download the leaflet containing the instructions for use, if available (Adobe Acrobat Reader version 5 or higher, or the corresponding browser plug-in is needed to open the file)
Leaflet	no Leaflet available

* Sub-batches 1.1, 1.2, 1.3, etc., are obtained from the same batch of bulk material.
Notice: the previous classification of the sub-batches 1a, 1b, 1c will be gradually replaced with 1.1, 1.2, 1.3 etc.
This statement is valid at the date of printing : 2013-8-13

Legal notice:
The Council of Europe (EDQM) makes no representation or warranty with respect to the accuracy, completeness, or currency, of this electronic statement.
The Council of Europe (EDQM) shall not be liable in account of any potential errors or omissions.