

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Aplicação da abordagem *Quality-by-Design* no desenvolvimento de um método analítico preditivo de estabilidade de uma formulação semi-sólida**

Ana Margarida da Silva Sobral

Dissertação orientada pela Professora Doutora Joana Marques Marto e coorientada pela Doutora Sara Sofia Calição Raposo Loreau

Mestrado em Engenharia Farmacêutica

Pública

2020



Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Aplicação da abordagem *Quality-by-Design* no desenvolvimento de um método analítico preditivo de estabilidade de uma formulação semi-sólida**

Ana Margarida da Silva Sobral

Dissertação orientada pela Professora Doutora Joana Marques Marto e coorientada pela Doutora Sara Sofia Calião Raposo Loreau

Mestrado em Engenharia Farmacêutica

Pública

2020



## Resumo

O desenvolvimento de um método analítico preditivo de estabilidade é um processo trabalhoso e demorado. Deste modo, para melhorar estas limitações recorreu-se à abordagem de *Quality-by-Design (QbD)*. Esta metodologia equaciona diferentes parâmetros numa mesma análise, permitindo o estudo das suas interações, e conseqüentemente a sua influência nas respostas. Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos é realizado de forma mais célere. De modo atingir o objetivo de desenvolver e otimizar o método cromatográfico para quantificação de maleato de fluvoxamina (doravante designado por fluvoxamina) numa formulação semi-sólida, implementou-se um planeamento experimental, o *Full Factorial Design (FFD)* com 12 experiências e três níveis por fator. Este permitiu estimar a influência dos fatores críticos do método (proporção de acetonitrilo (ACN) na fase móvel e volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) na variação das respostas.

A estabilidade intrínseca da fluvoxamina foi analisada através de ensaios de degradação forçada. As condições hidrolíticas resultam da exposição ao meio ácido e básico, que promoveram a formação de dois produtos de degradação cada. A condição térmica, por exposição a  $55^{\circ}\text{C}$ , e a fotolítica, por exposição à luz UV, também originaram a formação de dois produtos de degradação cada. A condição oxidativa não promoveu a formação de nenhum produto de degradação.

O método de doseamento da fluvoxamina foi validado, de acordo com as normas em vigor. Os parâmetros estudados incluem seletividade, a gama de trabalho, a linearidade, a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), a exatidão e a robustez. Todos os parâmetros obtidos apresentam valores, que estão de acordo com os critérios de aceitação específicos.

O método de impurezas foi desenvolvido, contudo apenas as impurezas conhecidas A, B, C, F e G foram analisadas. No entanto, esta análise demonstrou que este método apresentava seletividade entre os picos das impurezas e os picos correspondentes aos conservantes e à substância ativa.

O *DoE* e análise multivariada no desenvolvimento de métodos são vantajosos, uma vez que permitem uma diminuição do tempo e dos meios despendidos comparativamente à abordagem univariada.

**Palavras-Chave:** Métodos analíticos, experimental design, fluvoxamina, ensaios de degradação, validação de métodos analíticos

## **Abstract**

The development of a predictive analytical method of stability is a labored and time-consuming process. Thus, to improve these limitations, the Quality-by-Design (QbD) approach was used. This methodology equates different parameters in the same analysis, allowing the study of their interactions, and consequently their influence on responses. Thus, the development of analytical methods is carried out more quickly. In order to achieve the point of developing and optimizing chromatographic method for the quantification of fluvoxamine maleate (hereinafter referred to as fluvoxamine) in a semi-solid formulation, an experimental design Full Factorial Design (FFD) per factor was implemented with (12) twelve experiments and three levels. This allowed estimating the influence of the critical factors of the method (proportion of acetonitrile (ACN) in the mobile phase and injection volume ( $\mu\text{L}$ ) on the variation of responses.

The intrinsic stability of fluvoxamine was analyzed by forced degradation tests. Hydrolytic conditions result from exposure to acid and basic medium, which promoted the formation of two degradation products each. The thermal condition, by exposure to  $55^{\circ}\text{C}$ , and the photolytic, by exposure to UV light, also resulted in the formation of two degradation products each. The oxidative condition did not promote the formation of any degradation product.

The fluvoxamine dosing method was validated according to the current standards. The parameters studied include selectivity, working range, linearity, accuracy (repeatability and reproducibility), accuracy and robustness. All parameters obtained present standard values. The impurities method was developed, however only known impurities A, B, C, F and G were analyzed. However, this analysis demonstrated that this method presented selectivity between the peaks of impurities and the peaks corresponding to preservatives and the active substance.

DoE and multivariate analysis in the development of methods are advantageous, since it allows a reduction in the time and means spent compared to the univariate approach.

**Keywords:** Analytical methods, experimental design, fluvoxamine, degradation tests, validation of analytical methods.

## **Agradecimentos**

Quero agradecer primeiramente à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e ao Instituto Superior Técnico por todas as aprendizagens que me proporcionaram durante estes 2 anos, e por todas as condições necessárias para atingir o meu objetivo, o Mestrado em Engenharia Farmacêutica.

Um enorme obrigada à Professora Doutora Joana Marto pela excelente orientação, pelo apoio demonstrado durante a realização de todo este trabalho, de forma a ser possível que tudo se tornasse mais fácil de concretizar e por todo o conhecimento e sabedoria que me transmitiu durante este tempo.

Agradeço à Doutora Sara Raposo por ter permitido a elaboração deste trabalho no Laboratório Edol, Produtos Farmacêuticos S.A.

A todo a equipa do Laboratório Edol, Produtos Farmacêuticos S.A por toda a sabedoria, apoio e compreensão demonstrado durante a realização deste projeto.

Aos meus pais, porque sem o apoio deles nada seria possível e por me mostrarem que as dificuldades fazem parte da vida, e que se conseguem sempre ultrapassar.

Aos meus amigos pelo apoio, incentivo, tolerância e ajuda nos momentos mais difíceis.

E por fim, um obrigada à restante família pelo carinho e preocupação demonstrados.

## Índice

|   |      |
|---|------|
| Resumo .....  | i    |
| Abstract.....   | ii   |
| Agradecimentos .....  | iii  |
| Índice de Figuras .....   | vi   |
| Índice de Tabelas .....   | viii |
| Abreviaturas.....   | x    |
| 1. Introdução .....   | 1    |
| 1.1. Desenvolvimento Farmacêutico .....   | 1    |
| 1.1.1. Estabilidade de substâncias ativas .....   | 1    |
| 1.1.2. Desenvolvimento e otimização de um método preditivo de estabilidade.....   | 4    |
| 1.1.3. Abordagem de <i>Quality-by-Design</i> .....  | 5    |
| 1.1.4. Análise de Risco .....   | 6    |
| 1.1.5. Desenvolvimento e otimização de métodos analíticos através de <i>DoE</i> .....                                     | 7    |
| 1.1.6. Modelação matemática no planeamento experimental .....   | 14   |
| 1.1.7. Validação de métodos analíticos.....   | 16   |
| 1.2. Métodos Cromatográficos .....  | 23   |
| 1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....   | 23   |
| 1.3. Medicamentos Antidepressivos.....  | 26   |
| 1.3.1. Antidepressivos em doenças anti-inflamatórias .....  | 26   |
| 1.3.2. Caracterização da fluvoxamina e do ácido maleico.....  | 27   |
| 2. Objetivos.....   | 30   |
| 3. Materiais e métodos .....  | 31   |
| 3.1. Materiais .....  | 31   |
| 3.2. Métodos .....  | 31   |
| 3.2.1. Desenvolvimento de um método analítico para quantificação de fluvoxamina através de <i>Quality-by-Design</i> ..... | 31   |
| 3.2.2. Condições cromatográficas.....   | 33   |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3. Preparação da solução padrão de fluvoxamina.....   | 34 |
| 3.2.4. Preparação das soluções das amostras .....   | 34 |
| 3.2.5. Estudos de degradação forçada.....   | 35 |
| 3.2.6. Validação do método de doseamento da fluvoxamina .....   | 35 |
| 4. Resultados e Discussão.....  | 38 |
| 4.1. Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de fluvoxamina através de <i>Quality-by-Design</i> . ..... | 38 |
| 4.1.1. Análise de risco.....  | 38 |
| 4.1.2. Fatores e respostas .....  | 45 |
| 4.1.3. Análise do planeamento experimental .....  | 47 |
| 4.2. Estudos de estabilidade – aplicação do método analítico desenvolvido ..  | 56 |
| 4.2.1. Ensaio de degradação forçada .....   | 56 |
| 4.3. Validação do método analítico por HPLC.....  | 61 |
| 4.3.1. Seletividade.....  | 61 |
| 4.3.2. Linearidade .....  | 63 |
| 4.3.3. Gama de trabalho .....   | 66 |
| 4.3.4. Precisão .....   | 66 |
| 4.3.5. Exatidão .....   | 67 |
| 4.3.6. Estabilidade das soluções.....   | 68 |
| 4.3.7. Robustez.....  | 69 |
| 4.4. Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de impurezas da fluvoxamina .....                          | 71 |
| 5. Conclusão.....   | 75 |
| 6. Referências bibliográficas.....  | 78 |
| Anexos.....   | 87 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Modelo Geral da aplicação do <i>DoE</i> . Adaptado de [40].   | 7  |
| <b>Figura 2</b> - Exemplos de diferentes <i>Full Factorial Designs</i> . A- Dois fatores, dois níveis ( $2^2$ ); B -Três fatores, dois níveis ( $2^3$ ) [47].   | 9  |
| <b>Figura 3</b> - Exemplos da aplicação do <i>Fractional Factorial Design</i> [47].   | 10 |
| <b>Figura 4</b> - Exemplos de <i>Central Composite Design</i> na otimização de duas variáveis (A) e três variáveis (B). (•) Pontos que correspondem ao FFD, (○) pontos estrela ou axiais, e (□) ponto central [40]. | 11 |
| <b>Figura 5</b> - Exemplo da aplicação de <i>Box-Behnken Design</i> [47].   | 12 |
| <b>Figura 6</b> - Exemplo de <i>Doehlert Design</i> para a otimização de duas variáveis com o deslocamento do projeto para outras regiões experimentais utilizando pontos anteriores [50].                          | 13 |
| <b>Figura 7</b> - Exemplo de <i>Mixture Design</i> [51].  | 13 |
| <b>Figura 8</b> – Esquema de um Sistema de HPLC. Adaptado de [71]   | 24 |
| <b>Figura 9</b> - Estrutura química da <i>trans</i> -fluvoxamina [83].  | 28 |
| <b>Figura 10</b> - Metabólitos formados através do metabolismo da fluvoxamina no fígado [83].   | 28 |
| <b>Figura 11</b> - Estrutura química da ácido <i>cis</i> -butenodioico [87].  | 29 |
| <b>Figura 12</b> - Diagrama de Ishikawa para possíveis falhas no desenvolvimento de um método analíticos.   | 39 |
| <b>Figura 13</b> - Diagrama de Pareto para todas as possíveis falhas durante o desenvolvimento do método analítico. A linha azul representa o valor da percentagem acumulada.                                       | 42 |
| <b>Figura 14</b> - Matriz de risco. Em que a cor verde representa os risco aceitáveis, o amarelo os risco inaceitáveis e o vermelho os riscos intoleráveis  | 43 |
| <b>Figura 15</b> - Gráfico de contorno da resposta correspondente ao fator de simetria.   | 52 |
| <b>Figura 16</b> - Gráfico de contorno da resposta correspondente ao tempo de retenção.   | 53 |
| <b>Figura 17</b> - Gráfico de contorno da resposta correspondente aos pratos teóricos.  | 54 |
| <b>Figura 18</b> - <i>Design Space</i> correspondente às condições cromatográficas ótimas.  | 55 |
| <b>Figura 19</b> - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados em meio ácido, onde a) representa o produto de degradação I e b) representa o produto de degradação II.  | 56 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 20</b> - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados em meio básico, onde c) representa o produto de degradação III e d) representa o produto de degradação IV.....  | 57 |
| <b>Figura 21</b> - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados por exposição à temperatura, onde a) representa o produto de degradação I, e e) representa o produto de degradação V.....   | 57 |
| <b>Figura 22</b> - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados por exposição à luz UV, onde a) representa o produto de degradação I, e e) representa o produto de degradação V. ....   | 58 |
| <b>Figura 23</b> - A: Cromatograma da solução padrão com fluvoxamina. B: Cromatograma da solução de placebo com conservantes; C: Cromatograma da solução de placebo sem conservantes; D: Cromatograma da solução da matriz com fluvoxamina; E: Cromatograma do solvente. Todos os cromatogramas foram obtidos pelo método de doseamento da fluvoxamina. .... | 62 |
| <b>Figura 24</b> - Representação gráfica da análise de resíduos em função da concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) de fluvoxamina.....   | 64 |
| <b>Figura 25</b> - Representação gráfica do teste de Rikilt.....   | 65 |
| <b>Figura 26</b> - A: Cromatograma da solução de referência <i>system suitability</i> CRS obtida pelo método cromatográfico a desenvolver e B: Cromatograma da solução de referência <i>system suitability</i> CRS de referência. ....   | 72 |
| <b>Figura 27</b> - Cromatograma correspondente à solução que contém a matriz com fluvoxamina.....  | 73 |
| <b>Figura 28</b> - Cromatograma correspondente à solução de placebo.....   | 73 |

## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Exemplo de diferentes condições de stress. Adaptado de [4]. .....  | 2  |
| <b>Tabela 2</b> - Zonas climáticas e exemplos de países que apresentam esse tipo de clima. Adaptado de [9, 15]. .....  | 4  |
| <b>Tabela 3</b> - Tipos de condições de armazenamento para os diferentes tipos de estudos e zonas climáticas. Adaptado de [17]. .....                              | 4  |
| <b>Tabela 4</b> - Parâmetros de validação para cada um dos tipos de ensaios [56, 57]. .....  | 16 |
| <b>Tabela 5</b> - Classificação da probabilidade, severidade e deteção do risco. ....  | 32 |
| <b>Tabela 6</b> - Variáveis dependentes utilizadas no planeamento experimental. ....   | 32 |
| <b>Tabela 7</b> - Planeamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico. ....  | 33 |
| <b>Tabela 8</b> - Condições utilizadas na quantificação de fluvoxamina e das impurezas por HPLC. ....  | 34 |
| <b>Tabela 9</b> - Esquema de diluições utilizado no estudo da linearidade durante a validação do método de doseamento da fluvoxamina. ....                         | 36 |
| <b>Tabela 10</b> - Variação dos fatores para análise da robustez do método analítico. ....   | 37 |
| <b>Tabela 11</b> - Resumo da probabilidade, severidade e deteção com o respetivo critério e classificação. ....  | 40 |
| <b>Tabela 12</b> - Riscos inaceitáveis resultantes da metodologia FMEA e os respetivos efeitos, causas e controlos. ....   | 44 |
| <b>Tabela 13</b> - Resultados das respostas obtidos através da análise do planeamento experimental. ....   | 48 |
| <b>Tabela 14</b> - Parâmetros de ajuste obtidos para cada um dos modelos das respostas. ....   | 49 |
| <b>Tabela 15</b> - Resultados obtidos correspondentes aos valores experimentais e aos previstos e o quociente entre ambas. ....                                    | 50 |
| <b>Tabela 16</b> - Resultados estatísticos obtidos, com recurso à ANOVA, para cada um dos modelos. ....  | 51 |
| <b>Tabela 17</b> - Teor (%) de fluvoxamina obtido após exposição de soluções a diferentes condições de stress. ....  | 58 |
| <b>Tabela 18</b> - Resumo dos resultados obtidos na bibliografia de referência. ....   | 60 |
| <b>Tabela 19</b> - Resumo dos tempos de retenção correspondentes a cada um dos constituintes, do TRR em relação à SA e fator de resolução entre os compostos. .... | 61 |
| <b>Tabela 20</b> - Parâmetros obtidos para a curva de calibração para a validação do método de quantificação da fluvoxamina. ....                                  | 63 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 21</b> - Parâmetros de linearidade obtidos através do teste de Mandel e da análise de resíduos para a validação do método de quantificação da fluvoxamina..... | 64 |
| <b>Tabela 22</b> - Resultados obtidos através da implementação do teste de Rikilt para a validação do método de quantificação da fluvoxamina. ....                       | 65 |
| <b>Tabela 23</b> - Resultados da análise da repetibilidade para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.....   | 66 |
| <b>Tabela 24</b> - Resultados da análise da precisão intermédia para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.....  | 67 |
| <b>Tabela 25</b> - Resultados da análise da exatidão para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.....   | 68 |
| <b>Tabela 26</b> - Resultados da análise da estabilidade de soluções no dia 0 e no dia 5 para a validação do método de quantificação da fluvoxamina. ....                | 69 |
| <b>Tabela 27</b> - Variação dos fatores para análise da robustez para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.....   | 69 |
| <b>Tabela 28</b> - Resultados obtidos da análise da robustez para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.....   | 70 |

## **Abreviaturas**

**%** - Percentagem

**5-HT** - 5-hidroxitriptamina

**ACN** – Acetonitrilo

**ADTC** - Antidepressivos tetracíclicos

**ADTs** - Antidepressivos tricíclicos

**AIBN** – Azobisisobutironitrila

**ANOVA** – Análise de Variâncias (em inglês *Analysis of Variance*)

**AQbD** – *Analytical Quality-by-Design*

**ATP** – Perfil analítico alvo

**BBD** – *Box-Behnken Design*

**c.d.o** – Comprimento de Onda

**CCD** – *Central Composite Design*

**CFS** – Cromatografia de fluídos supercríticos

**CG** – Cromatografia gasosa

**CGRP** - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

**CL** – Cromatografia líquida

**CQA** – Atributos críticos de qualidade

**CRIT** - Grau de criticidade

**CRS** - *Chemical Reference Substance*

**CV** – Coeficiente de Variação

**DAD** – Rede de díodo

**DD** – *Doehlert Design*

**Det** – Detecção

**DF** – Graus de Liberdade (em inglês *Degrees of Freedom*)

**DoE** – Planeamento experimental (em inglês *Design of Experimental*)

**DP** – Desvio-Padrão

**DS** – *Design Space*

**EDQM** - *European Directorate for the Quality of medicines & Healthcare*

**F** – Teste de *Snedecor/Fisher*

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FFD** – *Full Factorial Design*

**FMEA** - Análise do modo e efeito de falha

**FrFD** – *Fractional Factorial Design*

**GL** – Graus de Liberdade  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogénio  
**HCl** – Ácido clorídrico  
**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês *High Performance Liquid Chromatography*)  
**ICH** - International Council for Harmonization  
**IL-1** - Interleucina-1  
**IMAO** - Inibidores da monoamina oxidase  
**ISRS** - Inibidores seletivos de recaptção de serotonina  
**ISRSN** - Inibidores seletivos da recaptção da serotonina e da noradrenalina  
**LOD** – Limite de deteção (em inglês *Limite of detection*)  
**LOQ** – Limite de quantificação (em inglês *Limit of quantification*)  
**MD** – *Mixture Design*  
**MQ** – Média dos Quadrados  
**NaOH** – Hidróxido de sódio  
**NGF** - Fator de crescimento nervos  
**°C** - Graus Celsius  
**OD** – *Optimal Design*  
**P** - Probabilidade de significância  
**PBD** – *Plackett – Burman Design*  
**PCA** - *Principal Component Analysis*  
**PG** – Progressão Geométrica  
**Ph. Eur. 10** – Farmacopeia Europeia 10 (em inglês *European Pharmacopeia*)  
**PLS** - *Partial Least Squares*  
**Pro** – Probabilidade  
**PTFE** - Politetrafluoretileno  
**PVDF** - Poli(fluoreto de vinilideno)  
**Q<sup>2</sup>** - Coeficiente de previsão  
**QbD** – *Quality-by-Design*  
**QbT** – *Quality-by-Testing*  
**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de correlação  
**RH** – Humidade Relativa (em inglês *Relative Humidity*)  
**RPN** - Número de Prioridade de Risco  
**RRF** – Fator de Resposta Relativa

**RSM** – *Response Surface Methodology*

**SA** – Substância ativa

**Sev** - Severidade

**SQ** – Soma dos Quadrados

**TNF- $\alpha$**  - Factor de necrose tumoral  $\alpha$

**TR** – Tempo de Retenção

**TRR** – Tempo de Retenção Relativo

**USP** - Farmacopeia dos Estados Unidos da América

**UV** - Ultravioleta

**VT**- Valor de testes (em inglês *value test*)

## **1. Introdução**

### **1.1. Desenvolvimento Farmacêutico**

O desenvolvimento farmacêutico visa desenvolver um produto de qualidade através de processo de produção consistente. As informações e os conhecimentos obtidos nos estudos de desenvolvimento farmacêutico e na produção fornecem informações científicas, de modo a identificar o *design space* (DS) e as especificações [1].

O desenvolvimento de uma substância ativa (SA) ou de um medicamento é acompanhado pelo desenvolvimento de métodos analíticos. O desenvolvimento de métodos analíticos deve incluir a identificação e quantificação da SA, das substâncias relacionadas e dos produtos de degradação. Os métodos analíticos têm como finalidade demonstrar a qualidade do produto, a sua potência, pureza e estabilidade [2, 3].

#### **1.1.1. Estabilidade de substâncias ativas**

Na indústria farmacêutica, a estabilidade da SA é uma das principais preocupações, uma vez que esta estabilidade afeta a segurança e a eficácia do produto final, o medicamento. Deste modo, os estudos de estabilidade de uma SA incluem o estudo da estabilidade química e física durante os estudos de formulação, a fase pré-clínica, o desenvolvimento do processo, a embalagem e após a comercialização [4, 5].

A estabilidade do produto farmacêutico permite avaliar a capacidade deste se manter dentro de especificação durante um tempo específico e sob a influência de diversos fatores. Assim sendo, a estabilidade é avaliada através de diferentes estudos, nomeadamente estudos de degradação forçada, estudos de estabilidade acelerada e a longo-prazo. Estes estudos fornecem informações essenciais para a seleção da formulação farmacêutica e da sua embalagem, o que permitirá melhores condições de armazenamento e um longo prazo de validade [4 – 7].

##### **1.1.1.1. Estudos de degradação forçada**

Os estudos de degradação forçada permitem identificar produtos de degradação, as suas respetivas vias de degradação e, conseqüentemente, a estabilidade intrínseca da SA ou do medicamento. Estes estudos podem ser direcionados, de modo a analisar as seguintes temáticas: as condições que promovem a degradação, a velocidade à qual ocorre, as principais estruturas dos produtos de degradação e as vias de degradação que originam os mesmos. Para a realização destes estudos é necessário induzir a degradação,

pela exposição desta SA ou do medicamento a condições de stress. As condições de stress mais utilizadas são a humidade, a temperatura, o pH, e a exposição a diferentes tipos de luz. A exposição a diferentes condições de stress promove a formação de produtos de degradação termolíticos, hidrolíticos, fotolíticos ou oxidativos por vias específicas, Tabela 1 [5, 7 – 11].

**Tabela 1** - Exemplo de diferentes condições de stress. Adaptado de [4].

| Tipos de Degradação | Condições Experimentais   | Condições de armazenamento | Dias de Exposição |
|---------------------|---|----------------------------|-------------------|
| <b>Hidrolítica</b>  | Solução com SA e 1 ou 0,1M HCl                                    | 40°C, 60°C                 | 1,3,5             |
|                     | Solução com SA e 1 ou 0,1M NaOH                                   | 40°C, 60°C                 | 1,3,5             |
|                     | Solução com a formulação e 1 ou 0,1M HCl                          | 40°C, 60°C                 | 1,3,5             |
|                     | Solução com a formulação e 1 ou 0,1M NaOH                         | 40°C, 60°C                 | 1,3,5             |
| <b>Oxidativa</b>    | Solução com SA e 3% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>           | 25°C, 60°C                 | 1,3,5             |
|                     | Solução com a formulação e 3% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 25°C, 60°C                 | 1,3,5             |
|                     | Solução com SA e Azobisisobutironitrila (AIBN)                    | 40°C, 60°C                 | 1,3,5             |
|                     | Solução com a formulação e AIBN                                   | 40°C, 60°C                 | 1,3,5             |
| <b>Fotolítica</b>   | Lâmpadas fluorescentes brancas frias                              | NA                         | 1,3,5             |
|                     | Lâmpadas UV   | NA                         | 1,3,5             |
|                     | Luz solar   | NA                         | 1,3,5             |
| <b>Termolítica</b>  | Estufa  | 60°C                       | 1,3,5             |
|                     | Estufa  | 60°C/ 75% RH               | 1,3,5             |
|                     | Estufa  | 80°C                       | 1,3,5             |
|                     | Estufa  | 80°C/ 75% RH               | 1,3,5             |
|                     | Temperatura Ambiente  | NA                         | 1,3,5             |

*Em que SA significa substância ativa, HCl – ácido clorídrico, NaOH – Hidróxido de sódio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio, UV – ultravioleta, NA significa não aplicável e RH- humidade relativa.*

Os produtos de degradação termolíticos resultam da exposição das moléculas ou formulações a temperatura elevada, permitindo acelerar as reações químicas dependentes da temperatura, que promovem a formação destes compostos. A temperatura normalmente utilizada varia entre os 50 °C e os 70 °C. A formação de produtos de degradação hidrolíticos ocorre devido à exposição a pH ácidos ou alcalinos, que alteram os grupos funcionais ionizáveis presentes na molécula. As reações fotolíticas ocorrem por absorção de fotões por parte das moléculas devido à exposição a uma fonte de luz. As fontes de luz mais utilizadas são lâmpadas ultravioleta (UV), lâmpadas fluorescentes, brancas frias e a luz solar. Por fim, a formação dos produtos de degradação oxidativos

pode ocorrer através de diferentes vias, nomeadamente a auto-oxidação, exposição ao peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e transferências de eletrões [5, 7, 12, 13].

A durabilidade destes estudos não é específica para todas as moléculas, uma vez que depende do comportamento destas e dos objetivos do estudo. Nestes estudos também pode existir a combinação da temperatura com os estudos hidrolíticos e de oxidação, como está representado na Tabela 1 [4].

#### **1.1.1.2. Estudos de estabilidade acelerada e a longo-prazo**

Como referido anteriormente, os ensaios de estabilidade são realizados em várias etapas do desenvolvimento farmacêutico. Numa fase inicial, a estabilidade do produto sob condições extremas é avaliada, contudo também é necessário avaliar a estabilidade em condições normais de armazenamento. Os testes utilizados com esta finalidade são os estudos de estabilidade acelerada e a longo-prazo [8].

Os estudos de estabilidade acelerada consistem na exposição do produto final a condições de armazenamento extremas, ou seja, a temperaturas e humidades elevadas durante diferentes períodos. O objetivo deste tipo de teste é identificar os produtos de degradação que se formam durante o armazenamento. Este estudo avalia o produto antes de ser exposto a condições extremas e, posteriormente, analisa-o aos 3 e 6 meses seguintes. Os testes realizados em condições extremas devem apresentar um tempo de estudo menor, normalmente de 6 meses, comparativamente com os estudos de longo-prazo [9, 14 - [16].

Os estudos a longo-prazo são realizados durante um período mais longo, de modo a permitir uma degradação significativa do produto nas condições de armazenamento recomendadas. A durabilidade deste teste depende da estabilidade do produto, mas deve ser de pelo menos 12 meses. A frequência com que se realiza este estudo diminui com os anos. No primeiro ano, o produto deve ser analisado a cada 3 meses, no segundo ano deve ser analisado duas vezes e, a partir do terceiro ano, o produto deve ser analisado uma vez por ano [9, 16].

As condições de temperatura e humidade, são baseadas no clima de quatro zonas do mundo. A produção de um medicamento e, conseqüentemente, a sua exportação implica a consideração de diferentes climas dependendo do país ao qual o produto se destina. A divisão do mundo em quatro zonas climáticas, Tabela 2, baseia-se na temperatura média anual e humidade relativa nessas regiões [9, 17].

**Tabela 2** - Zonas climáticas e exemplos de países que apresentam esse tipo de clima. Adaptado de [9, 15].

| Zona Climática | Tipo de Clima               | Exemplo de países   |
|----------------|-----------------------------|---|
| I              | Temperado                   | Reino Unido, Norte da Europa, Rússia, Estados Unidos da América |
| II             | Mediterrâneo ou subtropical | Japão, Sul da Europa  |
| III            | Quente e seco               | Irão, Iraque e Sudão  |
| IV             | Quente e húmido             | Brasil, Indonésia, Gana, Filipinas e Nicarágua                  |

Deste modo, as condições de temperatura e humidade variam de acordo com o tipo de testes de estabilidade, dependendo da região do globo à qual o produto se destina, como representado na Tabela 3 [9, 15, 17].

**Tabela 3** - Tipos de condições de armazenamento para os diferentes tipos de estudos e zonas climáticas. Adaptado de [17].

| Tipo de Estudo | Condições de armazenamento   | Tipos de zonas climáticas |
|----------------|--|---------------------------|
| Longo-prazo    | a) $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ | a) Zonas I e II           |
|                | b) $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ | b) Zonas III e IV         |
|                | c) $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ | c) Zona IV                |
| Acelerado      | $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$    | Todas as zonas climáticas |

*Em que RH significa humidade relativa.*

### 1.1.2. Desenvolvimento e otimização de um método preditivo de estabilidade

O desenvolvimento de um método analítico é um procedimento bastante complexo, uma vez que visa a avaliação da estabilidade do produto acabado/ SA e permite a libertação do produto acabado para o mercado com a segurança, que este tem a concentração rotulada. Contudo, um método analítico ideal deve permitir o doseamento simultâneo da SA, dos conservantes e das substâncias relacionados, uma vez que reduz o tempo despendido na análise e o consumo de reagentes [5, 18].

O desenvolvimento de métodos analíticos pode ser realizado através de uma metodologia tradicional de *Quality-by-Testing (QbT)* ou pela abordagem de tentativa e erro. Estas metodologias não apresentam capacidades de avaliar de forma eficiente a robustez ao longo do desenvolvimento, nem a oportunidade de desenvolver uma análise de risco. Assim, devido às limitações destas abordagens, poder-se-á alternativamente usar uma metodologia sistemática designada por *QbD* [19 – 21].

### 1.1.3. Abordagem de *Quality-by-Design*

Os principais objetivos da indústria farmacêutica são a produção de medicamentos com elevada qualidade, através do desenvolvimento de processos de produção e de métodos analíticos eficazes e robustos [1, 22].

De acordo com a *Guideline ICH Q8*, *QbD* é definido como “*uma abordagem sistemática para o desenvolvimento que começa com a predefinição dos objetivos e enfatiza a compreensão do produto, do processo e o controlo do processo com base na ciência da gestão de qualidade do risco*” [1].

No entanto, esta *guideline* não explicita a aplicação desta metodologia ao desenvolvimento de métodos analíticos. Devido a estas limitações, a *Food and Drug Administration* (FDA) promoveu a integração do desenvolvimento dos métodos analíticos nesta abordagem sistemática. Esta integração foi efetuada com recurso à interligação entre o desenvolvimento de métodos analíticos, a gestão da qualidade do risco (*Guideline ICH Q9*) e o sistema de qualidade farmacêutica (*Guideline ICH Q10*). A finalidade da aplicação do *QbD* aos métodos analíticos é o desenvolvimento e otimização dos procedimentos analíticos [23, 24].

A implementação desta metodologia desenvolve métodos analíticos com um maior conhecimento, o que permite identificar resultados fora de especificação. O *QbD* pode ser aplicado a diferentes métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), entre outras [23, 25, 26].

O *Analytical Quality-by-Design* (*AQbD*), *QbD* associado a métodos analíticos permite uma maior compreensão científica na implementação dos métodos, uma vez que é uma metodologia sistemática, que permite uma análise combinada de diversos parâmetros. O *AQbD* é preferível à abordagem não sistemática designada por *one-factor-at-a-time*, visto que esta apenas analisa um parâmetro de cada vez, levando a um processo de desenvolvimento dos métodos analíticos mais lento [27].

A implementação desta metodologia envolve diferentes etapas, nomeadamente a definição do perfil analítico alvo (ATP), a seleção dos atributos críticos de qualidade (CQA) e a análise de risco, o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos através de *DoE*, a seleção da estratégia de controlo, a validação do método e a melhoria contínua [23].

A identificação do ATP define os objetivos do método analítico, de modo a este atingir a seletividade máxima com eficiência adequada e melhorar a reprodutibilidade e repetibilidade [28].

#### 1.1.4. Análise de Risco

A análise de risco é um procedimento com base científica utilizado na gestão do risco, que permite a identificação dos CQAs, que afetam a qualidade de um método analítico. O conhecimento sobre os parâmetros mais críticos determinam quais dos parâmetros que devem ser avaliados e controlados [29, 30].

A análise de risco envolve a realização de quatro etapas designadas por (i) identificação do risco, (ii) avaliação do risco, (iii) planeamento das respostas ao risco e (iv) controlo do risco [31].

A identificação do risco permite identificar todos CQAs que influenciem o método analítico, e por consequência os que interferem no cumprimento dos objetivos predefinidos. Uma das estratégias mais utilizadas para a identificação do risco é o Diagrama de Ishikawa. Esta metodologia descreve a relação sistemática entre uma fonte de risco, a causa, e os possíveis efeitos [32, 33].

A avaliação do risco estima o risco associado aos parâmetros identificados, esta avaliação pode ser realizada através de vários métodos, nomeadamente métodos quantitativos e qualitativos. A metodologia quantitativa mais utilizada é a análise do modo e efeito de falha (FMEA). Por outro lado, a metodologia qualitativa mais usada é a descrita na ISO 14971:2007. A FMEA é um dos tipos de análise de risco mais utilizadas na avaliação do risco farmacêutico, fornecendo uma avaliação dos potenciais modos de falha e o seu provável efeito sobre o desempenho e os resultados. Este método de análise de risco é baseado no conhecimento, na experiência e visão da equipa de trabalho. Esta análise resulta da atribuição de uma classificação à probabilidade, severidade e deteção do risco. A pontuação destes parâmetros de risco permite o cálculo do número de prioridade de risco (RPN), através da seguinte equação [32, 34 - 36]:

$$RPN = Sev \times Pro \times Det$$

Em que Sev significa severidade, Pro a probabilidade e Det a deteção.

Contudo, através da combinação dos dois primeiros parâmetros é possível definir a consequência do risco, ou seja, o grau de criticidade (CRIT). Este critério ajuda na seleção do risco quando o valor de RPN é igual para uma determinada falha [32, 33, 35, 36].

A probabilidade de risco é classificada quantitativamente, em que o número mais elevado da classificação representa risco quase inevitável e o menor, um risco remoto. Qualitativamente, este parâmetro pode ser descrito como alto, médio e baixo. A

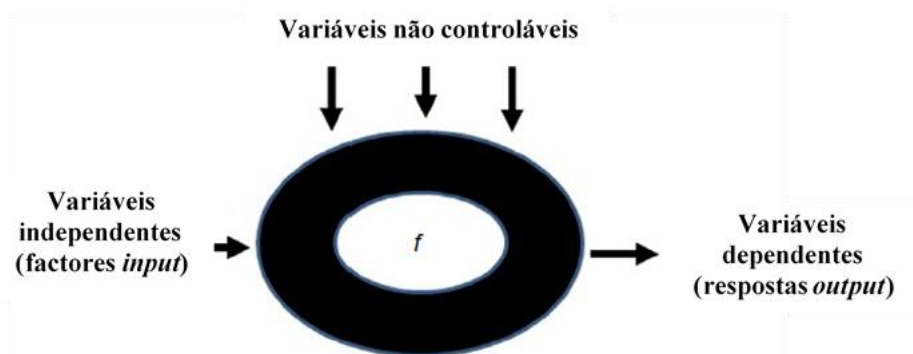
severidade caracteriza o impacto do risco, e é classificada qualitativamente como insignificante, média e significativa. Em relação à classificação quantitativa a pontuação mais elevada significa falha com aviso, e a menor nenhuma falha. A detecção é expressa quantitativamente, sendo que o valor numérico mais elevado significa absolutamente impossível e o mais reduzido quase inevitável. Os métodos qualitativos e semi-quantitativos podem utilizar ferramentas como matrizes de risco e gráficos de risco, de modo a analisar as falhas, que podem influenciar os objetivos predefinidos [31, 34 – 36].

Na fase do planeamento das respostas ao risco é necessário desenvolver uma estratégia para tratar o risco, de modo a evitar, reduzir, mitigar, transferir e aceitar o risco [31], [37].

O controlo do risco permite monitorizar dos riscos identificados nas fases anteriores e identificar novos riscos, e respetivamente o seu impacto [37].

#### 1.1.5. Desenvolvimento e otimização de métodos analíticos através de *DoE*

O *DoE* é uma abordagem sistematizada que utiliza princípios científicos e estatísticos, que auxiliam a compreensão das relações entre as variáveis independentes (fatores - *input*) e as variáveis dependentes (respostas - *output*). A aplicação desta abordagem induz uma variação nos fatores discretos ou contínuos controlados, de modo a obter um efeito nas respostas, como se observa na Figura 1. Deste modo, é possível determinar quais são as variáveis dependentes com maior influência e, conseqüentemente, garantir que os resultados das variáveis independentes estão inseridos no intervalo de especificação, bem como garantir que a variabilidade seja mínima [25, 38, 39].



**Figura 1** - Modelo Geral da aplicação do *DoE*. Adaptado de [40].

A identificação e a otimização dos fatores promovem um resultado mais eficaz e com um menor número de experiências, o que permite uma redução de tempo e,

consequentemente, uma redução dos custos. A implementação deste tipo de abordagem deve permitir a resolução de problemas de forma sistemática e a obtenção de resultados ótimos. O número de experiências irá depender do número de fatores, de níveis e do número de interações [41].

A implementação desta metodologia é realizada em quatro etapas designadas por fase de seleção, fase do design, fase de condução e fase de análise [39, 41 – 44].

A fase de seleção subdivide-se em três etapas, nomeadamente a seleção do problema, das variáveis de resposta, das variáveis independentes e dos respetivos níveis. Nesta fase, é necessário identificar objetivamente o problema e idealizar o desenvolvimento do planeamento experimental. A seleção das variáveis dependentes é uma das fases mais críticas na planificação de qualquer planeamento experimental, podendo comprometer o desempenho analítico do método. A seleção de fatores e dos seus respetivos níveis determina o domínio experimental, uma vez que é nesta fase que se determina o que irá ser estudado. A fase de design é a etapa da escolha do tipo de planeamento experimental que irá ser aplicado, dependendo da natureza das experiências. Os tipos de planeamento experimental podem ser divididos em *screening designs* ou *response surface designs* (planeamentos de otimização). Após a seleção do planeamento apropriado surge a fase de condução, onde o plano experimental é obtido. Posteriormente, procede-se à análise estatística das interações entre as respostas e os fatores através de modelos matemáticos, sendo esta fase designada por fase de análise [38 – 41, 43, 44].

#### **1.1.5.1. *Screening designs***

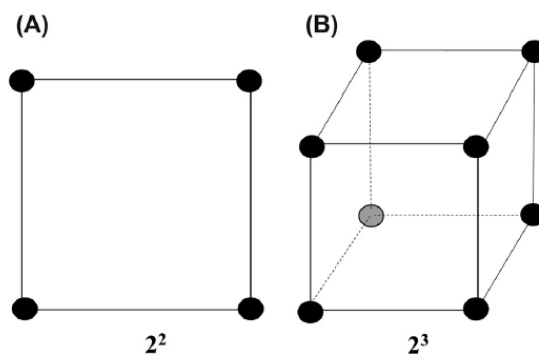
Os *screening designs* têm como objetivo entender e determinar quais as variáveis independentes que apresentam um efeito significativo nas respostas, através de um número mínimo de experiências e com um número máximo de fatores. Com bases neste estudo, pode ocorrer a etapa de otimização utilizando os fatores que apresentaram um efeito significativamente elevado na fase de *screening*. Os *screening designs* podem ser divididos em diferentes tipos, mais especificamente em *Full Factorial Design (FFD)*, *Fractional Factorial Design (FrFD)* e *Plackett-Burman Design (PBD)* [40, 43, 45, 46].

##### **1.1.5.1.1. *Full Factorial Design (FFD)***

O *FFD* permite determinar os efeitos mais significativos das variáveis independentes e das suas interações com as variáveis dependentes. Este planeamento experimental considera a existência de um número de fatores,  $k$ , em que cada um pode ter diferentes

níveis ( $L$ ). Deste modo, o número de combinações possíveis,  $N$ , é descrito por  $N=L^k$ . Assim, o *FFD* utiliza todas as combinações possíveis estabelecidas pelos fatores em diferentes níveis, de modo a determinar os pontos experimentais. Estes pontos obtidos podem ser caracterizados como os vértices de um hipercubo. No entanto, cada um desses pontos pode ser caracterizado por -1, que representa o menor nível de um determinado fator e por +1, que explicita o maior nível do fator [25, 47, 48].

Este planeamento experimental apresenta como vantagem a avaliação inequívoca dos principais fatores e das suas interações, contudo experiências com mais de 16 fatores não podem utilizar este tipo de *screening design* devido ao aumento exponencial do número de pontos experimentais. No entanto, o *FFD* é mais utilizado nas fases iniciais do desenvolvimento, e apresenta dois níveis para cada fator,  $2^k$ , como se pode observar na Figura 2 [47].

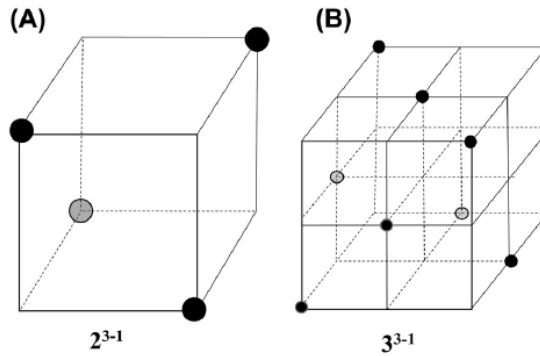


**Figura 2** - Exemplos de diferentes *Full Factorial Designs*. A- Dois fatores, dois níveis ( $2^2$ ); B -Três fatores, dois níveis ( $2^3$ ) [47].

O *FFD* com dois fatores e três níveis é frequentemente utilizado na fase de otimização. Este tipo de *DoE* é utilizado especialmente quando o número de fatores é menor ou igual a 4 [49].

#### 1.1.5.1.2. *Fractional Factorial Design (FrFD)*

O *FrFD* é um dos *screening design* mais utilizados permitindo avaliar um grande número de variáveis independentes através de um número reduzido de experiências. Esta diminuição do número de experiências deve-se ao facto do *FrFD* representar uma fração do *FFD*. Normalmente, o *FrFD* representa metade ou um quarto do *FFD*. Este planeamento experimental é descrito como  $N=2^{k-p}$ , onde  $2^k$  representa o *FFD* e  $p$  representa o grau de fracionamento aplicado, como se observa na Figura 3 [25, 39, 47].



**Figura 3** - Exemplos da aplicação do *Fractional Factorial Design* [47].

Este tipo de *screening design* não permite a determinação dos efeitos significativos das interações de forma separada. Por esta razão, é necessário estudar a resolução, que é definida como a capacidade de determinar os efeitos significativos e interações sem interferência [39].

#### 1.1.5.1.3. *Plackett-Burman Design (PBD)*

O *PBD* é bastante utilizado na avaliação da robustez e validação de métodos analíticos durante o seu desenvolvimento. Este planeamento permite eliminar completamente algumas interações e, conseqüentemente, apenas os efeitos mais significativos são considerados, reduzindo o número de experiências [47], [49].

Este *DoE* pode ser incluído na classe *FrFD* em que são estudados dois níveis por fator. O *PBD* permite avaliar  $(4n-1)$  fatores em dois níveis diferentes e obter um número de experiências,  $4n$  [45, 49].

#### 1.1.5.2. *Designs de otimização*

Estes planeamentos experimentais permitem otimizar as variáveis independentes identificadas nos *screening designs* ou através de uma avaliação de risco, determinando os níveis dos fatores mais relevantes, com a finalidade de obter resultados aceitáveis para as variáveis dependentes. Assim sendo, a fase de otimização permite selecionar os resultados mais apropriados, de acordo com o objetivo do planeamento experimental [45, 46].

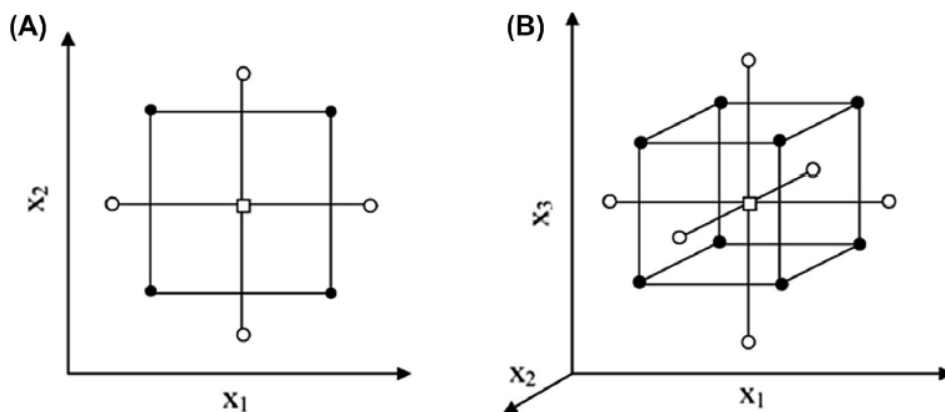
As estratégias de otimização podem ser divididas em duas abordagens distintas, abordagem univariada ou multivariada. A principal diferença entre estas abordagens reside no número de fatores que podem ser monitorizados simultaneamente. A metodologia univariada permite monitorizar a influência de um único fator num

planeamento experimental, enquanto os outros fatores permanecem constantes. A estratégia multivariada permite avaliar simultaneamente todos os fatores e os respectivos níveis. A metodologia multivariada mais utilizada é a *response surface methodology* (RSM), que realiza previsões estatísticas, com base em equações polinomiais ajustadas aos resultados experimentais [43, 50].

Os RSMs mais aplicados são o *Central Composite Design* (CCD), o *Box-Behnken Design* (BBD), o *Optimal Design* (OD), o *Doehlert Design* (DD) e o *Mixture Design* (MD) [45, 51].

### 1.1.5.2.1. Central Composite Design

O CCD consiste num *Full* ou *Fractional design* com um planeamento experimental adicional que inclui os pontos estrela e um ponto central. Os pontos estrela ou os pontos axiais permitem determinar, de modo eficiente, os coeficientes do polinómio de segundo grau para as variáveis. Este planeamento pode ser representado através de um cubo, em que os vértices do mesmo representam o produto dos níveis (-1, nível mais baixo e +1 nível mais alto). Os pontos estrela encontram-se ao longo do eixo dentro e/ou fora do cubo e o ponto central na origem, como se mostra na Figura 4. Os pontos estrela auxiliam o cálculo da curvatura [40, 47, 50].



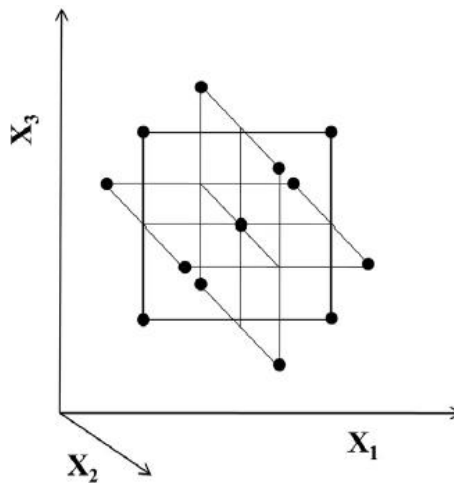
**Figura 4** - Exemplos de *Central Composite Design* na otimização de duas variáveis (A) e três variáveis (B). (•) Pontos que correspondem ao FFD, (○) pontos estrela ou axiais, e (□) ponto central [40].

O número de experiências é determinado por  $N=k^2+2k+C_p$ , em que  $k$  representa o número de fatores e  $C_p$  representa o número replicado do ponto central. Os valores  $\alpha$  representam as distâncias entre os pontos experimentais e o ponto central. Estes valores

dependem do número de variáveis e são calculados através de  $\alpha = 2^{(k-p)/4}$  e consequentemente, todos os fatores são analisado em cinco níveis  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$  [50].

#### 1.1.5.2.2. *Box-Behnken Design*

O *BBD* é um planejamento experimental quadrático independente que não possui *FFD* ou *FrFD*, e pode ser utilizado em planejamento experimentais com três ou mais fatores, contudo, são apenas estudados em três níveis  $(-1, 0 \text{ e } 1)$  (Figura 5) [42, 47, 51].



**Figura 5** - Exemplo da aplicação de *Box-Behnken Design* [47].

Neste tipo de planejamento de otimização não há pontos experimentais nos vértices do cubo, dado que este é um design esférico, consequentemente todos os pontos apresentam uma distância ao ponto central igual ao raio de uma esfera [47].

#### 1.1.5.2.3. *Optimal Design (OD)*

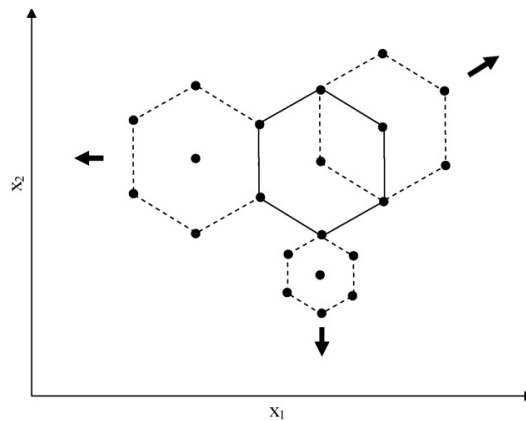
O *OD* depende de um modelo estatístico, logo é determinado com recurso a um critério estatístico. O *OD* pode ser dividido em diferentes tipos, tais como *D-optimal*, *I-optimal* e *A-optimal*. Este tipo de planejamento experimental aplica três níveis de estudo para cada um dos fatores [42, 45].

#### 1.1.5.2.4. *Doehlert Design (DD)*

O *DD* define diferentes domínios baseados no número de variáveis, ou seja, descreve um domínio circular para duas variáveis, um domínio esférico para três variáveis e um domínio hiper-esférico para mais do que três variáveis, o que explicita a uniformidade

das variáveis no domínio experimental. Este tipo de planejamento é bastante eficiente, pois permite a análise de níveis para diferentes fatores, ou seja, os fatores mais significativos podem ser estudados num maior número de níveis [45, 50].

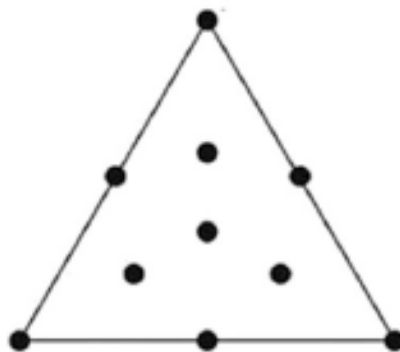
No *DD*, o número de experiências a realizar é dado por  $N = k^2 + k + C_p$ , em que  $C_p$  representa o número de réplicas do ponto central. Além disso, os intervalos entre os níveis apresentam uma distribuição uniforme, e o deslocamento da matriz experimental pode ser realizado para outra região experimental através de pontos adjacentes anteriores, como se observa na Figura 6 [50].



**Figura 6** - Exemplo de *Doehlert Design* para a otimização de duas variáveis com o deslocamento do projeto para outras regiões experimentais utilizando pontos anteriores [50].

#### 1.1.5.2.5. *Mixture Design (MD)*

No *MD* as variáveis independentes resultam de diferentes proporções dos componentes da mistura. Contudo, a soma das diferentes proporções dos fatores deve ser 100%, como se mostra na Figura 7 [51].



**Figura 7** - Exemplo de *Mixture Design* [51].

### 1.1.6. Modelação matemática no planeamento experimental

Os modelos matemáticos fornecem informações importantes sobre a relação quantitativa entre variáveis dependentes e independentes. Os mais utilizados para analisar esta relação são os modelos de regressão polinomial, de análise dos componentes principais (em inglês designado por *Principal Component Analysis, PCA*) e da regressão dos mínimos quadrados parciais (em inglês designado por *Partial Least Squares, PLS*) [51, 52].

Os modelos polinomiais são descritos por uma função polinomial, que correlaciona as variáveis dependentes com as independentes, como descrevem as seguintes equações [40]:

$$y = f(x) + \varepsilon \text{ para um parâmetro}(x)$$
$$y = f(x_1, x_2 \dots x_n) + \varepsilon \text{ para dois parâmetros } (x_1, x_2)$$

A função polinomial  $f(x)$  descreve a relação entre os fatores ( $x$ ) e as respostas ( $y$ ) com os resíduos ( $\varepsilon$ ) [40].

Os modelos polinomiais podem ser divididos em três tipos: linear, interação (segunda ordem) e quadrático. O modelo linear é o modelo mais simples, constituído apenas por termos que descrevem as relações lineares entre os fatores e as respostas, como na seguinte equação [25, 40, 50]:

$$y = \beta_0 + \sum_i^k \beta_i \times x_i + \varepsilon$$

em que o termo  $\beta_0$  representa o termo constante,  $\beta_i$  simboliza os coeficientes dos parâmetros lineares,  $k$  representa o número de variáveis independentes,  $x$  representa as variáveis independentes,  $y$  representa as variáveis dependentes e  $\varepsilon$  descreve a componente de erro aleatório. Este modelo descreve uma resposta linear sem qualquer curvatura [25, 43, 50].

Para determinar a curvatura é necessário o uso de um modelo de segunda ordem. O modelo de segunda ordem resulta da combinação do modelo linear com um termo adicional, que descreve a interação entre as diferentes variáveis independentes, se se obtiver um bom ajuste da seguinte função às respostas [25, 40, 50]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

onde  $\beta_{ij}$  representa os coeficientes dos parâmetros de interação.

Os modelos lineares e de segunda ordem são frequentemente utilizados em estudos de *screening* e em estudos de robustez [40].

Por fim, os modelos quadráticos permitem estudar as relações não lineares entre os fatores e as respostas, e conseqüentemente, determinar o valor ótimo destas interações. Este modelo mais complexo pode ser descrito através da seguinte equação [40]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i \leq j \leq k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

em que,  $\beta_{ii}$  representa os coeficientes do parâmetro quadrático.

Para avaliar o significado dos efeitos obtidos, e conseqüentemente, decidir quais os parâmetros que devem ser considerados no modelo final, utiliza-se um gráfico de probabilidade normal. Seguidamente, as variáveis com maior significado são analisadas através da análise de variância (*Analysis of Variance, ANOVA*), um modelo estatístico que analisa a distribuição das médias dos diferentes grupos [43].

Em relação à análise através de *PCA*, a matriz  $x$  (representando os fatores) sofre uma transformação ortogonal, e é convertida numa base ortogonal. Este modelo estatístico facilita o entendimento sobre as diferentes variáveis num menor conjunto de variáveis estatísticas, o que permite uma perda mínima de informação [52].

A análise por *PLS* é um modelo estatístico utilizado para desenvolver modelos de regressão linear entre os variáveis expetáveis e as observadas. Este modelo descreve uma relação entre a matriz  $x$  (variáveis independentes) e a matriz  $y$  (variáveis dependentes), de modo a maximizar a covariância entre as duas matrizes. Esta técnica multivariada resume as informações contidas nas diferentes matrizes com o objetivo de facilitar a obtenção de resultados [53].

A modelação dos resultados obtidos permite identificar o *Design Space (DS)*, que resulta da combinação multidimensional e da interação das condições analíticas, e que permite garantir um elevado desempenho do método analítico [25], [54].

### 1.1.7. Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um processo aplicado com a finalidade de verificar se o procedimento analítico desenvolvido para um determinado teste específico é adequado ao mesmo. Este processo permite determinar a qualidade, a confiabilidade e a robustez dos resultados obtidos, de modo a entender se o procedimento analítico pode ser utilizado de forma rotineira. O tipo de métodos analíticos físico-químicos mais comuns que são alvo de validação são: testes de identificação, testes quantitativos ou testes limite de impurezas, e teste de quantificação da SA. Para a realização deste tipo de testes é necessário determinar as diferentes características de validação, como se sumariza na Tabela 4 [41, 55 – 57].

**Tabela 4** - Parâmetros de validação para cada um dos tipos de ensaios [56, 57].

| Características de validação        | Identificação | Impurezas  |        | Doseamento da SA |
|-------------------------------------|---------------|------------|--------|------------------|
|                                     |               | Doseamento | Limite |                  |
| <b>Características obrigatórias</b> |               |            |        |                  |
| Seletividade/Especificidade         | +             | +          | +      | +                |
| Exatidão                            |               | +          | -      | +                |
| Precisão                            |               |            |        |                  |
| - Precisão intermédia               | -             | +          | -      | +                |
| - Repetibilidade                    | -             | +          | -      | +                |
| Limite de deteção                   | -             | -          | +      | -                |
| Limite de quantificação             | -             | +          | -      | -                |
| Linearidade                         | -             | +          | -      | +                |
| Gama de trabalho                    | -             | +          | -      | +                |
| Robustez                            | +             | +          | +      | +                |
| <b>Características adicionais</b>   |               |            |        |                  |
| Estabilidade de soluções            | +             | +          |        | +                |
| Estudos de filtração                | +             | +          |        | +                |
| Fator de resposta relativo          | -             | +          |        | -                |
| Testes de adequação do sistema      | +             | +          |        | +                |
| Comparação de métodos               | +             | +          |        | +                |

As características de validação podem ser divididas em características de validação obrigatórias, que são exigidas pelas entidades reguladoras, e as características de validação adicionais, que não possuem qualquer obrigatoriedade de realização, mas que complementam a validação com informação adicional sobre o método e sua aplicabilidade. Estas são discutidas seguidamente [57].

### **1.1.7.1. Características de validação obrigatórias**

#### **1.1.7.1.1. Seletividade**

A seletividade permite avaliar se há interferência entre os compostos em análise e os restantes compostos da amostra, como por exemplo, excipientes, produtos de degradação, e impurezas, entre outros. No desenvolvimento de métodos analíticos esta característica de validação é uma das mais importantes, uma vez que um método pouco seletivo introduz erros significativos na determinação do composto de interesse, e terá que ser otimizado [56, 58].

#### **1.1.7.1.2. Exatidão**

A exatidão permite avaliar a concordância entre os valores experimentais obtidos e o valor de referência. A determinação desta característica pode ser feita: (i) pela análise de amostras de concentração conhecida (padrões), comparadas com um valor de referência, (ii) pelo método de sobrecarga de placebo, e (iii) pelo método de adição de padrão. O método de sobrecarga de placebo consiste na adição de uma quantidade conhecida de SA numa amostra de placebo. O método de adição de padrão é caracterizado pela quantificação de uma amostra, à qual posteriormente é adicionada uma quantidade conhecida de SA. Os resultados de ambas as análises são depois comparados com o resultado de referência. Nestes dois últimos métodos, a recuperação é descrita como a relação entre os valores observados e os previstos e é expressa em percentagem (%) [57, 59].

De acordo com a *guideline ICH Q2(R1)*, a exatidão, por sobrecarga de placebo, deve ser realizada no mínimo com nove amostras, ou seja, três amostras em três diferentes níveis de concentração, que devem integrar uma gama específica. A gama de concentrações varia de acordo com o tipo de teste a utilizar, mas para doseamento da SA numa amostra deve situar-se entre os 50% e os 150% [56, 57].

No caso do método de quantificação de impurezas, a exatidão deve ser realizada entre o limite de quantificação e o limite superior de concentração da gama de trabalho, por exemplo, entre 0,05% e 2% da concentração de trabalho [56].

#### **1.1.7.1.3. Precisão**

A precisão permite determinar o grau de dispersão entre um conjunto de medições obtidas com recurso a múltiplas análises da mesma amostra homogénea. Esta

característica é obtida a partir do desvio padrão medido e dos valores médios, como descreve a seguinte equação [41, 56]:

$$\%CV = \frac{DP}{Média} \times 100$$

Em que CV significa coeficiente de variação e DP o desvio padrão.

A precisão pode ser avaliada através da precisão intermédia e repetibilidade (de sistema e/ou analítica). A repetibilidade traduz a precisão de resultados obtidos sobre as mesmas condições num pequeno intervalo de tempo. Sendo assim, para determinar esta característica é necessário analisar um mínimo de nove amostras numa gama de concentrações específica, ou um mínimo de seis amostras a 100% da concentração utilizada. O grau de variação entre as amostras é determinado através do desvio-padrão dos valores obtidos, que deve ser inferior a 2,0% para a análise de doseamento de SA em produto acabado [16, 56, 59].

A precisão intermédia traduz a dispersão obtida tendo em conta variações intra-laboratoriais, e possibilita a medição da sensibilidade do método a pequenas variações como o equipamento, o dia em que se realiza a análise, ou o técnico que realiza o procedimento. Esta pode ser determinada através da realização de um ensaio num equipamento diferente, num dia diferente. Contudo, este procedimento deve ser efetuado por um segundo técnico. Para métodos de doseamento, o coeficiente de variação agrupado das duas séries de resultados deve ser igual ou inferior a 3,0% e a diferença relativa entre as médias dos resultados das duas séries deve ser igual ou inferior a 3,0% [16, 60].

#### **1.1.7.1.4. Limite de deteção (LOD)**

O limite de deteção, LOD, é caracterizado como a quantidade mínima numa amostra que pode ser detetada, o que não significa tal quantidade possa ser quantificada com um nível de exatidão e precisão adequados. A determinação deste parâmetro de validação pode ser baseada na avaliação visual, relação sinal-ruído, desvio-padrão da resposta, desvio padrão do branco e curva de calibração. Todavia, a determinação mais comum desta característica é a curva de calibração através da seguinte equação [16, 56, 59]:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

em que  $\sigma$  representa o desvio padrão da resposta e  $s$  descreve o declive da curva de calibração.

#### 1.1.7.1.5. Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação, LOQ, é descrito como a concentração mais baixa de um determinado composto numa amostra, que pode ser doseado com uma adequada exatidão e precisão, nas condições operacionais do método. O método mais utilizado para determinar este parâmetro é também a curva de calibração obtida através da seguinte equação [16, 56, 59]:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

em que  $\sigma$  representa o desvio padrão da resposta e  $s$  descreve o declive da curva de calibração.

#### 1.1.7.1.6. Gama de trabalho

A gama de trabalho é o intervalo de concentrações em que o método analítico pode ser efetuado, com um grau aceitável de linearidade, exatidão e precisão, de acordo com a finalidade deste. A gama de trabalho pode ser determinada através da homogeneidade de variâncias segundo a ISO 8466 – 1. Este método determina a gama de trabalho através da comparação entre o valor do teste de progressão geométrica ( $PG$ ) e o valor correspondente ao teste  $F$  de *Snedecor/Fisher*, para  $(N-1)$  graus de liberdade. O teste de  $PG$  resulta da razão entre as variâncias das concentrações padrão mais elevadas e mais reduzidas [16, 58, 61, 63].

A utilização deste método implica a preparação de dez replicados da concentração mais elevada e da menos elevada, de modo a determinar a variância para os dois extremos da reta da curva de calibração. Posteriormente, o valor do teste  $PG$  é calculado, com recurso à seguinte equação [61]:

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \text{ para } S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \text{ para } S_1^2 > S_{10}^2$$

Seguidamente, o valor  $PG$  é comparado com o valor do teste de  $F$ , obtido para o nível de confiança pretendido. Se  $PG$  for inferior a  $F$ , a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho está corretamente ajustada. Pelo contrário, se o valor de  $PG$  for superior a  $F$ , a diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho não está adequadamente ajustada [61].

#### 1.1.7.1.7. Linearidade

A linearidade é caracterizada como a capacidade de obter resultados que são direta ou indiretamente proporcionais à concentração de analito numa amostra. Este parâmetro de validação pode ser avaliado através de diferentes métodos, nomeadamente a curva de calibração, o teste de Mandel, o teste de Rikilt e a análise de resíduos [58, 62, 63].

O uso de uma curva de calibração é o método mais simples, em que a linearidade é determinada através da relação entre a gama de concentrações de trabalho ( $\mu\text{g/mL}$ ) e a área do pico (mAU.s) correspondente às diferentes concentrações. A representação gráfica desta relação permite determinar e analisar o valor do declive, da interseção e do coeficiente de regressão da reta. Assim, para que a gama de trabalho selecionada seja considerada linear é necessário que o valor do coeficiente de regressão seja um valor entre 0,985 a 1,00 [16, 56].

De acordo com a ISO 8466 – 1, o teste de Mandel é o teste estatístico que compara as duas relações entre os pontos experimentais obtidos e os ajustes de regressão linear e polinomial, e através dessa comparação demonstra se o ajuste linear é aceitável para esse conjunto de pontos. A seleção do tipo de ajuste através deste teste implica a comparação do erro do padrão residual ( $S_{y/x}$ ) dos modelos lineares e não lineares com recurso ao teste- $F$  de hipótese nula. Inicialmente é necessário calcular o desvio-padrão residual das curvas de calibração linear e não linear e, posteriormente, a diferença entre as variâncias ( $DS^2$ ) de ambas as funções através da seguinte equação [61, 63]:

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

em que  $S_{1y/x}$  corresponde ao desvio-padrão residual da curva de calibração linear,  $S_{2y/x}$  determina o desvio-padrão residual da curva de calibração não linear, e N corresponde ao número de níveis de concentração [61, 63].

Posteriormente, calcula-se o valor teste  $VT$  que será comparado com o valor do teste  $F$  de *Fischer-Snedecor* ( $F$ ) para  $(N-3)$  graus de liberdade. O valor teste  $VT$  é determinado através da seguinte equação [61 - 63]:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y/x}^2 (2^\circ)}$$

sendo que  $DS^2$  representa a diferença entre as variâncias e  $S_{2y/x}$  determina o desvio-padrão residual da curva de calibração não linear. Assim sendo, se o valor teste  $VT$  for superior ao valor do teste  $F$  de *Fischer-Snedecor* ( $F$ ) para  $(N-3)$  graus de liberdade, o modelo não linear fornece um ajuste significativamente superior ao modelo linear. No entanto, se o  $VT$  for menor que o valor de  $F$  o modelo linear é o que apresenta um ajuste mais robusto [61 - 63].

Para complementar o teste de Mandel é necessário recorrer à análise de resíduos. A análise de resíduos é determinada através da relação entre a resposta prevista (sinal estimado pela reta de calibração para cada concentração de analito) e a resposta real, como demonstra a seguinte equação [64]:

$$\text{Resíduo (\%)} = \frac{(\text{resposta prevista} - \text{resposta real})}{\text{resposta prevista}} \times 100$$

O valor de resíduos obtido deve variar entre -2 e 2%, no entanto o valor ótimo deve ser próximo de 0, o que significa que a linearidade pode ser representada por uma curva de calibração linear. Adicionalmente, a representação gráfica dos valores residuais (diferença entre o sinal estimado pela reta e o sinal real), em função da concentração de analito, deverá apresentar uma distribuição aleatória [62, 64].

O teste de Rikilt analisa a linearidade de cada um dos pontos da curva de calibração, através da relação entre a concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) e o fator de resposta ( $\text{mAU.s.mL/ug}$ ). Deste modo, a percentagem que descreve esta relação deve variar entre os 98 e os 102%,

sendo que o valor ótimo é 100%. Assim, se no teste de Rikilt os valores estiverem entre o intervalo de aceitação a curva de calibração é considerada linear [65].

#### **1.1.7.1.8. Robustez**

A robustez é um parâmetro de validação que permite determinar a capacidade de variação do método analítico, uma vez que estuda os resultados obtidos com possíveis pequenas variações aos parâmetros do método analítico, que podem ocorrer. A resposta do método a estas pequenas variações deliberadas permite indicar se o método é suficientemente robusto e confiável durante o seu uso rotineiro. As variações podem estar relacionadas com a proporção de um componente da fase móvel, a temperatura da coluna, o pH da fase móvel, entre outro [56, 59].

#### **1.1.7.2. Características de validação adicionais**

##### **1.1.7.2.1. Estudos de filtração**

Este tipo de estudo, embora não obrigatório, é bastante importante quando a preparação da amostra exige o processo de filtração. O estudo é obtido por comparação das taxas de recuperação das preparações filtradas e não filtradas para um analito ou impurezas [57].

##### **1.1.7.2.2. Fator de resposta relativa (RRF)**

O RRF é determinado através da razão entre o fator de resposta do analito e o fator de resposta do componente de referência nas mesmas condições operacionais, aplicado em métodos de quantificação de impurezas [57].

##### **1.1.7.2.3. Testes de adequação do sistema**

As características e os limites do teste de adequação do sistema permitem garantir que a metodologia e o equipamento estão a funcionar de acordo com o esperado para a realização da análise das amostras. Os testes de adequação de sistema devem ser definidos com base na experiência laboratorial obtida durante o desenvolvimento do método e/ou nas condições obtidas no pior caso do teste de robustez. Estes testes estão relacionados com o tipo de método analítico e com os limites de especificação que o método suporta [57].

#### **1.1.7.2.4. Comparação ou Equivalência de métodos**

A comparação de métodos permite demonstrar que o método mais recentemente desenvolvido é apropriado para as análises de um determinado analito, comparando os resultados dessas análises com análises efetuadas através dos métodos antigos. Contudo, é espectável que o método mais recentemente desenvolvido seja melhor do que os anteriores [57].

### **1.2. Métodos Cromatográficos**

Os métodos cromatográficos são métodos físicos de separação, em que os analitos a serem separados são distribuídos em duas fases distintas. Estas fases designam-se por fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária apresenta-se, normalmente, de forma sólida ou em líquido adsorvido à superfície do suporte sólido. Por outro lado, a fase móvel é quase sempre um líquido ou um gás [66, 67].

Este métodos podem ser classificados de acordo com diversos fatores, como o tipo de fase estacionária ou móvel, tipo de equipamento e processos de separação. Deste modo, através do tipo de fase móvel, a cromatografia pode ser classificada em líquida (CL), gasosa (CG) e de fluídos supercríticos (CFS), dependendo se a mesma é um líquido, um gás ou um fluído supercrítico, respetivamente. Contudo, esta classificação ainda pode ser mais detalhada através da adição do tipo da fase estacionária [68, 69].

Relativamente à classificação de acordo com o tipo de separação/equipamento, esta divide-se em duas técnicas distintas, nomeadamente cromatografia em coluna e planar. Estes dois tipos de cromatografia diferem no tipo de suporte onde a fase estacionária se encontra. No caso da cromatografia planar, a fase estacionária é suportada por uma superfície, enquanto que na cromatografia em coluna, a fase estacionária está inserida numa coluna fechada. Deste modo a cromatografia planar inclui a cromatografia em papel e de camada fina e a cromatografia de coluna engloba a CL, CG e a CFS

Em relação aos diferentes mecanismos de separação, a cromatografia pode ser designada por cromatografia de adsorção, de partição, líquida, de troca iónica, de interação iónica, de exclusão molecular, de afinidade e a líquida micelar [68, 69].

#### **1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

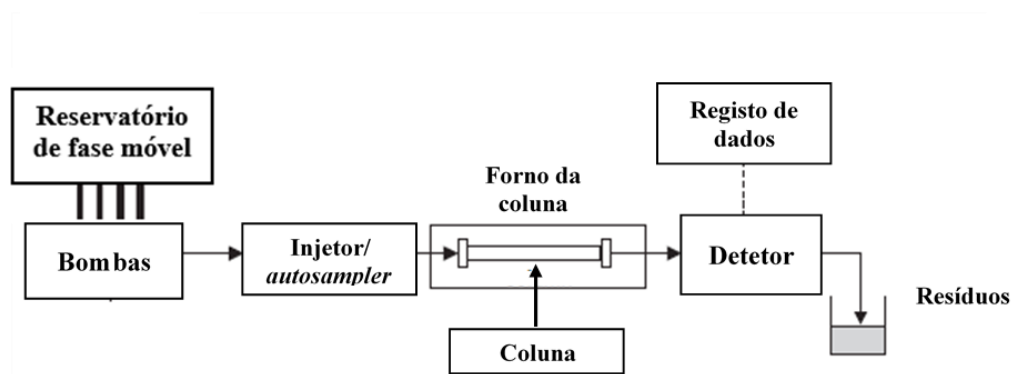
A cromatografia líquida é descrita como um método analítico que permite a separação de diferentes compostos químicos presentes numa amostra. O mecanismo de separação ocorre através de interação seletiva entre as moléculas de soluto (amostra) e a fase móvel

e estacionária. A fase estacionária consiste numa coluna cromatográfica que no seu interior contém material de enchimento formando por pequenas partículas. A fase móvel flui continuamente ao longo do sistema, deslocando a amostra injetada pela coluna até ao detetor [70, 71].

As substâncias contidas na amostra apresentam diferentes graus de afinidade com a fase móvel e estacionária, desta forma as velocidades de migração também são diferentes, o que permite a separação cromatográfica. Deste modo, uma substância com menor afinidade com a coluna elui primeiro, do que uma substância que tenha uma maior afinidade com a mesma [70].

### 1.2.1.1. Sistema Cromatográfico

O sistema cromatográfico utilizado para este tipo de separação cromatográfica é constituído por diferentes sistemas, nomeadamente um sistema de reservatório de fase móvel, de bombas, de injeção, analítico, de deteção e de aquisição e registo de dados, Figura 8 [70, 71].



**Figura 8** – Esquema de um Sistema de HPLC. Adaptado de [71]

O sistema de reservatório de fase móvel é descrito como local onde se encontram os diferentes solventes, que irão ser utilizados como fase móvel. O sistema de bombas permite gerar um fluxo consistente de fase móvel através do sistema. O fluxo gerado deve ser o mais estável possível, de forma a minimizar o ruído no detetor. As bombas normalmente deve suportar pressões relativamente elevadas [70, 71].

O sistema de injeção pode ser de três tipos distintos, tais como: injeção direta através de seringa, válvula de injeção e válvula de injeção automática. Atualmente, o sistema de

injeção mais utilizado é a válvula de injeção automática, uma vez que introduz automaticamente a amostra no fluxo da fase móvel [70, 71].

O sistema analítico é constituído pela coluna cromatográfica e pelo forno onde esta se encontra. A coluna exerce a função de fase estacionária permitindo a separação dos compostos em análise e o forno da coluna certifica que a temperatura da coluna se mantém constante durante a separação [70, 71].

O sistema de deteção permite identificar e quantificar os compostos de interesse, por meio de um sinal eléctrico, que é proporcional à concentração dos compostos na amostras. Os detetores podem ser de diferentes tipos, nomeadamente de fluorescência, UV-Vis, rede de díodos (DAD), entre outros [70, 71].

Por fim, o sistema de tratamento de dado que transforma o sinal eléctrico do detetor em cromatogramas, que mostram os picos correspondentes aos diferentes componentes da amostra [70, 71].

#### **1.2.1.2. Parâmetros característicos dos picos cromatográficos**

Os picos cromatográficos apresentam diferentes características, que devem ser estudadas no desenvolvimento de qualquer método analítico, nomeadamente o tempo de retenção dos picos, o tempo morto, o tamanho e largura do pico, a eficiência da coluna e o número de pratos teóricos, a resolução e o fator de simetria, entre outros [71].

O tempo de retenção é caracterizado pelo tempo entre a injeção da amostra e o pico de interesse obtido. Contudo, o tempo de retenção pode ser ajustado, uma vez que o tempo de retenção total inclui o tempo morto, que se designa pelo tempo que a fase móvel demora a atravessar a coluna e atingir o detetor. Normalmente, este tempo é determinado por um composto com baixa ou nenhuma afinidade pela fase estacionária [71, 72].

Outros dois parâmetros característicos dos picos, também estudados são a largura e a altura do pico. A largura do pico pode ser medida em duas regiões distintas do mesmo, na base ou a meia altura deste. A altura do pico descreve a distância entre a linha de base e o ponto de inflexão do pico [71].

O número de pratos teóricos é um parâmetro essencial a ser estudado, uma vez que permite avaliar a eficácia da coluna cromatográfica. Uma coluna eficiente produz picos mais estreitos e pode conseguir separar muitos componentes da amostra num curto espaço de tempo. Os picos mais estreitos apresentam o número de pratos teóricos maior, logo quando maior o número de pratos teóricos maior a eficácia da coluna cromatográfica. Em

termos de limites de especificação, para um pico cromatográfico ser aceitável em relação ao número de pratos teóricos, estes devem ser sempre superiores a 2000 [71].

O estudo de um cromatograma não se pode direcionar exclusivamente para pico de interesse, o estudo deve abranger todos os picos, e conseqüentemente o modo como estes estão separados. Desta forma, para estudar o grau de separação de dois analitos adjacentes estuda-se um parâmetro designado por resolução. Assim, quando maior for a separação dos picos maior o valor correspondente à resolução [71].

Relativamente ao fator de simetria, este permite determinar o grau de simetria do pico, e conseqüentemente avaliar a qualidade cromatografia dos picos. Em condições ideais, os picos cromatográficos devem apresentar uma distribuição *gaussiana*, de modo a se obter uma simetria perfeita. Contudo, na realidade a maioria dos picos não apresenta uma simetria perfeita, desta forma considera-se um limite de aceitação para o fator de simetria entre os 0,8 e 1,5 [71].

### **1.3. Medicamentos Antidepressivos**

Os medicamentos antidepressivos são frequentemente utilizados para o tratamento de um conjunto de doenças depressivas e outros transtornos psiquiátricos. Há vários tipos de medicamentos antidepressivos, tais como: antidepressivos tricíclicos (ADTs), antidepressivos tetracíclicos (ADTC), inibidores da monoamina oxidase (IMAO), inibidores seletivos da recaptção da serotonina e da noradrenalina (ISRSN) e inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS). Os ISRS incluem moléculas como fluoxetina, escitalopram, fluvoxamina, sertralina e paroxetina. Enquanto, os ISRSN contém moléculas com venlafaxina e milnacipram [73 – 75].

Os ISRS inibem o transportador de serotonina no neurónio pré-sináptico responsável pela recaptção desta provocando um aumento nos níveis de serotonina na fenda sináptica. O aumento dos níveis serotoninérgicos na fenda sináptica originam, conseqüentemente uma maior atividade neuronal no neurónio pós-sináptico[76].

Todavia, este tipo de antidepressivos podem apresentar efeito anti-inflamatório em doentes portadores de doenças anti-inflamatórias, como a psoríase [77].

#### **1.3.1. Antidepressivos em doenças anti-inflamatórias**

A administração sistémica de alguns medicamentos antidepressivos em pessoas portadoras de doenças inflamatórias, como a psoríase, permite melhorar os sintomas, com a redução das complicações associadas [78].

A psoríase é uma doença inflamatória em que o stress crónico tem um grande impacto nos sintomas dermatológicos. A psoríase manifesta-se através do aparecimento, na pele, de placas vermelhas revestidas por escamas micáceas prateadas. Vários estudos têm sugerido que estas lesões dermatológicas são consequência do aumento da ativação de células T e células dendríticas, parte do sistema imunitário da pele. Estas e outras células imunes produzem citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que desencadeiam inflamação e levam à proliferação de queratinócitos. Os queratinócitos acumulam-se na camada epidérmica da pele, induzindo manchas espessas e escamosas [77 – 79].

Contudo, Chapman *et al* (2009) sugere que a resposta inflamatória da psoríase pode não estar localizada apenas na pele. Deste modo, pode ser considerada uma doença inflamatória sistémica. A pele é um local altamente inervado onde se localizam um conjunto de neuropeptídeos, nomeadamente catecolaminas, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), péptido intestinal vasoativo e fator de crescimento neural (NGF). O aumento destes neuropeptídeos e ativação do sistema nervoso autónomo estão fortemente relacionados com as lesões psoriáticas [80].

A psoríase está relacionada com a elevada incidência de doenças psicológicas em pessoas portadoras desta doença autoimune. Os elevados níveis de angústia em paciente portadores de psoríase provavelmente afetam esta doença devido à libertação, na pele ou circulação sanguínea, de substâncias de respostas ao stress. Deste modo, é possível existir um eixo hipotálamo-hipófise-adrenal semelhante na pele, que com o stress desencadeia a secreção localizada de hormonas adrenocorticotrópicas e glicocorticoides [80].

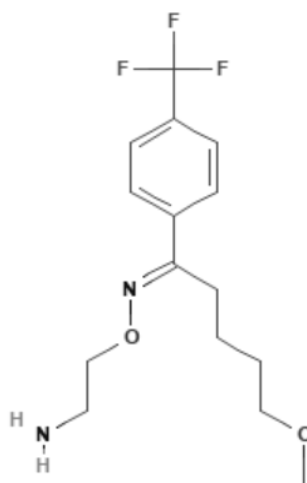
### **1.3.2. Caracterização da fluvoxamina e do ácido maleico**

A fluvoxamina pertence ao grupo dos ISRS e é bastante eficaz no tratamento de diferentes doenças psíquicas, induzindo o aumento da serotonina sináptica pela inibição seletiva da recaptção da serotonina para os neurónios pré-sinápticos [79, 81].

A fluvoxamina apresenta-se em forma de pó branco e cristalino com um peso molecular de 434,4 g/mol. Esta SA é solúvel em água, etanol (96%) e em metanol e um pKa de 8,86. A molécula apresenta uma absorvidade máxima aos 234 nm [82].

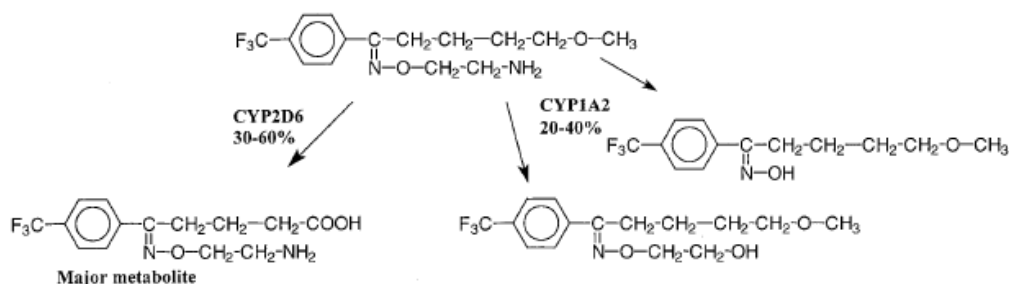
Quimicamente, a fluvoxamina é designada por 5-metoxivalerofenona O-(2-aminoetil)oxima e pertence ao grupo dos (trifluorometil)benzenos. Esta estrutura química não apresenta quiralidade, mas a ocorrência de uma ligação dupla entre um carbono e um azoto implica o desenvolvimento de dois estereoisómeros diferentes, *E* (*trans*) e a *Z* (*cis*).

A configuração frequentemente presente nos fármacos é a configuração *trans* (Figura 9), enquanto a configuração *cis* não representa mais do que 3% [83 – 85].



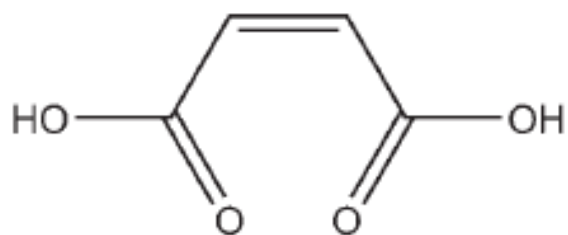
**Figura 9** - Estrutura química da *trans*-fluvoxamina [83].

Esta molécula é maioritariamente (~96%) metabolizada no fígado, e a desmetilação oxidativa do grupo metoxi pelo citocromo *CYP2D6* leva à formação do metabolito principal, o ácido de fluvoxamina (4-carboxi-1-[4-(trifluorometil)-fenil]-1-butano-O-(2-aminoetil)oxima) (Figura 10) [84 – 86].



**Figura 10** - Metabolitos formados através do metabolismo da fluvoxamina no fígado [83].

Todavia, a fluvoxamina presente nas formulações surge sempre combinada com o ácido maleico, que consequentemente origina o maleato de fluvoxamina. O ácido maleico é um intermediário químico multifuncional, que apresenta várias aplicações a nível industrial. Quimicamente, este é denominado por ácido *cis*-butenodioico e constituído por quatro carbonos com dois grupos carboxilos (Figura 11) [87].



**Figura 11** - Estrutura química da ácido *cis*-butenodioico [87].

Esta molécula apresenta entre os átomos dos carbonos centrais uma ligação dupla, que conseqüente permite a existência de dois estereoisômeros diferentes, E (*trans*) e a Z (*cis*). O estereoisômero *trans* é designado por ácido fumárico. Contudo, o ácido maleico é menos estável que o ácido fumárico, logo este composto menos estável é usado para se obter ácido fumárico por isomerização catalítica. A nível farmacêutico, o ácido maleico é normalmente utilizado com intermediário para formar os sais maleato[87 – 89].

## 2. Objetivos

O desenvolvimento de um método analítico preditivo de estabilidade é um procedimento exigente e longo. Este método possibilita a quantificação da substância ativa (SA) e dos respetivos produtos de degradação que se formam em diferentes condições. O conhecimento sobre os produtos de degradação resulta *a priori* de diferentes estudos, nomeadamente estudos de degradação forçada e estudos de estabilidade acelerada e a longo-prazo. Os estudos de degradação forçada permitem identificar os produtos de degradação, que se formam em condições de *stress*. Por outro lado, os estudos de estabilidade permitem identificar os produtos de degradação que se formam nas condições normais de armazenamento. Os produtos de degradação obtidos podem ser comparados com as seis impurezas conhecidas descritas na Farmacopeia Europeia 10 (Ph.Eur. 10).

Uma vez que o tempo de desenvolvimento de métodos analíticos é uma limitação, recorreu-se à abordagem de *QbD*. Deste modo, o Laboratório Edol – Produtos farmacêuticos, S.A propôs a realização de uma dissertação que consiste na avaliação da estabilidade de formulações semi-sólidas, que contém fármacos serotoninérgicos, com recurso ao *QbD*.

Esta dissertação tinha como objetivo desenvolver um método analítico preditivo de estabilidade que conseguisse quantificar a SA e os produtos de degradação, recorrendo ao *DoE* e, subsequentemente, proceder à validação do método desenvolvido.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Materiais**

Os materiais utilizados formaram padrão *USP* de fluvoxamina da *Cymitquimica* (Espanha); Fluvoxamina da *Medichem* (Espanha); Di-hidrogenofosfato de potássio da *VWR chemicals* (USA); Pentanossulfonato de sódio da *Fisher Chemical* (USA); Ácido ortofosfórico 85% e acetonitrilo (Grau pureza para HPLC) da *Honeywell* (USA); Ácido clorídrico 1M e Hidróxido de sódico 1M da *Carlos Erba* (Espanha); Peróxido de hidrogénio 30% da *PanReac AppliChem* (USA).

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. Desenvolvimento de um método analítico para quantificação de fluvoxamina através de *Quality-by-Design*.**

###### **3.2.1.1. Análise de Risco**

###### **3.2.1.1.1. Identificação dos parâmetros críticos**

A identificação do risco foi realizada com recurso ao diagrama de Ishikawa, que auxiliou a seleção das possíveis causas, que podiam influenciar o desenvolvimento dos métodos analíticos. As causas identificadas foram o equipamento, o ambiente envolvente, os resultados, o método e o operador. Em cada uma destas causas, existem várias falhas que podem influenciar negativamente a finalidade do trabalho.

###### **3.2.1.1.2. Avaliação do risco**

A metodologia aplicada para a avaliação do risco foi a FMEA. Esta análise quantitativa, implicou a construção de uma tabela que relacionou a probabilidade, a severidade e a deteção do risco. Os diferentes fatores foram classificados com uma pontuação entre 1 e 10, que resultou de questionários realizados à equipa de controlo de qualidade dos Laboratórios Edol. A classificação desses fatores permitiu consequentemente calcular o RPN e CRIT. A pontuação da probabilidade de falha foi de 1 a 10, sendo um 1 a menos provável e 10 a mais provável. A severidade de cada um dos efeitos variou entre 1 e 10, sendo 1 o menos severo e 10 o mais severo. A deteção correspondente a cada falha apresentou uma classificação de 1 a 10, sendo 1 a

probabilidade de deteção máxima e 10 a probabilidade de deteção mínima, como descrito na Tabela 5.

**Tabela 5** - Classificação da probabilidade, severidade e deteção do risco.

| Nível | Probabilidade       | Severidade      | Deteção                  |
|-------|---------------------|-----------------|--------------------------|
| 10    | Quase inevitável    | Falha sem aviso | Absolutamente impossível |
| 9     | Extremamente alta   | Falha com aviso | Muito remota             |
| 8     | Muito alta          | Muito alta      | Remota                   |
| 7     | Alta                | Alta            | Muito Baixa              |
| 6     | Moderadamente alta  | Moderada        | Baixa                    |
| 5     | Moderada            | Baixa           | Moderada                 |
| 4     | Moderadamente baixa | Muito Baixa     | Moderada alta            |
| 3     | Baixa               | Pequena         | Alta                     |
| 2     | Muito Baixa         | Muito pequena   | Muito alta               |
| 1     | Remota              | Nenhuma         | Quase inevitável         |

Posteriormente à classificação de cada um dos fatores, o RPN foi calculado através da equação presente na secção 1.1.4. O valor de RPN permitiu identificar quais as falhas, que apresentam um maior risco para o objetivo definido.

### 3.2.1.2. Fatores e Resposta

A análise de risco permitiu a seleção de dois fatores de risco, que conseqüentemente foram estudados em três diferentes níveis, como descrito na secção 3.2.1.3 na Tabela 7. Contudo, também foi necessário definir as respostas, Tabela 6, que avaliaram a qualidade e a eficácia do método cromatográfico.

**Tabela 6** - Variáveis dependentes utilizadas no planeamento experimental.

| Respostas (Variáveis Dependentes) | Níveis |     |     |
|-----------------------------------|--------|-----|-----|
|                                   | Min    | Obj | Máx |
| Fator de simetria                 | 0,8    | 1   | 1,3 |
| Tempo de retenção                 | 4,5    | 5   | 5,5 |
| Número de pratos teóricos         | 2000   | NA  | NA  |

*Em que min significa o valor mínimo de resposta aceitável, obj – o valor alvo das respostas, máx – o valor máximo aceitável e NA – não aplicável.*

### 3.2.1.3. Planeamento Experimental

O planeamento experimental, obtido através do software *MODDE Pro 12.1*, era constituído por 12 experiências, das quais 9 corresponderam ao *FFD* e 3 aos pontos centrais, Tabela 7. Os dados analisados através deste software e os efeitos foram considerados significativos para um valor de probabilidade (*P*) menores a 0,05 (erro  $\alpha$ ), de modo a aumentar a exigência estatística. Os resultados obtidos foram ajustados através da seguinte equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

Esta equação descreve os efeitos zero e os de segunda ordem, assim como as interações entre as variáveis independentes.

**Tabela 7** - Planeamento experimental aplicado no desenvolvimento do método cromatográfico.

| Experiência | Níveis dos Fatores                    |      |                              |      |
|-------------|---------------------------------------|------|------------------------------|------|
|             | Concentração de ACN da fase móvel (%) |      | Volume de injeção ( $\mu$ L) |      |
| 1           | -1                                    | 30   | -1                           | 5    |
| 2           | 0                                     | 37,5 | -1                           | 5    |
| 3           | 1                                     | 45   | -1                           | 5    |
| 4           | -1                                    | 30   | 0                            | 12,5 |
| 5           | 0                                     | 37,5 | 0                            | 12,5 |
| 6           | 1                                     | 45   | 0                            | 12,5 |
| 7           | -1                                    | 30   | 1                            | 20   |
| 8           | 0                                     | 37,5 | 1                            | 20   |
| 9           | 1                                     | 45   | 1                            | 20   |
| 10          | 0                                     | 30   | 0                            | 12,5 |
| 11          | 0                                     | 30   | 0                            | 12,5 |
| 12          | 0                                     | 30   | 0                            | 12,5 |

*Em que as experiências 10, 11 e 12 correspondem aos pontos centrais. O -1 significa o mais baixo do nível estudado, 0 – o nível intermédio estudado e 1 – o nível superior estudado.*

### 3.2.2. Condições cromatográficas

A quantificação da fluvoxamina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). As condições cromatográficas utilizadas no método de quantificação de fluvoxamina sumarizadas na

Tabela 8, são resultado da otimização do método farmacopeia Ph. Eur. 10 através de *QbD*. Em relação ao método de quantificação de impurezas de fluvoxamina não foi aplicado nenhum *DoE*.

**Tabela 8** - Condições utilizadas na quantificação de fluvoxamina e das impurezas por HPLC.

|  | <b>Quantificação da fluvoxamina</b>     | <b>Quantificação das impurezas</b>      |
|--|---|---|
| <b>Fase Móvel</b>  | 60% solução<br>tampão:40% acetoneitrilo | 69% solução<br>tampão:31% acetoneitrilo |
| <b>Coluna</b><br>(comprimento (mm) x<br>diâmetro interno (mm),<br>diâmetro da partículas (µm)) | Inertsil® C8 (250 × 4,6; 5)             | Purospher® C8 (250 × 4,6;<br>5)         |
| <b>Fluxo</b> (mL/min)  | 1,2                                     | 1,2                                     |
| <b>Volume de injeção</b> (µL)  | 6                                       | 25                                      |
| <b>Tempo de corrida</b> (min)  | 20                                      | 90                                      |
| <b>Comprimento de onda</b><br>(c.d.o) (nm)   | 234                                     | 234                                     |
| <b>Temperatura da coluna</b> (°C)  | 22                                      | 22                                      |
| <b>Temperatura do autosampler</b> (°C)   | 22                                      | 22                                      |

### 3.2.3. Preparação da solução padrão de fluvoxamina

Uma quantidade de padrão de fluvoxamina (aproximadamente 20 mg) foi dissolvida em 25 mL de uma mistura de tampão: ACN (63:37, v/v) para um balão volumétrico de 50 mL. A mistura foi agitada em vortex, até se obter a dissolução completa. Posteriormente, per fez-se o volume com o mesmo solvente, de modo a se obter uma concentração de 400 µg/mL. A composição do tampão foi de 1,1 g/L de di-hidrogenofosfato de potássio e 1,9 g/L de pentanossulfonato de sódio, ajustada a pH 3,0 com ácido fosfórico 85%.

### 3.2.4. Preparação das soluções das amostras

Pesou-se aproximadamente 800 mg da formulação que contém fluvoxamina e dissolveu-se em 25 mL de uma mistura de tampão: ACN (63:37, v/v) para um balão volumétrico de 50 mL. A mistura foi agitada em vortex durante 3min, e foi sujeita a o banho de ultrassons durante 5min. Posteriormente, per fez-se o volume com o mesmo

solvente, de modo a se obter uma concentração de 400µg/mL. A solução foi filtrada através de filtros de seringa com membrana PTFE de 0,45 µm.

### **3.2.5. Estudos de degradação forçada**

Os estudos de degradação forçada foram realizados através da exposição de diferentes soluções de fluvoxamina a condições de stress, nomeadamente stress hidrolítico, térmico, fotolítico e oxidativo. A condição hidrolítica foi obtida através da exposição a soluções de 1 M HCl e 1 M NaOH, a condição oxidativa foi obtida através de uma solução de 15% (v/v) peróxido de hidrogénio, a termolítica através da exposição a 55 °C, e a fotolítica por exposição à luz UV. Após o início dos ensaios de stress, as soluções em condições hidrolíticas e oxidativas foram mantidas ao abrigo da luz solar e à temperatura ambiente durante 6 dias. As outras soluções encontravam-se em locais apropriados para as respetivas condições de stress. Após este período, as soluções hidrolíticas foram neutralizadas e colocadas nas mesmas condições referidas anteriormente durante mais 5 dias. As soluções oxidativas não necessitam de neutralização, logo este procedimento não se aplica. As soluções térmicas e fotolíticas foram retiradas dos locais que originam as condições de stress, e foram colocadas nas mesmas condições que as outras soluções.

### **3.2.6. Validação do método de doseamento da fluvoxamina**

#### **3.2.6.1. Seletividade**

A avaliação da seletividade incluiu a preparação de quatro soluções distintas: solução padrão de fluvoxamina, solução da formulação contendo fluvoxamina, solução de placebo com conservantes (metilparabeno sódico e propilparabeno sódico), e solução de placebo sem conservantes. As soluções foram preparadas de acordo com o procedimento descrito nas seções 3.2.3 e 3.2.4.

#### **3.2.6.2. Linearidade**

Para o estudo da linearidade foram preparadas cinco soluções padrão, a 150%, a 125%, 100%, 75% e 50%, em relação à concentração de trabalho, a partir de uma diluição de uma solução *stock* com uma concentração de 2000 µg/mL. A solução de *stock* foi preparada de acordo com o procedimento descrito na seção 3.2.3 O esquema de diluições está sumarizado na Tabela 9.

**Tabela 9** - Esquema de diluições utilizado no estudo da linearidade durante a validação do método de doseamento da fluvoxamina.

| Níveis de concentração (%) | Volume inicial da solução <i>stock</i> (mL) | Volume final (mL) | Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----------------------------|---|-------------------|---|
| 50                         | 2   | 20                | 200                                     |
| 75                         | 3   | 20                | 300                                     |
| 100                        | 2   | 10                | 400                                     |
| 125                        | 5   | 20                | 500                                     |
| 150                        | 3   | 10                | 600                                     |

### 3.2.6.3. Exatidão

A exatidão foi determinada com recurso ao método de sobrecarga de placebo com conservantes, ou seja, pela adição de uma quantidade conhecida de SA ao placebo. Para este estudo prepararam-se três soluções para nível de concentração diferentes, nomeadamente 50%, 100% e 150%.

As amostras foram preparadas a partir da pesagem de 800 mg de placebo com conservantes para um balão volumétrico de 50 mL. Seguidamente, adicionou-se 1, 2 e 3 mL de uma solução com uma concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de SA, para preparar os níveis de 50%, 100% e 150%, respetivamente. Posteriormente, as soluções foram agitadas em vortex durante 3min e foram colocadas no banho de ultrassons por 5min, e o volume dos balões foi completo com solvente. Após a dissolução estar completa as soluções foram filtradas através de filtros de seringa com membrana PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.6.4. Precisão

#### 3.2.6.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi estudada através da análise de seis amostras à concentração de trabalho, 400  $\mu\text{g/mL}$ . As amostras foram preparadas como descrito na secção 3.2.4.

#### 3.2.6.4.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi avaliada do mesmo modo que a repetibilidade, com exceção de pequenas variações, nomeadamente o equipamento, o dia da análise, o técnico e a coluna cromatográfica.

### 3.2.6.4.3. Robustez

A robustez foi determinada através da variação de diferentes fatores do método analítico, de forma individual ou combinada, como sumarizado na Tabela 10.

**Tabela 10** - Variação dos fatores para análise da robustez do método analítico.

| <b>Valor do Fator</b>                  | <b>A1</b> | <b>A2</b>  | <b>A3</b> | <b>A4</b>  | <b>A5</b> | <b>A6</b>  | <b>A7</b> | <b>A8</b>  |
|--|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| % ACN na Fase móvel                    | 40        | 40         | 40        | 40         | <b>42</b> | <b>42</b>  | <b>42</b> | <b>42</b>  |
| Temperatura do <i>autosampler</i> (°C) | 22        | 22         | <b>30</b> | <b>30</b>  | 22        | 22         | <b>30</b> | <b>30</b>  |
| Fluxo (ml/min)                         | 1,2       | <b>1,5</b> | 1,2       | <b>1,5</b> | 1,2       | <b>1,5</b> | 1,2       | <b>1,5</b> |
| Temperatura da coluna (°C)             | 22        | 22         | <b>30</b> | 22         | <b>30</b> | 22         | <b>30</b> | <b>30</b>  |

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de fluvoxamina através de *Quality-by-Design*.**

Os métodos analíticos podem ser desenvolvidos sem qualquer conhecimento anterior ou a partir de procedimentos detalhados em monografias científicas, como a Ph. Eur. 10. Neste caso, o método desenvolvido foi baseado no método cromatográfico para a quantificação de impurezas conhecidas da fluvoxamina descrito na Ph. Eur. 10. Embora o método tenha sido desenvolvido a partir da Ph. Eur. 10, este método foi otimizado através de uma metodologia sistemática designada por *QbD*. Este tipo de metodologia moderna envolve duas temáticas, tais como a análise de risco e o planeamento experimental.

#### **4.1.1. Análise de risco**

A análise de risco inclui a identificação dos CQAs, a avaliação do risco, o planeamento das respostas ao risco e o controlo do risco. A identificação do risco foi realizada através do desenvolvimento de um diagrama de Ishikawa, onde foram selecionadas as possíveis causas, e consequentemente os modos falhas, que podiam provocar erros significativos no método cromatográfico. As causas primárias utilizadas para a criação do diagrama de Ishikawa foram (i) o equipamento, (ii) o ambiente, (iii) os resultados, (iv) o método e o (v) operador, Figura 12.

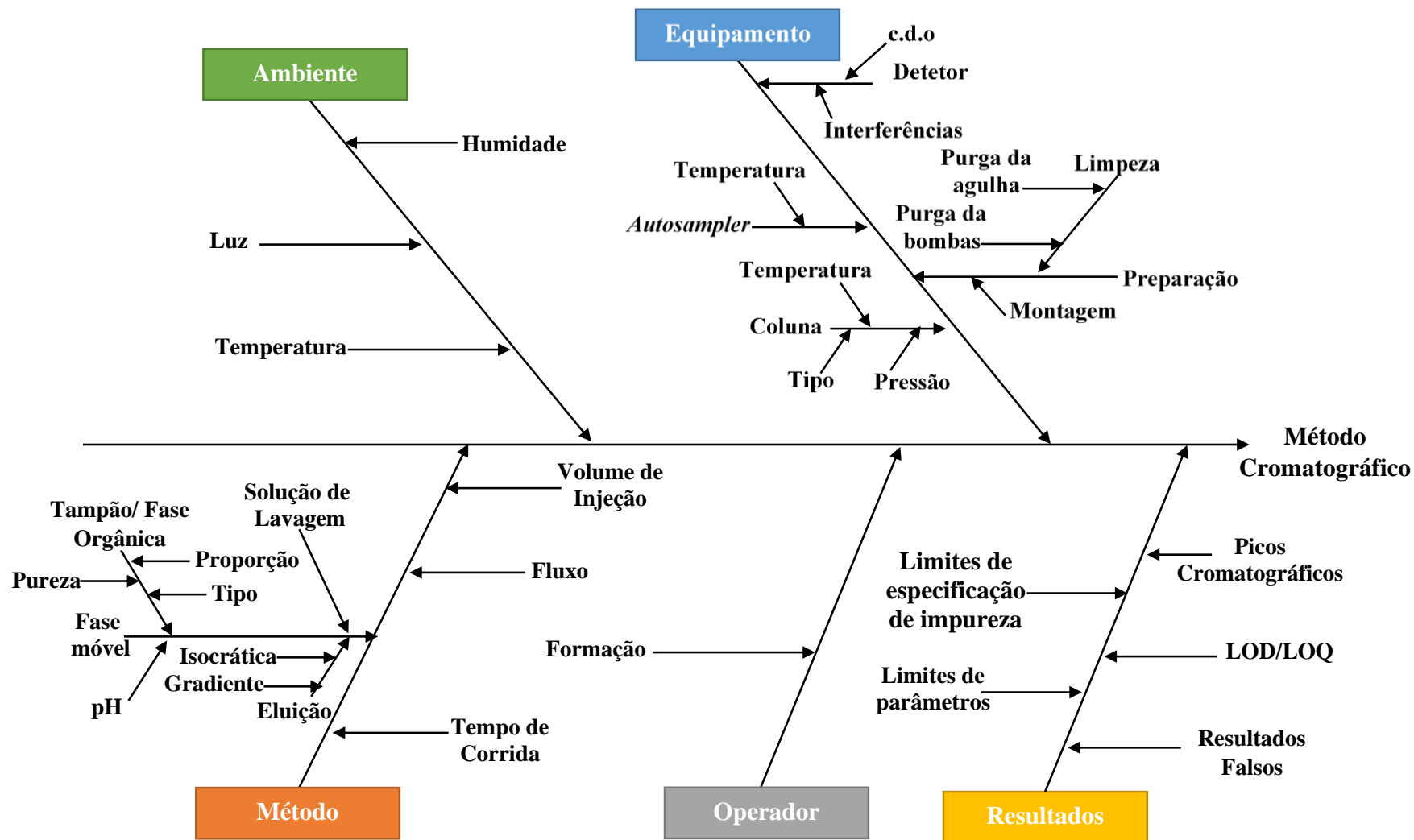


Figura 12 - Diagrama de Ishikawa para possíveis falhas no desenvolvimento de um método analíticos.

Posteriormente à identificação de todos os possíveis CQAs, o risco foi avaliado com recurso a uma análise quantitativa designada por FMEA. Este tipo de análise requer a construção de uma tabela, de modo a classificar numericamente a probabilidade, severidade e deteção do risco, através de uma pontuação de 1 a 10, como mostra a Tabela 11.

**Tabela 11** - Resumo da probabilidade, severidade e deteção com o respetivo critério e classificação.

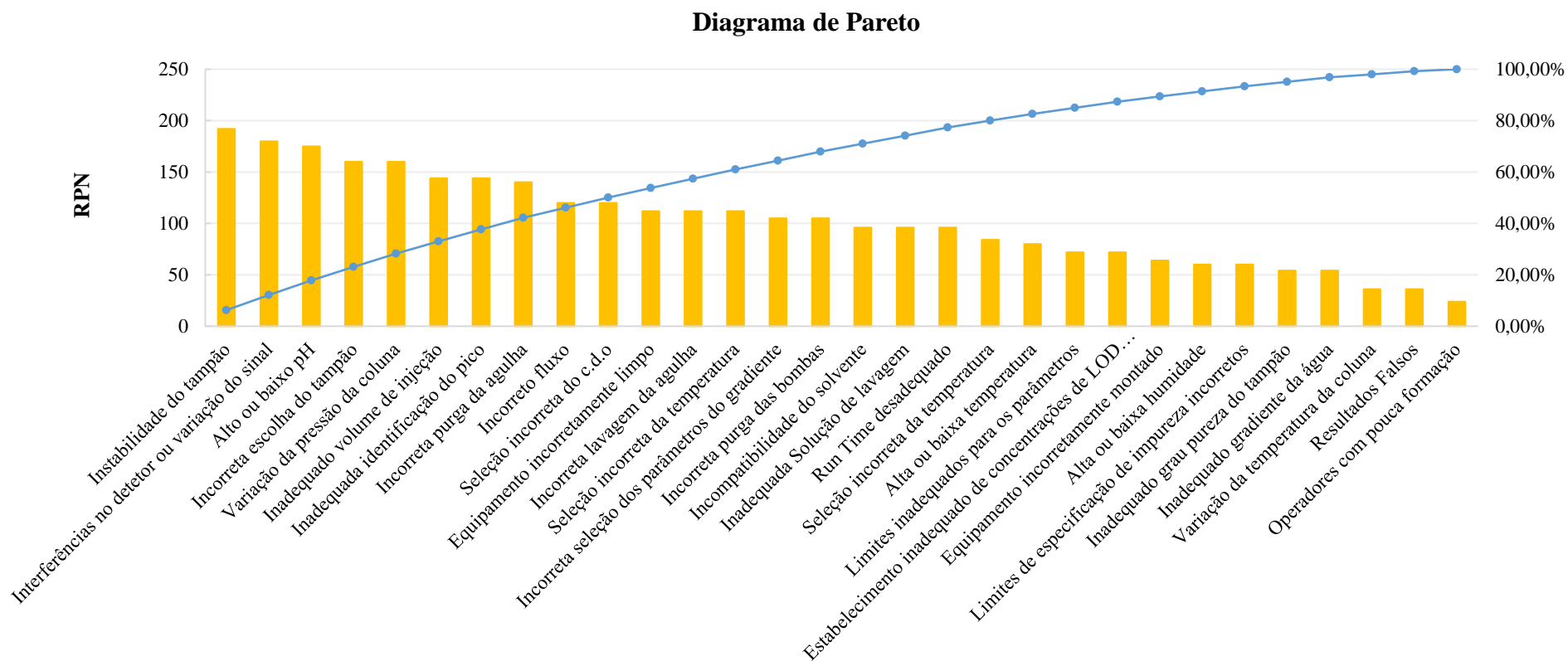
| N  | Probabilidade     |                    |                    | Severidade      |                              | Deteção          |                       |
|----|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------------------|------------------|-----------------------|
|    | Pro. Falha        | Critério           | Taxa de falha      | Efeitos         | Critério                     | Deteção          | Critério              |
| 10 | Quase inevitável  | Falhas Inevitáveis | $\frac{1}{2}$      | Falha sem aviso | Não Cumprimento da Segurança | Abs. impossível  | Sem deteção           |
| 9  | Extremamente alta |                    | $\frac{1}{3}$      | Falha com aviso |                              | Muito remota     | Deteção muito remota  |
| 8  | Muito alta        | Falhas Repetidas   | $\frac{1}{8}$      | Muito alta      | Grande Perturbação           | Remota           | Deteção remota        |
| 7  | Alta              |                    | $\frac{1}{20}$     | Alta            | Interrupção Significativa    | Muito Baixa      | Deteção muito baixa   |
| 6  | Moderada alta     | Falhas Ocasionais  | $\frac{1}{80}$     | Moderada        | Interrupção Moderada         | Baixa            | Deteção baixa         |
| 5  | Moderada          |                    | $\frac{1}{400}$    | Baixa           |                              | Moderada         | Deteção moderada      |
| 4  | Moderada baixa    |                    | $\frac{1}{2000}$   | Muito Baixa     | Interrupção Moderada         | Moderada. Alta   | Deteção moderada alta |
| 3  | Baixa             | Falhas Isoladas    | $\frac{1}{15000}$  | Pequena         |                              | Alta             | Deteção alta          |
| 2  | Muito Baixa       |                    | $\frac{1}{150000}$ | Muito pequena   | Insatisfação Mínima          | Muito Alta       | Deteção muito alta    |
| 1  | Remota            | Falhas Improváveis | $\frac{1}{500000}$ | Nenhuma         | Sem efeito                   | Quase inevitável | Deteção quase certa   |

Em que N significa o nível, Pro - probabilidade e Abs – absolutamente.

A classificação resultou da opinião, da experiência e do conhecimento de cada um dos inquiridos. Todos os inquiridos têm mais de dez anos de especialização na área, o que torna este inquéritos fidedignos, apesar do número reduzido de inquéritos. O número de inquéritos realizados foi de 4.

Com base na classificação obtida para cada risco determinou-se o valor de RPN e CRIT (Tabela A, em anexo), com base nas equações presentes na secção 1.1.4. As falhas com um elevado valor de RPN representam um risco maior do que as falhas com um valor de RPN mais reduzido. Contudo, quando dois modos de falha apresentam o mesmo RPN é necessário distinguir esse valor através do valor de CRIT. Quando os valores de CRIT também são iguais, o fator com maior risco é seleccionado com base no valor da severidade [90].

Também foi necessário estimar o grau de risco através de um diagrama de Pareto, Figura 13. Este diagrama relacionou o valor do RPN para cada uma das possíveis falhas, e conseqüentemente permitiu determinar os limites de especificação do RPN para um risco aceitável, inaceitável e intolerante.



**Figura 13** - Diagrama de Pareto para todas as possíveis falhas durante o desenvolvimento do método analítico. A linha azul representa o valor da percentagem acumulada.

Através do diagrama de Pareto, Figura 13, foi possível estipular quais os valores de RPN para as diferentes condições do risco. Para um risco aceitável, o RPN varia de 1 a 139, para um risco inaceitável o intervalo de especificação varia entre 140 e os 399, enquanto que para um risco intolerante o RPN inclui o valor de 400 até 1000. O limite de aceitabilidade depende da tolerância ao risco, de acordo com o objetivo do projeto. Com a seleção dos valores de RPN foi possível criar uma matriz de risco, conforme a Figura 14.

|                   |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |                |                      |
|-------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----------------|----------------------|
| <b>Severidade</b> | <b>1</b>  | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10   | <b>1</b>       | <b>Probabilidade</b> |
|                   | <b>2</b>  | 4   | 8   | 12  | 16  | 20  | 24  | 28  | 32  | 36  | 40   | <b>2</b>       |                      |
|                   | <b>3</b>  | 9   | 18  | 27  | 36  | 45  | 54  | 63  | 72  | 81  | 90   | <b>3</b>       |                      |
|                   | <b>4</b>  | 16  | 32  | 48  | 64  | 80  | 96  | 112 | 128 | 144 | 160  | <b>4</b>       |                      |
|                   | <b>5</b>  | 25  | 50  | 75  | 100 | 125 | 150 | 175 | 200 | 225 | 250  | <b>5</b>       |                      |
|                   | <b>6</b>  | 36  | 72  | 108 | 144 | 180 | 216 | 252 | 288 | 324 | 360  | <b>6</b>       |                      |
|                   | <b>7</b>  | 49  | 98  | 147 | 196 | 245 | 294 | 343 | 392 | 441 | 490  | <b>7</b>       |                      |
|                   | <b>8</b>  | 64  | 128 | 192 | 256 | 320 | 384 | 448 | 512 | 576 | 640  | <b>8</b>       |                      |
|                   | <b>9</b>  | 81  | 162 | 243 | 324 | 405 | 486 | 567 | 648 | 729 | 810  | <b>9</b>       |                      |
|                   | <b>10</b> | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 | <b>10</b>      |                      |
|                   |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |                |                      |
|                   |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      | <b>Deteção</b> |                      |

**Figura 14** - Matriz de risco. Em que a cor verde representa os risco aceitáveis, o amarelo os risco inaceitáveis e o vermelho os riscos intoleráveis

A matriz do risco permitiu classificar o grau de risco para todas as possíveis falhas de acordo com o valor de RPN. Desta forma, foi possível identificar 22 riscos aceitáveis, 8 inaceitáveis e nenhum intolerante. Os riscos inaceitáveis são aquelas que podem influenciar o desenvolvimento de um método analítico. Quando são detetados riscos inaceitáveis devem-se criar medidas corretivas, de modo a evitar, reduzir, eliminar e mitigar o risco, Tabela 12.

**Tabela 12** - Riscos inaceitáveis resultantes da metodologia FMEA e os respetivos efeitos, causas e controlos.

| FMEA  | RPN | CRIT | Efeitos da falha   | Causa da Falha   | Controlo da Falha  |
|---|-----|------|--|--|--|
| Instabilidade do tampão                       | 192 | 32   | Afeta a qualidade da resposta                                      | Se o tampão for volátil há uma rápida evaporação/ degradação da solução à temperatura ambiente | Agitação constante da solução tampão/ Monitorização constante da temperatura ambiente  |
| Interferência no detetor ou variação do sinal | 180 | 36   | Afeta a qualidade da resposta                                      | Fatores externos: variação da temperatura ambiente   | Monitorização constante da temperatura ambiente  |
| Alto ou baixo pH da fase móvel                | 175 | 35   | Influencia o tempo de retenção dos compostos                       | Pouco conhecimento sobre o método analítico  | Realização de estudos a diferentes pH  |
| Variação da pressão da coluna                 | 160 | 40   | Interferência com a estabilidade da linha de base                  | Fatores externos exemplo: temperatura ambiente/ erro no equipamento                            | Conhecimento do equipamento/ identificação dos fatores externos/ Monitorização da variação temperatura ambiente e da pressão da coluna |
| Incorreta escolha/ proporção do tampão        | 160 | 40   | Afeta a qualidade da resposta                                      | Pouco conhecimento   | Verificação de métodos já existentes   |
| Inadequado volume de injeção                  | 144 | 36   | Afeta a qualidade da resposta/ qualidade cromatográfica a reduzida | Pouco conhecimento   | Estudos detalhados sobre o método analíticos   |
| Inadequada identificação do pico              | 144 | 36   | Erro na identificação do composto referente ao pico                | Pouco conhecimento   | Estudos detalhados sobre o método analítico  |
| Incorreta purga da agulha                     | 140 | 35   | Bolhas de ar no interior do equipamento                            | Pouco treino do operador/ pouco conhecimento do equipamento                                    | Realização de uma purga da seringa antes de utilizar o equipamento   |

Alguns riscos identificados como inaceitáveis não foram considerados fatores de risco para posteriormente serem analisados através de *DoE*. Como este método foi desenvolvido a partir da otimização do método cromatográfico descrito na Ph. Eur. 10, alguns dos riscos deixam de ter relevância, uma vez que já tinham sido definidos *à priori*. Desta forma os riscos excluídos foram a instabilidade e a seleção do tampão, e o alto/baixo pH da fase móvel. A incorreta purga da seringa, a interferência no detetor ou a variação do sinal também foram excluídas da análise através do *DoE*. Estes riscos, embora influenciam o desenvolvimento no método analítico conseguem ser reduzido ou eliminado, através das medidas preventivas sem necessitar do *DoE*.

A proporção das soluções tampão e orgânica também foram definidas *à priori*, contudo este fator foi incluído nos fatores críticos. A inclusão deste fator baseou-se em duas razões, a primeira foi a sua classificação como risco inaceitável através da FMEA, e a segunda foi o tempo de corrida do método cromatográfico. Este método apresenta um tempo de corrida demasiado longo, 90 min, desta forma este pode ser otimizado. O tempo de corrida é influenciado pelo tempo de retenção dos componentes de interesse em análise, que são influenciados pela proporção de fase orgânica e aquosa na fase móvel. A definição errada destas proporções pode originar um modo de falha, também obtido pelo método de FMEA, designado por incorreta identificação do pico. A alteração das proporções pode levar à inversão dos picos, uma vez que há compostos que são mais sensíveis a uma quantidade de fase orgânica do que outros. A incorreta identificação do pico pode gerar análises incorretas, uma vez, que o pico cromatográfico de interesse pode não ser estudado. O volume de injeção também foi considerado como um fator de risco elevado, uma vez que influencia a qualidade cromatográfica dos picos.

#### **4.1.2. Fatores e respostas**

As duas variáveis independentes identificadas com maior influência no método analítico foram: o volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) e a proporção de ACN na fase móvel (%). No entanto, para o desenvolvimento de um método analítico com recurso ao *QbD* foi necessária uma análise destes fatores em diferentes níveis, que foram selecionados de acordo com razões distintas. Os diferentes níveis para a proporção de ACN na fase móvel (%) foram selecionados com base no tempo de retenção da fluvoxamina, do ácido maleico e em duas referências bibliográficas, nomeadamente Dawud *et al.* (2014) [91] e Elkhoudary *et al.* (2016) [92]. O tempo de retenção da fluvoxamina foi bastante influenciado pela proporção de ACN; se a proporção de ACN na mistura for superior a

50%, o tempo de retenção da fluvoxamina é o mesmo que o do ácido maleico, e consequentemente o método não é seletivo. Assim, variou-se os níveis de ACN na fase móvel entre 30 e 45%.

Os níveis selecionados para o volume de injeção foram determinados com base nas limitações do equipamento cromatográfico, e na qualidade cromatográfica do pico correspondente à fluvoxamina. O equipamento permite um volume de injeção mínimo de 5 $\mu$ L e, a partir de um volume de 20 $\mu$ L, observou-se que o pico correspondente à fluvoxamina deixava de apresentar configuração cromatográfica. Um volume de injeção superior a 20 $\mu$ L desencadeia um pico cromatográfico com um fator de simetria superior ao limite aceitável, 1,5, e um número de pratos teóricos inferior ao limite de especificação, 2000. Deste modo, os diferentes níveis selecionados variaram entre os 5 ou 20 $\mu$ L.

Contudo, para o desenvolvimento de um método analítico com recurso ao *DoE* foi também necessário determinar as respostas mais relevantes para o modelo. As respostas selecionadas foram o tempo de retenção da fluvoxamina, o fator de simetria e o número de pratos teóricos correspondentes ao pico cromatográfico da fluvoxamina.

A seleção do tempo de retenção da fluvoxamina baseou-se, primeiramente, na influência que a proporção de ACN tem nesta resposta. A matriz contém dois conservantes, o metilparabeno sódico e o propilparabeno sódico, e o primeiro apresentava um tempo de retenção próximo ao da fluvoxamina. Desta forma, o intervalo do tempo de retenção da fluvoxamina devia variar 4,5 e os 5,5 minutos, para que o método fosse seletivo em relação aos picos cromatográficos da fluvoxamina e do metilparabeno sódico.

O fator de simetria, uma das características dos picos cromatográficos, permitiu determinar a qualidade do método analítico, deste modo esta resposta foi escolhida para avaliar a qualidade dos picos cromatográficos, e consequentemente, do método analítico. Os picos cromatográficos devem apresentar uma distribuição *gaussiana* em que a simetria ideal é 1. No entanto, na realidade a maioria dos picos não apresenta uma distribuição perfeita, e por esta razão a Ph. Eur. 10 permite que o fator de simetria dos picos cromatográficos varie entre 0,8 e 1,5. Contudo, para este modelo os valores aceitáveis para o fator de simetria variaram entre 0,8 e 1,3, para aumentar a exigência da qualidade desta resposta [82].

O número de pratos teóricos permitiu determinar a eficácia da coluna cromatográfica. O valor mínimo aceitável para esta resposta foi de 2000 pratos teóricos.

Após a seleção das variáveis independentes e os respetivos níveis, e das variáveis dependentes, foi crucial selecionar o planeamento experimental apropriado para a

otimização do método analítico. A otimização, como referido no capítulo 1.1.4, permitiu a seleção das condições cromatográficas ótimas para o método.

O planeamento experimental utilizado foi o *FFD* com três pontos centrais para a análise dos dois fatores e dos seus três níveis. Este planeamento experimental foi selecionado com base no artigo *Peraman et al.* [54], uma vez que este tipo de planeamento é o mais utilizado no desenvolvimento de métodos analíticos quando se estudam três a cinco níveis por cada fator. Além disso, este método também permite identificar os efeitos significativos e as suas interações com as respostas sem interferências [25, 50].

A implementação do *FFD* fornece uma resposta linear (modelação de primeira ordem), assim devido a esta limitação adicionou-se os três pontos centrais para a obtenção do componente de erro aleatório. Este componente permite obter uma interação quadrática através da modelação de segunda ordem [43].

#### **4.1.3. Análise do planeamento experimental**

Posteriormente à análise de risco, e conseqüentemente, à seleção das variáveis dependentes e independentes e ao tipo de planeamento experimental, foi necessário analisar as relações entre cada um dos níveis das variáveis independentes e das respostas. O planeamento experimental foi constituído por 12 experiências, das quais 9 corresponderam ao *FFD* e 3 aos pontos centrais, como descrito na Tabela 13.

**Tabela 13** - Resultados das respostas obtidos através da análise do planeamento experimental.

| Experiência | Níveis dos Fatores                             |                        | Respostas         |                         |                 |
|-------------|--|------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------|
|             | Concentração de acetonitrilo da fase móvel (%) | Volume de injeção (µL) | Fator de simetria | Tempo de retenção (min) | Pratos teóricos |
| 1           | -1   | -1                     | 1,24              | 21,987                  | 7467            |
| 2           | 0  | -1                     | 1,24              | 6,779                   | 5709            |
| 3           | 1  | -1                     | 1,24              | 3,479                   | 4652            |
| 4           | -1   | 0                      | 1,54              | 21,669                  | 6476            |
| 5           | 0  | 0                      | 1,37              | 6,732                   | 5045            |
| 6           | 1  | 0                      | 1,26              | 3,485                   | 4500            |
| 7           | -1   | 1                      | 1,84              | 21,295                  | 5520            |
| 8           | 0  | 1                      | 1,47              | 6,703                   | 4474            |
| 9           | 1  | 1                      | 1,28              | 3,486                   | 4405            |
| 10          | 0  | 0                      | 1,37              | 6,745                   | 5015            |
| 11          | 0  | 0                      | 1,37              | 6,749                   | 5000            |
| 12          | 0  | 0                      | 1,37              | 6,735                   | 5067            |

*Em que as experiências 10, 11 e 12 correspondem aos pontos centrais.*

As interações obtidas foram analisadas com recurso à modelação de regressão linear múltipla. Este tipo de modelação avaliou os parâmetros de ajuste do modelo, de modo a compreender se o modelo de cada uma das respostas estava ajustado adequadamente. Os parâmetros de ajuste estudados foram o coeficiente de regressão ( $R^2$ ), o coeficiente preditivo ( $Q^2$ ), a validade e a reprodutibilidade do modelo. O coeficiente de regressão determina o ajuste do modelo, e o seu valor deve ser superior a 0,5 para que o modelo seja considerado significativo. O coeficiente preditivo demonstra a capacidade de previsão do modelo, e o seu valor deve ser superior a 0,1 para um modelo significativo e superior a 0,5 para um bom modelo. A validade indica a existência de eventuais problemas no modelo, assim valores baixos podiam demonstrar problemas significativos, como a presença de *outliers* ou transformações incorretas. Todavia, um valor baixo na validade do modelo pode não indicar um eventual erro, mas apenas indicar que o modelo apresenta um erro puro mínimo, porque os replicados são quase idênticos. Um erro puro mínimo significa que o modelo é significativo e completo. A variabilidade dos replicados,

os três pontos centrais, é determinada pela reprodutibilidade. O seu valor tem que ser superior a 0,5 para que o modelo seja considerado reprodutível [93].

Quando os parâmetros não apresentam valores acima do limite de aceitação é importante fazer ajustes ao modelo. Os ajustes mais aplicados consistem na alteração da transformação matemática e na remoção de *outliers*.

No caso dos modelos em estudo apenas se alterou a transformação matemática, uma vez que a eliminação de possíveis *outliers* aumenta a probabilidade de erro em planeamentos experimentais com um número reduzido de experiências. As alterações efetuadas permitiram melhorar os valores dos parâmetros de ajuste, de forma obter valores superiores ao limite de aceitação para um modelo significativo, como descrito na Tabela 14.

**Tabela 14** - Parâmetros de ajuste obtidos para cada um dos modelos das respostas.

| <b>Resposta</b>   | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>R<sup>2</sup> ajustado</b> | <b>Q<sup>2</sup></b> | <b>Validade do modelo</b> | <b>Reprodutibilidade</b> |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| Fator de simetria | 0,992                | 0,988                         | 0,956                | -*                        | 1                        |
| Tempo de retenção | 0,999                | 0,998                         | 0,999                | 0,820                     | 0,999                    |
| Pratos teóricos   | 0,999                | 0,999                         | 0,992                | 0,614                     | 0,999                    |

*Em que: \* corresponde ao parâmetro não detetado; R<sup>2</sup> - coeficiente de regressão; Q<sup>2</sup> - coeficiente preditivo.*

De acordo com os resultados obtidos, o coeficiente de regressão e o preditivo ajustados apresentaram valores bastante próximos do valor ótimo, o que significa que o ajuste efetuado foi adequado para o modelo. Em relação à validade do modelo correspondente ao fator de simetria, esta não foi calculada porque o valor dos replicados era quase idêntico, logo o erro puro não foi estimado. No entanto, os valores deste parâmetro de ajuste para os outros dois modelos foram superiores ao limite de especificação. Relativamente à reprodutibilidade, obtiveram-se valores bastante próximos do valor ideal para todos os modelos.

Assim, a análise conjunta de todos os parâmetros de ajuste demonstrou que os modelos que descrevem as interações entre os níveis de cada fator e as respostas, eram significativos, válidos e reprodutíveis. Todavia, para os modelos serem considerados robustos foi necessário avaliar a capacidade de previsão dos mesmos, ou seja, a relação

entre os valores experimentais e os previstos. Os resultados dos valores experimentais e previstos obtidos para cada uma das respostas estão representados na Tabela 15.

**Tabela 15** - Resultados obtidos correspondentes aos valores experimentais e aos previstos e o quociente entre ambas.

|    | Fator de simetria |      |         | Tempo de retenção |      |         | Pratos teóricos |         |         |
|----|-------------------|------|---------|-------------------|------|---------|-----------------|---------|---------|
|    | Obs               | Pre  | Obs-Pre | Obs               | Pre  | Obs-Pre | Obs             | Pre     | Obs-Pre |
| 1  | 0,09              | 0,10 | -0,01   | 1,34              | 1,34 | 0,00    | 7467            | 7497,96 | -30,96  |
| 2  | 0,09              | 0,09 | 0,00    | 0,83              | 0,83 | 0,00    | 5709            | 5650,75 | 58,25   |
| 3  | 0,09              | 0,10 | -0,01   | 0,54              | 0,54 | 0,00    | 4652            | 4679,29 | -27,29  |
| 4  | 0,19              | 0,18 | 0,01    | 1,34              | 1,34 | 0,00    | 6476            | 6460,08 | 15,92   |
| 5  | 0,15              | 0,14 | 0,01    | 0,83              | 0,83 | 0,00    | 5045            | 5037,87 | 7,13    |
| 6  | 0,10              | 0,10 | 0,00    | 0,54              | 0,54 | 0,00    | 4500            | 4491,42 | 8,58    |
| 7  | 0,27              | 0,27 | 0,00    | 1,33              | 1,33 | 0,00    | 5520            | 5504,96 | 15,04   |
| 8  | 0,17              | 0,19 | -0,02   | 0,83              | 0,83 | 0,00    | 4474            | 4507,75 | -33,75  |
| 9  | 0,11              | 0,10 | 0,01    | 0,54              | 0,54 | 0,00    | 4405            | 4386,29 | 18,71   |
| 10 | 0,14              | 0,14 | 0,00    | 0,83              | 0,83 | 0,00    | 5015            | 5037,87 | -22,87  |
| 11 | 0,14              | 0,14 | 0,00    | 0,83              | 0,83 | 0,00    | 5000            | 5037,87 | -37,87  |
| 12 | 0,14              | 0,14 | 0,00    | 0,83              | 0,83 | 0,00    | 5067            | 5037,87 | 29,13   |

*Em que Obs significa valores observados, Pre – valores previstos e Obs-Pre – a diferença entre os valores observados e previstos.*

Posteriormente, as três variáveis dependentes de cada modelo foram analisadas estatisticamente através da análise de variância simples, a ANOVA. A variabilidade estatística foi estudada com recurso a dois métodos diferentes, nomeadamente a probabilidade de significância para a falta de ajuste (*p-value of lack-of-fit*) e a probabilidade de significância da regressão linear (*p-value of regression*), num intervalo de confiança de 95% [43, 87, 88].

A probabilidade de significância para a falta de ajuste permite comparar o componente de erro do modelo (*lack-of-fit*) com a componente de erro puro, indicando se o modelo necessita de ser ajustado. Assim, se o seu valor for superior a 0,05, significa que modelo representa adequadamente os seus resultados, e consequentemente não necessita de ser ajustado. A probabilidade de significância da regressão linear avalia, se

a relação entre as variáveis independentes e dependentes descreve uma regressão linear. O valor correspondente a este parâmetro não deve ser superior a 0,05, de modo a verificar-se que a interação entre as variáveis é descrita por uma regressão linear [43, 87, 88].

Em relação à probabilidade de significância da regressão correspondente ao fator de simetria, ao tempo de retenção e pratos teóricos, os valores obtidos foram  $1,91 \times 10^{-7}$ ,  $5,40 \times 10^{-20}$  e  $8,62 \times 10^{-9}$ , respetivamente, como mostra na Tabela 16. Os resultados obtidos foram todos inferiores ao *cutoff* de 0,05, deste modo a probabilidade de regressão foi significativa a 95%. Assim, os modelos foram significativos e a interação entre as variáveis podia ser descrita através de uma regressão linear.

**Tabela 16** - Resultados estatísticos obtidos, com recurso à ANOVA, para cada um dos modelos.

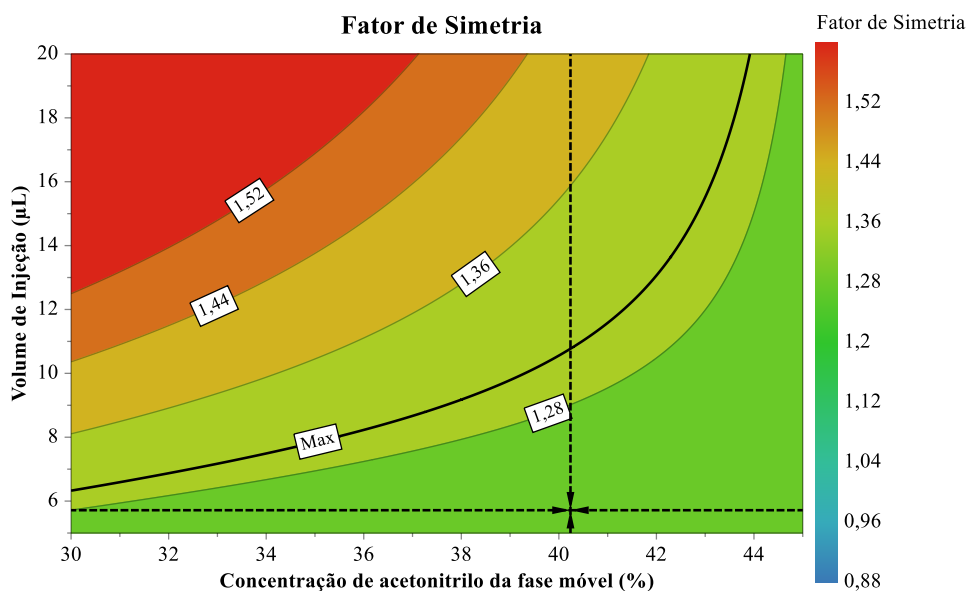
| <b>Fator de simetria</b>              | <b>GL</b> | <b>SQ</b>             | <b>Variância da MQ</b> | <b>F</b>           | <b>P</b>                                 | <b>DP</b>             |
|---------------------------------------|-----------|-----------------------|------------------------|--------------------|--|-----------------------|
| Total corrigido                       | 11        | $2,78 \times 10^{-2}$ | $2,52 \times 10^{-3}$  |                    |  | $5,02 \times 10^{-2}$ |
| Regressão                             | 4         | $2,75 \times 10^{-2}$ | $6,88 \times 10^{-3}$  | $2,22 \times 10^2$ | <b><math>1,91 \times 10^{-7}</math></b>  | $8,29 \times 10^{-2}$ |
| Resíduo                               | 7         | $2,17 \times 10^{-4}$ | $3,11 \times 10^{-5}$  |                    |  | $5,57 \times 10^{-3}$ |
| Erro do modelo ( <i>Lack of Fit</i> ) | 4         | $2,17 \times 10^{-4}$ | $5,43 \times 10^{-5}$  | -*                 | -*                                       | $7,37 \times 10^{-3}$ |
| Erro puro                             | 3         | 0*                    | 0*                     |                    |  | -*                    |
| <b>Tempo de retenção</b>              | <b>GL</b> | <b>SQ</b>             | <b>Variância da MQ</b> | <b>F</b>           | <b>P</b>                                 | <b>DP</b>             |
| Total corrigido                       | 11        | $9,81 \times 10^{-1}$ | $8,92 \times 10^{-2}$  |                    |  | $2,99 \times 10^{-1}$ |
| Regressão                             | 4         | $9,81 \times 10^{-1}$ | $2,45 \times 10^{-1}$  | $8,60 \times 10^5$ | <b><math>5,40 \times 10^{-20}</math></b> | $4,95 \times 10^{-1}$ |
| Resíduo                               | 7         | $1,99 \times 10^{-6}$ | $2,85 \times 10^{-7}$  |                    |  | $5,34 \times 10^{-4}$ |
| Erro do modelo ( <i>Lack of Fit</i> ) | 4         | $1,19 \times 10^{-6}$ | $2,97 \times 10^{-7}$  | 1,10               | <b><math>4,88 \times 10^{-1}</math></b>  | $5,45 \times 10^{-4}$ |
| Erro puro                             | 3         | $8,09 \times 10^{-7}$ | $2,70 \times 10^{-7}$  |                    |  | $5,19 \times 10^{-4}$ |
| <b>Pratos teóricos</b>                | <b>GL</b> | <b>SQ</b>             | <b>Variância da MQ</b> | <b>F</b>           | <b>P</b>                                 | <b>DP</b>             |
| Total corrigido                       | 11        | $9,12 \times 10^6$    | $8,29 \times 10^5$     |                    |  | $9,11 \times 10^2$    |
| Regressão                             | 4         | $9,11 \times 10^6$    | $1,82 \times 10^6$     | $1,09 \times 10^3$ | <b><math>8,62 \times 10^{-9}</math></b>  | $1,35 \times 10^3$    |
| Resíduo                               | 7         | $10,00 \times 10^3$   | $1,67 \times 10^3$     |                    |  | $4,08 \times 10^1$    |
| Erro do modelo ( <i>Lack of Fit</i> ) | 4         | $7,29 \times 10^3$    | $2,43 \times 10^3$     | 2,69               | <b><math>2,19 \times 10^{-1}</math></b>  | $4,93 \times 10^1$    |
| Erro puro                             | 3         | $2,71 \times 10^3$    | $9,02 \times 10^2$     |                    |  | $3,00 \times 10^1$    |

Em que GL significa graus de liberdade, SQ – soma dos quadrados, MQ – média dos quadrados; F - Teste de Snedecor/Fisher, P - Probabilidade de significância, DP – desvio padrão e o símbolo \* - parâmetro não calculado.

Relativamente ao valor da probabilidade de significância para a falta de ajustamento, esta não foi estimada para o fator de simetria porque o erro puro também não foi calculado, devido à semelhança do valor dos pontos centrais. Os valores de probabilidade de significância para a falta de ajustamento correspondentes ao tempo de retenção e aos pratos teóricos foram  $4,88 \times 10^{-1}$  e  $2,19 \times 10^{-1}$ , respetivamente, como representado na Tabela 16. Como estes valores não foram inferiores a 0,05, a probabilidade de significância para a falta de ajustamento não foi significativa para o intervalo de confiança de 95%, logo estes modelos não requeriam um ajuste.

A análise estatística permitiu compreender a significância dos modelos e a sua robustez para seguidamente otimizar os resultados, de modo a identificar as condições cromatográficas ótimas para este método analítico. A otimização visa à determinação do *setpoint* e do *design space* das condições cromatográficas, neste caso a proporção de ACN na fase móvel (%) e o volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ).

Em relação ao fator de simetria, os resultados obtidos mostram que esta resposta dependeu do volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) e da combinação do volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) e da proporção de ACN na fase móvel, embora o volume de injeção tivesse uma influência maior, como se pode observar na Figura 15.

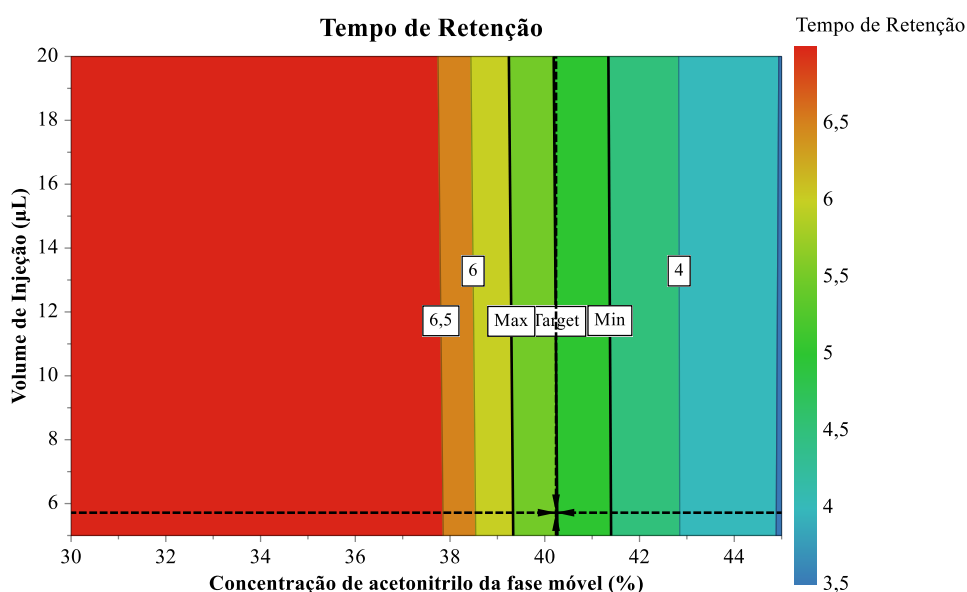


**Figura 15** - Gráfico de contorno da resposta correspondente ao fator de simetria.

O fator de simetria foi influenciado pelo aumento do volume de injeção, ou seja, quando se aumenta o volume de injeção, aumenta o fator de simetria. Contudo, se o aumento de volume de injeção induzir um fator de simetria superior a 1,3, este ficará fora

de especificação. Em relação à influência da proporção de ACN nesta resposta verificou-se que este fator não influenciou as respostas, uma vez que, o fator de simetria ótimo pode ser obtido em qualquer proporção entre os 30% e os 45%. No entanto, a combinação dos dois fatores interferiu com a qualidade da resposta, dado que se a proporção de ACN for 30%, o volume ideal de injeção varia entre 5 e 6  $\mu\text{L}$ . Todavia, se a proporção de ACN for 45%, o volume de injeção ótimo varia entre 5 e 20  $\mu\text{L}$ . Assim, foi possível verificar que o intervalo de volume de injeção podia aumentar com o aumento da fração de ACN.

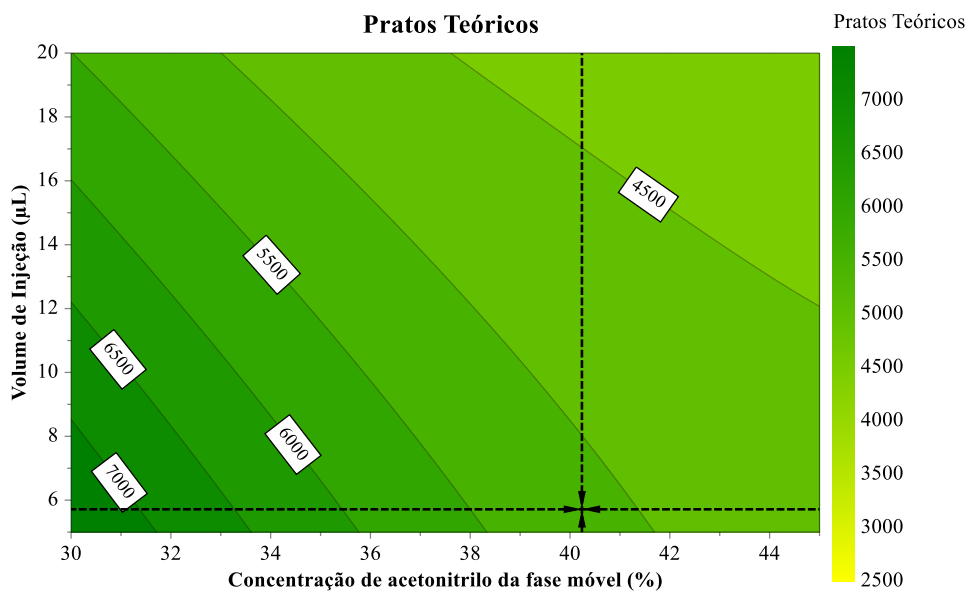
Relativamente ao tempo de retenção, os resultados obtidos demonstram que esta resposta dependeu, unicamente, da proporção de ACN na fase móvel, sendo independente do volume de injeção, como demonstra a Figura 16.



**Figura 16** - Gráfico de contorno da resposta correspondente ao tempo de retenção.

Deste modo, as variações na fração de ACN podiam provocar alterações significativas na resposta, assim esta proporção apenas pode variar entre os 39,50% e os 40,25%, aproximadamente.

Em relação aos pratos teóricos, esta resposta dependeu dos dois fatores estudados. O valor mais elevado foi gerado quando a proporção de ACN variou entre os 30 e 31,5%. Todavia, para uma fração de ACN de 30% o volume de injeção possível varia entre 5 e 8,5  $\mu\text{L}$ , enquanto que para a concentração de 31,5% a gama para o volume de injeção é mais limitada, entre os 5 e 6  $\mu\text{L}$ , como mostra na Figura 17. Contudo, neste caso específico nenhuma combinação entre os fatores provocou uma resposta inferior ao limite específico de 2000 pratos teóricos.

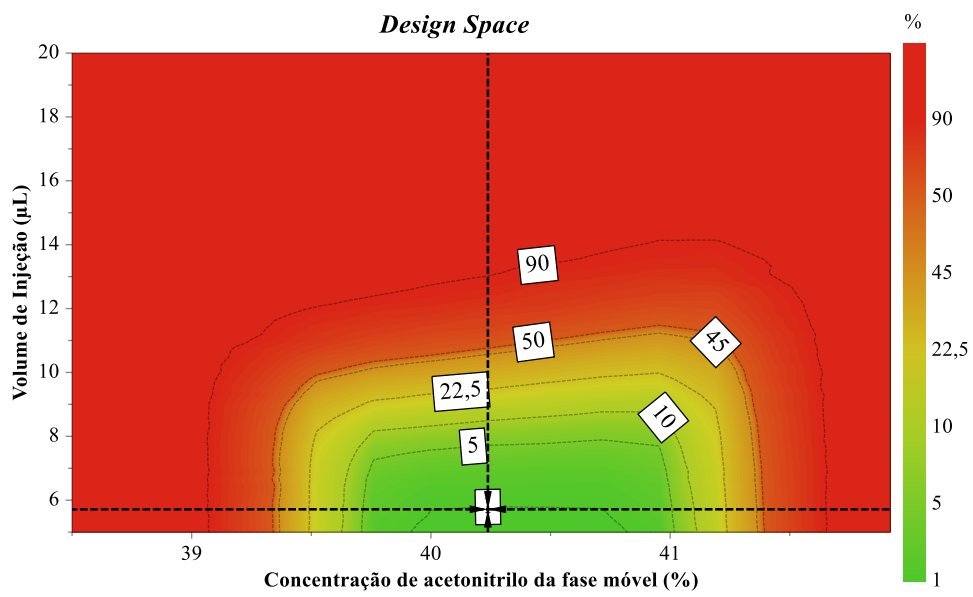


**Figura 17** - Gráfico de contorno da resposta correspondente aos pratos teóricos.

Com recurso a estas análises foi possível determinar o *setpoint*, ou seja, as condições cromatográficas ótimas, que corresponderam a uma proporção de ACN na fase móvel de 40% e a um volume de injeção de 6µL (Figura 18).

Adicionalmente, também foi necessário estudar e avaliar a probabilidade de erro quando ocorrem variações na proporção de ACN e o volume de injeção. Este estudo constatou que as variações dos fatores não deviam ultrapassar uma probabilidade de erro de 5%, como mostra na Figura 18. Desta forma, a concentração de ACN apenas pode variar entre os 39,7 e os 41,0% e o volume de injeção entre os 5 e 8 µL.

Se houver desvios a estes intervalos de condições cromatográficas, a probabilidade de falha aumenta e provoca alterações significativas no modelo, o que dificulta a implementação do método analítico desenvolvido.



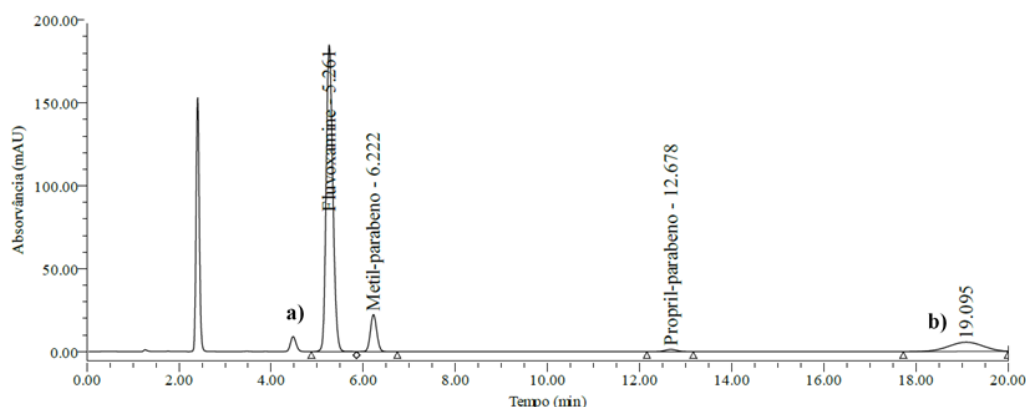
**Figura 18** - *Design Space* correspondente às condições cromatográficas ótimas.

## 4.2. Estudos de estabilidade – aplicação do método analítico desenvolvido

### 4.2.1. Ensaio de degradação forçada

Os ensaios de degradação forçada permitem detetar eventuais produtos de degradação e compreender a degradação da fluvoxamina em condições de stress. A identificação deste tipo de produtos permite avaliar a sua possível interferência na deteção e quantificação da SA e dos conservantes. Nos ensaios de degradação forçada foram analisadas três amostras distintas, nomeadamente uma solução com a SA, uma solução com placebo e uma solução com a formulação semi-sólida com fluvoxamina.

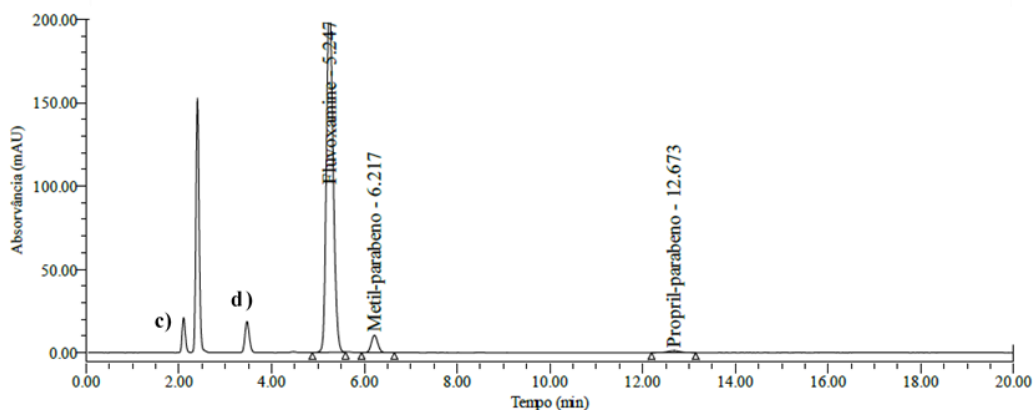
Neste estudo foram aplicadas quatro condições de stress: hidrolíticas, térmicas, fotolítica e oxidativas. As condições de stress hidrolítico foram obtidas por exposição das diferentes soluções a meios ácidos ou básicos. Em meio ácido, observou-se a formação de dois produtos de degradação, produto de degradação I e II, nas duas soluções contendo fluvoxamina. Os tempos de retenção relativos (TRR) em relação à fluvoxamina (TR = 5,26 min) obtidos para os produtos de degradação I e II foram de 0,85 e 7,45, respetivamente. Contudo, como o tempo de corrida para o doseamento da SA é de 20 min, o produto de degradação II só surge na corrida seguinte aos 19,10min, como se observa na Figura 19 e Figura L (em anexo).



**Figura 19** - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados em meio ácido, onde a) representa o produto de degradação I e b) representa o produto de degradação II.

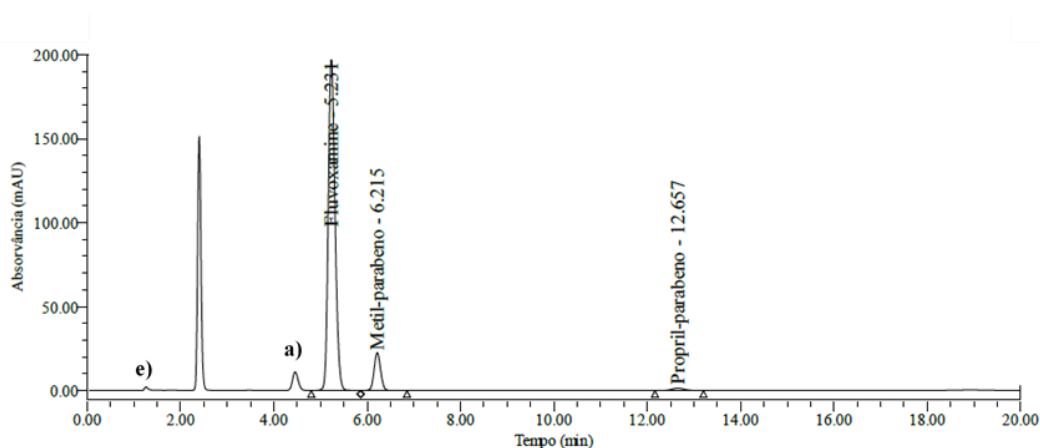
Nas condições em meio básico também se verificou o aparecimento de dois produtos de degradação, diferentes dos formados em meio ácido, denominados produtos de degradação III e IV. Estes dois produtos surgiram na solução de placebo e na solução com a formulação, no entanto, na solução com SA apenas se observou a presença do produto

de degradação III (Figura M em anexo). Deste modo, o produto de degradação IV pôde resultar da degradação de algum excipiente presente na formulação semi-sólida e no placebo. Os produtos de degradação III e IV apresentaram TRR de 0,40 e 0,66, respectivamente (Figura 20).



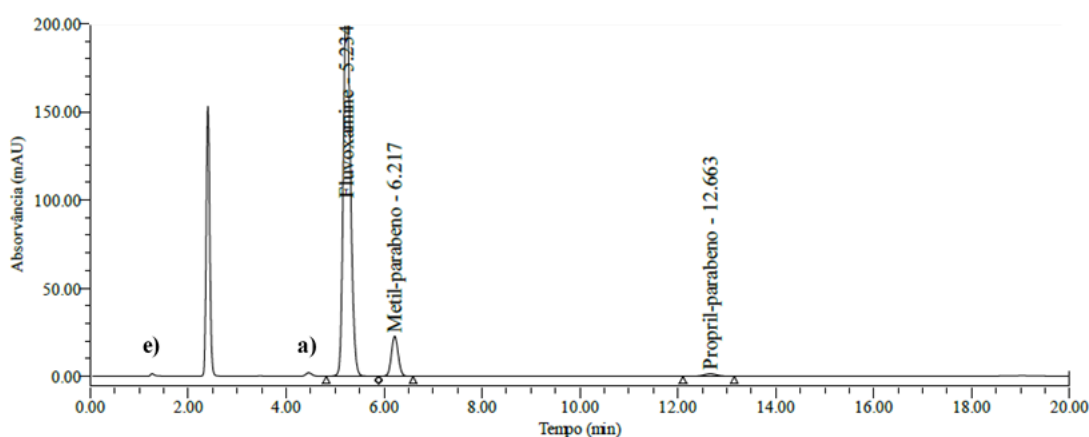
**Figura 20** - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados em meio básico, onde c) representa o produto de degradação III e d) representa o produto de degradação IV.

A exposição das diferentes soluções com a SA a condições térmicas extremas levou à formação de um produto de degradação, o produto de degradação I também detetado na exposição ao meio ácido (Figura N em anexo). Nestas condições, observou-se também a formação de outro produto de degradação, designado por produto de degradação V, com um TRR de 0,24 na solução com a formulação (Figura 21). Na solução placebo não se observou a formação de qualquer um dos produtos de degradação (Figura N em anexo).



**Figura 21** - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados por exposição à temperatura, onde a) representa o produto de degradação I, e e) representa o produto de degradação V.

Em relação à exposição fotolítica, também foi possível detetar os produtos de degradação I e V apenas na solução composta pela formulação semi-sólida (Figura 22). Contudo, a área do pico correspondente a este produto de degradação I, foi menor em relação à detetada nas outras condições de stress. Nas outras soluções não se verificou a existência de nenhum produto de degradação (Figura O em anexo).



**Figura 22** - Cromatograma da solução da formulação semi-sólida e dos produtos de degradação formados por exposição à luz UV, onde a) representa o produto de degradação I, e e) representa o produto de degradação V.

Relativamente à exposição das soluções a condições oxidativas, nenhum produto de degradação foi detetado através do método de doseamento da fluvoxamina.

A Tabela 17 representa os resultados dos ensaios de degradação para as soluções com a SA e com a formulação semi-sólida.

**Tabela 17** - Teor (%) de fluvoxamina obtido após exposição de soluções a diferentes condições de stress.

| Condições de stress | Teor de fluvoxamina após ensaios degradação (%) |                                   |
|---------------------|---|-----------------------------------|
|                     | Solução com substância ativa                    | Solução da formulação semi-sólida |
| Meio ácido          | 87,99   | 90,36                             |
| Meio básico         | 100,01  | 103,71                            |
| Meio oxidante       | 99,80   | 103,55                            |
| Temperatura 55°C    | 93,34   | 96,99                             |
| Luz UV              | 99,57   | 104,10                            |

Nestes estudos de degradação foi possível verificar que o teor de fluvoxamina degradada nas soluções com SA e amostra não excedeu os 12% e 10%, respectivamente. Constatou-se ainda que a fluvoxamina é mais sensível as condições ácidas e a temperaturas elevadas, enquanto que às restantes condições de stress não apresentaram degradação significativa.

Hemke *et al.* (2015) [96] realizou ensaios de degradação forçada da fluvoxamina (TR = 5,939min) presente em comprimidos, em solução e em estado sólido. A exposição das soluções com SA e formulação ao meio oxidativo levou à formação de um produto de degradação com um TRR de 0,86, relativamente próximo ao do produto de degradação I observado neste trabalho, Tabela 18. No meio ácido também se formou um produto de degradação com TRR, 0,86, próximo ao do produto de degradação I, Tabela 18. Tendo em conta os TRR do produto de degradação I e o de referência, é possível que estes sejam o mesmo. Contudo, no estudo de referência o produto resultou da combinação do meio ácido e do meio oxidativo com a temperatura, enquanto o produto de degradação I resultou da exposição ao meio ácido e à temperatura, isoladamente. Considerando que o produto de degradação I foi formado em condições ácidas e térmicas, foi normal o seu aparecimento num meio oxidativo combinado com temperatura, Tabela 18.

Relativamente à degradação da fluvoxamina, foi possível verificar que no artigo de referência, Hemke *et al.* (2015), o teor de degradação da fluvoxamina foi superior ao obtido neste estudo de degradação, Tabela 18. Algumas diferenças entre os estudos que podem justificar estas diferenças no teor fluvoxamina após stress são: (i) o tipo de formulação estudada; (ii) as condições de stress aplicadas e (iii) a durabilidade dos estudos. Hemke *et al.* (2015) avaliou uma formulação sólida e combinou as condições de stress hidrolíticas com as térmicas. A durabilidade do estudo de referência foi de 90min.

De acordo com Hemke *et al.* (2015), os teores de fluvoxamina após os ensaios de degradação em meio ácido a 80°C foram inferiores aos obtidos em meio básico e oxidativo. Deste modo, foi possível verificar que a fluvoxamina foi mais suscetível à exposição de meio ácido que nos outros meios. Comparando os resultados de Hemke *et al.* (2015) com os obtidos neste trabalho, foi possível concluir que os teores de degradação de Hemke *et al.* (2015), são superiores. Estes teores de degradação superiores podem estar relacionados com a exposição simultânea aos meios hidrolíticos e oxidativos com a temperatura.

**Tabela 18** - Resumo dos resultados obtidos na bibliografia de referência.

|                           |  |   | Ácido          | Oxidativo      | Básico         | Fotolítico |
|---------------------------|--|---|----------------|----------------|----------------|------------|
| <b>Hemke et al (2015)</b> | TRR dos produtos de degradação           | Solução com SA<br>Solução com formulação sólida | 0,86           | 0,86           | NA             | NA         |
|                           | Teor de FLU após condições de stress (%) | Solução com SA<br>Solução com formulação sólida | 76,77<br>55,21 | 86,75<br>80,25 | 88,97<br>84,25 | NA<br>NA   |
| <b>Souri et al (2015)</b> | TRR dos produtos de degradação           | Solução com SA                                  | 0,42           | NA             | NA             | NA         |
|                           |  | Sólido  | NA             | 0,86           | NA             | NA         |
|                           | Teor de FLU após condições de stress (%) | Solução com SA                                  | 37,50          | 74,30          | 55,40          | 73,10      |
|                           |  | Sólido  | NA             | NA             | NA             | 73,10      |

Em que NA significa não aplicado, TRR – tempo de retenção relativo, e FLU – fluvoxamina.

Um outro estudo realizado por Souri *et al.* (2015) [81], reportou ensaios de degradação forçada em soluções derivadas de formulações sólidas comercializadas. Os resultados obtidos neste artigo mostraram que a exposição da solução de fluvoxamina ao meio ácido e alcalino originou um produto de degradação com o TRR de 0,42, semelhante ao TRR do produto de degradação III, 0,40, obtido neste trabalho, Tabela 18. Por outro lado, a exposição de fluvoxamina em meio sólido ou em solução à luz UV levou à formação de um produto de degradação com um TRR de 0,86, relativamente próximo do produto de degradação I, 0,85, Tabela 18. Após exposição ao meio ácido, as soluções preparadas com solvente ácido, básico e oxidativo apresentaram um teor de fluvoxamina de 37,5%, 55,4% e 74,3%, respectivamente. Relativamente à exposição da solução e do sólido à luz UV, o teor de fluvoxamina foi de 27,1 e 73,1%, respectivamente, Tabela 18. No estudo de Souri *et al.* (2015) também se verificou que a fluvoxamina é mais suscetível ao meio ácido. Os teores de fluvoxamina obtidos no estudo relatado por Souri *et al.* são inferiores aos obtidos neste trabalho, contudo no caso de referência as condições hidrolíticas e oxidativas foram combinadas com a temperatura.

### 4.3. Validação do método analítico por HPLC

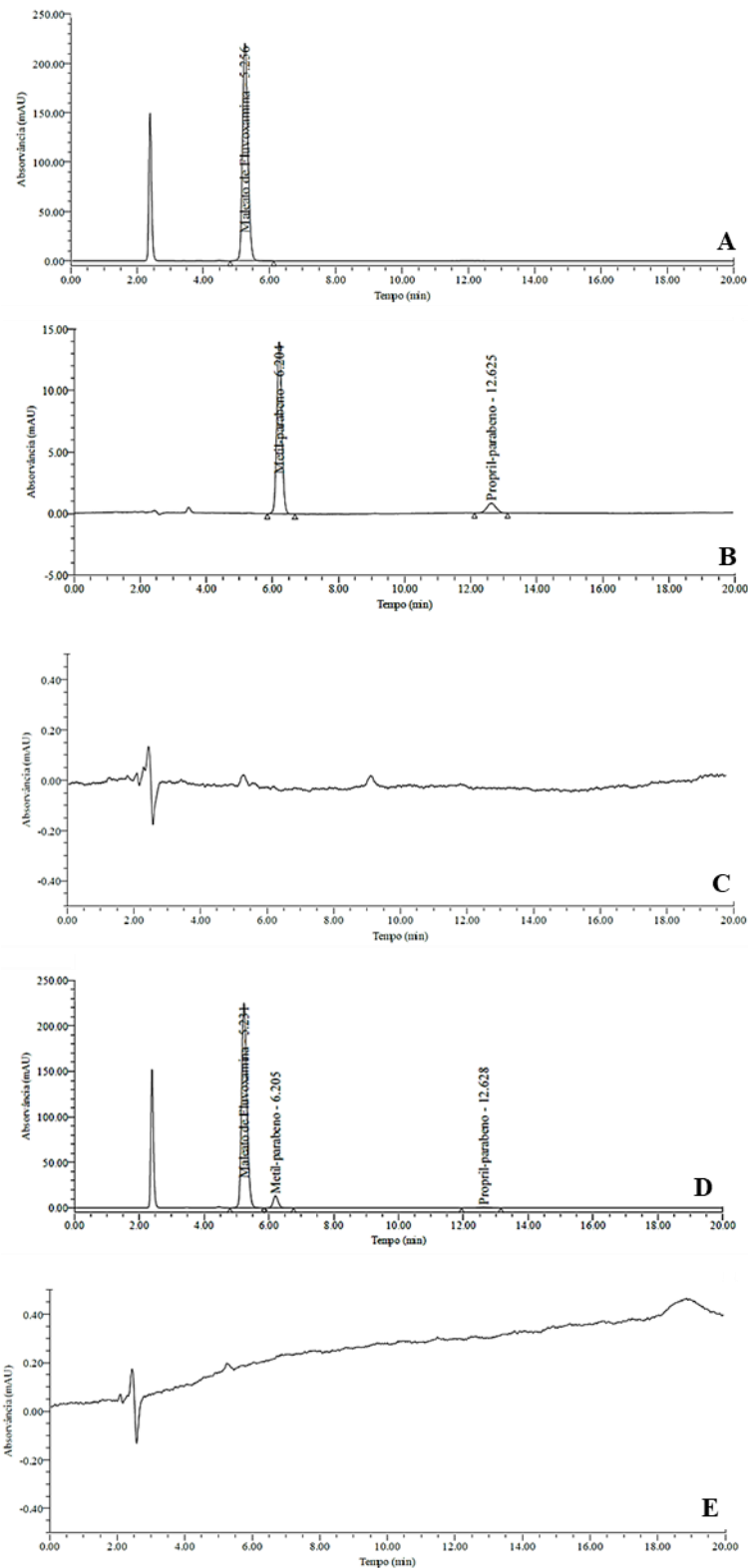
A validação de um método analítico caracteriza-se por um procedimento que permite demonstrar que um determinado método é apropriado e produz resultados com um nível de precisão e exatidão aceitável de acordo com a sua finalidade. Os parâmetros de validação obrigatórios utilizados para a validação do método de doseamento da fluvoxamina foram a seletividade, a gama de trabalho, a linearidade, a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), a exatidão e a robustez [41].

#### 4.3.1. Seletividade

A seletividade deste método analítico foi determinada através da comparação dos cromatogramas obtidos pela análise de uma solução padrão (Figura 23-A), de placebo com conservantes (Figura 23-B), de placebo sem conservantes (Figura 23-C), de uma formulação com fluvoxamina (Figura 23-D), e de solvente (Figura 22-E). Os cromatogramas obtidos mostraram que os picos relativos a cada um dos compostos eram seletivos, ou seja, não havia interferência entre os picos. A Tabela 19 demonstra o TR de cada um dos constituintes analisados e a resolução entre eles.

**Tabela 19** - Resumo dos tempos de retenção correspondentes a cada um dos constituintes, do TRR em relação à SA e fator de resolução entre os compostos.

| Soluções   |                 | Tempo de Retenção (min) | Tempo de Retenção relativo em relação à fluvoxamina | Fator de resolução |
|--|-----------------|-------------------------|---|--------------------|
| Solvente/ Fase Movel                             |                 | -                       | -   | -                  |
| Placebo  | Metilparabeno   | 6,20                    | -   | -                  |
|  | Proprilparabeno | 12,3                    | -   | 16,13              |
| Solução padrão de fluvoxamina (400µg/mL)         |                 | 2,60                    | 0,49  | -                  |
|  |                 | 5,26                    | -   | -                  |
| Solução com formulação de fluvoxamina (400µg/mL) |                 | 2,58                    | 0,49  | -                  |
|  |                 | 5,23                    | -   | -                  |
|  |                 | 6,21                    | 1,19  | 3,37               |
|  |                 | 12,63                   | 2,41  | 16,12              |



**Figura 23** - A: Cromatograma da solução padrão com fluvoxamina. B: Cromatograma da solução de placebo com conservantes; C: Cromatograma da solução de placebo sem conservantes; D: Cromatograma da solução da matriz com fluvoxamina; E: Cromatograma do solvente. Todos os cromatogramas foram obtidos pelo método de doseamento da fluvoxamina.

### 4.3.2. Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da aplicação dos testes estatísticos, o coeficiente de correlação da curva de calibração, teste de Mandel, teste de Rikilit e análise de resíduos. A linearidade permite avaliar se a concentração de trabalho selecionada é adequada ao método, e se a resposta do equipamento é proporcional à concentração de SA em toda a gama de trabalho. Neste caso, a concentração de trabalho escolhida foi 400 µg/mL.

A curva de calibração foi desenvolvida para uma gama de concentrações com cinco níveis entre 200-600 µg/ml. A regressão da curva foi determinada através de um gráfico de área dos picos (no cromatograma) correspondentes às diferentes concentrações *versus* respectivas concentrações (µg/ml). Por regressão linear, ajustou-se uma reta aos valores experimentais e determinou-se a equação da mesma, assim como o valor do coeficiente de regressão ( $R^2 = 0,999$ ) (Tabela 20). O valor de  $R^2$  situou-se entre os limites de especificação, 0,985 e 1,00. O coeficiente de variação calculado foi de 0,2%, um valor considerado aceitável, uma vez que é menor que o limite de especificação, 2%.

**Tabela 20** - Parâmetros obtidos para a curva de calibração para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Parâmetros                                   |                           |
|--|---------------------------|
| Gama de concentrações (µg/mL)                | 200-600                   |
| Equação da reta                              | $y = 5171,91 x + 1844,37$ |
| Coeficiente de regressão ( $R^2$ )           | 0,999                     |
| Coeficiente de variação de concentrações (%) | 0,2                       |

A obtenção da curva de calibração permitiu verificar que o método analítico desenvolvido para a quantificação de fluvoxamina era possivelmente linear, uma vez que todos os valores determinando estão entre os limites de especificação. Contudo, para determinar de forma robusta o seu tipo de linearidade recorreu-se a outros testes, nomeadamente os testes recomendados pela ISO 8466 – 1: teste de Mandel, a análise de resíduos e o teste de Rikilit.

O teste de Mandel possibilita a compreensão do ajuste mais apropriado aos resultados. Este tipo de teste implica a comparação do valor de teste *VT* com o valor do teste *F* de *Fischer-Snedecor* (*F*) para (N-3) graus de liberdade. O cálculo do valor de teste *VT* implica a determinação do desvio-padrão residual da curva de calibração linear e não

linear, do número de graus de liberdade, e consequentemente da diferença entre as variâncias ( $DS^2$ ), como descrito na Tabela 21.

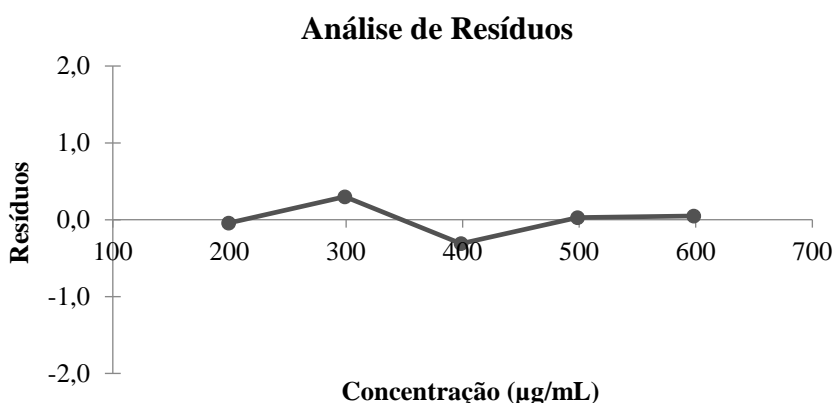
**Tabela 21** - Parâmetros de linearidade obtidos através do teste de Mandel e da análise de resíduos para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Parâmetros de linearidade                             |              |
|---|--------------|
| <b>Teste de Mandel</b>                                |              |
| $S_{(y/x)}$   | 4 679,68     |
| $S_{(y/x)}^2$   | 5 429,47     |
| $DS^2$  | 6 739 943,26 |
| $VT$  | 0,23         |
| Valor do teste $F$ de <i>Fischer-Snedecor</i> ( $F$ ) | 10,13        |

Em que  $S(y/x)$  significa desvio padrão residual do ajuste polinomial de 1º grau,  $S(y/x)^2$  - Desvio padrão residual do ajuste polinomial de 2º grau,  $SD^2$  – diferença de variâncias,  $VT$  – valor de teste.

Tendo em conta os valores obtidos, observou-se que o valor de  $VT$  foi inferior ao valor do teste  $F$  de *Fischer-Snedecor* ( $F$ ), logo segundo o teste de Mandel os resultados apresentaram um ajuste mais apropriado à curva de calibração linear.

O teste de Mandel deve ser complementado pela análise de resíduos, que determina a relação entre o valor medido e o valor estimado pela curva de calibração. O valor dos resíduos em cada ponto da curva deve apresentar um desvio entre -2 e 2%. Os resultados obtidos, na Figura 24, estavam de acordo com a especificação.



**Figura 24** - Representação gráfica da análise de resíduos em função da concentração (µg/mL) de fluvoxamina.

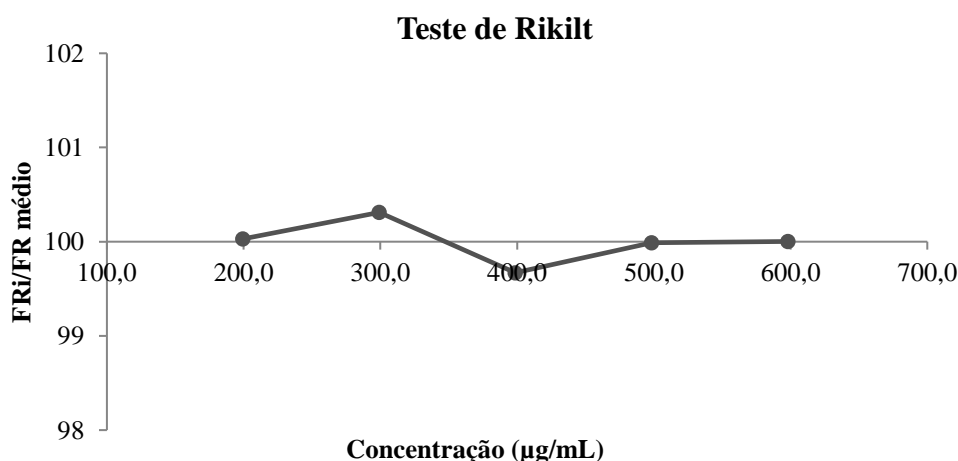
Por fim, foi realizado o teste de Rikilt, que analisou cada um dos pontos da curva de calibração através do fator de respostas. A Tabela 22 descreve a linearidade para cada um dos pontos da curva de calibração.

**Tabela 22** - Resultados obtidos através da implementação do teste de Rikilt para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Concentração (µg/mL) | FR             | FR/FRmédio    |
|----------------------|----------------|---------------|
| 199,40               | 5178,95        | 100,03        |
| 299,10               | 5193,58        | 100,31        |
| 398,80               | 5160,45        | 99,67         |
| 498,50               | 5176,96        | 99,99         |
| 598,20               | 5177,57        | 100,00        |
| <b>Média</b>         | <b>5177,50</b> | <b>100,00</b> |
| <b>DP</b>            | <b>11,75</b>   | <b>0,23</b>   |
| <b>CV (%)</b>        | <b>0,23</b>    | <b>0,23</b>   |

Em que FR representa o fator de resposta, DP – desvio-padrão e CV- coeficiente de variação.

A linearidade em cada um dos pontos deve variar entre 98 e os 102% para que os resultados apresentem um melhor ajuste à curva de calibração, Figura 25. Como se pode observar, todos os resultados obtidos estão entre o intervalo de especificação.



**Figura 25** - Representação gráfica do teste de Rikilt.

Em conclusão, todos os testes de linearidade realizados demonstraram que os resultados apresentavam um ajuste linear, logo a curva de calibração linear foi utilizada.

#### 4.3.3. Gama de trabalho

A gama de trabalho, determinada a partir da homogeneidade de variâncias, permitiu verificar se esta era apropriada, de acordo com o objetivo do trabalho. A gama de trabalho foi calculada a partir da comparação entre o valor do teste *PG* e o valor do teste *F* de *Snedecor/Fisher*, para (N-1) graus de liberdade. Os valores obtidos para *PG* e *F* de *Snedecor/Fisher*, para (N-1) graus de liberdade foram 4,16 e 5,35, respetivamente. Como *PG* é inferior a *F*, a diferença entre variâncias não foi significativa, logo a gama de trabalho estava bem ajustada.

#### 4.3.4. Precisão

A precisão foi analisada de duas formas distintas, através da repetibilidade e da precisão intermédia. A repetibilidade permitiu avaliar a variabilidade entre as repetições das amostras na concentração de trabalho, conforme se mostra na Tabela 23. A repetibilidade de sistema também é uma medida de precisão, e traduz a dispersão obtida para uma série de sinais obtidos para a mesma amostra. É avaliada através de 6 leituras de uma solução padrão na concentração de trabalho. O coeficiente de variação dos 6 sinais deve ser igual ou inferior a 2,0%

**Tabela 23** - Resultados da análise da repetibilidade para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Amostras      | Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------------|-----------------------------------|
| A1            | 101,70                            |
| A2            | 102,92                            |
| A3            | 101,96                            |
| A4            | 101,34                            |
| A5            | 101,36                            |
| A6            | 101,62                            |
| <b>Média</b>  | 101,82                            |
| <b>CV (%)</b> | 0,58                              |

*Em que CV significa coeficiente de variação.*

O coeficiente de variação (%) entre as repetições deve apresentar um valor menor ou igual a 2,0%. Neste caso, o valor obtido foi de 0,58%, logo este está incluído no intervalo de especificação.

A precisão intermédia verificou se o método apresenta sensibilidade a variações, que pode acontecer durante a aplicação rotineira do método. As variações impostas incluíram, o equipamento, o dia da análise, o técnico que realiza a análise e a coluna cromatográfica utilizada. A precisão intermédia avaliou a variabilidade entre as amostras preparadas pelos dois técnicos, em diferentes dias, quantificadas em equipamentos e coluna diferentes, Tabela 24.

**Tabela 24** - Resultados da análise da precisão intermédia para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| <b>Análise</b>        | <b>1</b> | <b>2</b> |
|-----------------------|----------|----------|
|                       | 101,70   | 97,98    |
|                       | 102,92   | 99,57    |
| <b>Teores obtidos</b> | 101,96   | 101,61   |
|                       | 101,34   | 102,03   |
|                       | 101,36   | 101,69   |
|                       | 101,62   | 100,33   |
| <b>Média</b>          | 101,82   | 100,54   |
| <b>CV (%)</b>         | 0,58     | 1,55     |
| <b>Média Global</b>   | 101,18   |          |
| <b>CV global (%)</b>  | 1,17     |          |

*Em que CV significa coeficiente de variação.*

Os resultados obtidos, Tabela 24, demonstraram que o coeficiente de variação global foi de 1,17%, sendo este valor inferior ao limite máximo aceitável, 3,0%. Deste modo, foi possível verificar que o método analítico para a quantificação de fluvoxamina é um método preciso tanto a nível de repetibilidade como da precisão intermédia.

#### **4.3.5. Exatidão**

A exatidão permitiu determinar a recuperação percentual em três níveis de concentração diferentes, nomeadamente a 50, 100 e a 150% da concentração de trabalho, como se mostra na Tabela 25.

**Tabela 25** - Resultados da análise da exatidão para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Níveis | Concentração teórica (µg/mL) | Concentração experimental (µg/mL) | % de recuperação | Média  | CV (%) |
|--------|------------------------------|-----------------------------------|------------------|--------|--------|
| 50%    | 200,09                       | 201,1                             | 100,48           | 101,10 | 0,65   |
|        |                              | 202,1                             | 101,03           |        |        |
|        |                              | 203,7                             | 101,80           |        |        |
| 100%   | 400,17                       | 401,7                             | 100,38           | 100,68 | 0,28   |
|        |                              | 403,1                             | 100,73           |        |        |
|        |                              | 403,9                             | 100,93           |        |        |
| 150%   | 600,26                       | 604,3                             | 100,67           | 100,59 | 0,26   |
|        |                              | 602,1                             | 100,30           |        |        |
|        |                              | 605,1                             | 100,81           |        |        |

*Em que CV significa coeficiente de variação*

As taxas de recuperação em cada nível devem apresentar valores entre 97,0-103,0%. Os resultados obtidos estavam incluídos no intervalo de especificação, logo estes valores são aceitáveis. O valor do CV entre cada um dos níveis deve ser inferior a 2,0%, e todos os valores de CV determinados foram inferiores a 1%. Deste modo, o método de doseamento da fluvoxamina foi considerado exato para a aplicação pretendida.

#### **4.3.6. Estabilidade das soluções**

A estabilidade de uma solução determina o número de dias durante os quais a solução é estável. A estabilidade de soluções foi avaliada em duas perspectivas diferentes, nomeadamente a estabilidade de uma solução no balão onde foi preparada, e armazenada à temperatura ambiente, e a estabilidade da solução no vial que ficou no *autosampler* do equipamento a 10/16°C durante o período do estudo. No dia 0 analisam-se as soluções de padrão e amostra preparadas no balão à temperatura ambiente. No dia 5 reanalisaram-se as soluções padrão e a amostra que tinham sido injetadas no dia 0 no mesmo vial da injeção do dia 0, que ficou no *autosampler* do equipamento. Contudo, também se reanalisa as soluções do dia 0, que ficam exposta à temperatura ambiente, num novo vial que é injetado. A estabilidade das soluções (padrões e amostras) permitiu confirmar que em rotina é possível utilizar as mesmas soluções durante o tempo máximo estudado, sem necessidade de preparação de novas soluções frescas, no caso de ser necessário repetir uma análise devido a problemas cromatográficos ou outros constrangimentos analíticos.

A estabilidade foi avaliada pela comparação da concentração da SA na formulação e no padrão no dia de preparação e ao fim de cinco dias. A Tabela 26 representa os valores das concentrações obtidas em ambos os dias. No entanto, para além da determinação das concentrações no dia 0 e no dia 5, foi essencial determinar o coeficiente de variação entre os padrões e amostras (Tabela 26). Os coeficientes de variação determinados foram todos inferiores a 2,0%, com excepção da amostra que ficou armazenada no vial no *autosampler*. Logo, se for necessário realizar uma reanálise é essencial encher outro vial, uma vez que a solução de amostra armazenada no balão, e exposta à temperatura ambiente é estável durante 5 dias.

**Tabela 26** - Resultados da análise da estabilidade de soluções no dia 0 e no dia 5 para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Tipo de soluções | Dia 0          |         | Dia 5                       |                             |                      |                      |
|------------------|----------------|---------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
|                  | Solução padrão | Amostra | Solução padrão <sup>1</sup> | Solução padrão <sup>2</sup> | Amostra <sup>1</sup> | Amostra <sup>2</sup> |
| <b>Teor (%)</b>  | 100,53         | 101,70  | 101,48                      | 99,68                       | 104,76               | 101,11               |
| <b>CV (%)</b>    | -              |         | 0,32                        | 1,49                        | 3,01                 | 0,58                 |

*Em que CV significa coeficiente de variação, o 1 – que solução ficou armazenada no vial no autosampler do equipamento e o 2 – que a solução foi armazenada no balão e expostas à TA.*

#### 4.3.7. Robustez

A robustez permitiu determinar as possíveis variações que podem acontecer no método analítico, e a sua consequência na determinação da concentração de SA na amostra. Para o estudo da robustez, variou-se a concentração de ACN na fase móvel, a temperatura do *autosampler*, o fluxo e a temperatura da coluna, Tabela 27.

**Tabela 27** - Variação dos fatores para análise da robustez para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| Fator                                  | Condição Normal | Varição |
|--|-----------------|---------|
| % ACN na Fase móvel                    | 40              | 42      |
| Temperatura do <i>autosampler</i> (°C) | 22              | 30      |
| Fluxo (mL/min)                         | 1,2             | 1,5     |
| Temperatura da coluna (°C)             | 22              | 30      |

Esta análise determinou o teor (%) de fluvoxamina em cada uma das amostras com as respectivas variações. Contudo, entre os diferentes fatores de variação, o CV (%) não deve ser superior a 2,0%. Neste caso, o limite de especificação para os diferentes fatores não ultrapassou os 0,28%, como se pode observar na Tabela 28.

**Tabela 28** - Resultados obtidos da análise da robustez para a validação do método de quantificação da fluvoxamina.

| <b>Fatores</b>                                | <b>Condições</b> | <b>Teor (%)</b> | <b>CV (%)</b> |
|---|------------------|-----------------|---------------|
| <b>% ACN na Fase móvel</b>                    | 40               | 100,23          | 0,04          |
|   | 42               | 100,17          |               |
| <b>Temperatura do <i>autosampler</i> (°C)</b> | 22               | 100,18          | 0,03          |
|   | 30               | 100,22          |               |
| <b>Fluxo (mL/min)</b>                         | 1,2              | 100,02          | 0,25          |
|   | 1,5              | 100,38          |               |
| <b>Temperatura da coluna (°C)</b>             | 22               | 100,39          | 0,28          |
|   | 30               | 100,00          |               |

*Em que CV significa coeficiente de variação.*

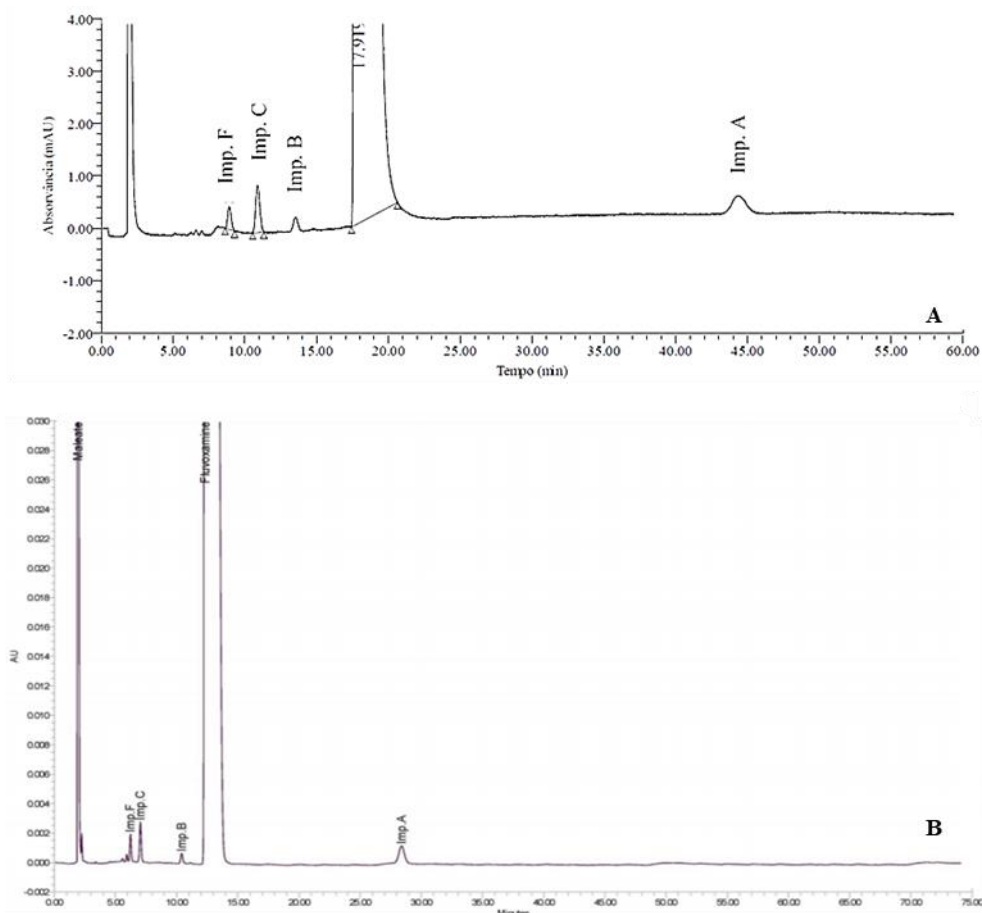
Embora, os valores do coeficiente de variação sejam inferiores a 2,0%, o método 3 que combina a temperatura do *autosampler* e da coluna é o mais limitante, uma vez que o pico correspondente à fluvoxamina e ao metilparabeno sódico têm um tempo de retenção próximo, com o pico do metilparabeno sódico localizado no final do pico da fluvoxamina.

#### **4.4. Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de impurezas da fluvoxamina**

Posteriormente ao desenvolvimento do método analítico para a quantificação da substância ativa, foi fundamental desenvolver o método de quantificação de impurezas. O método de impurezas teve por base o método de quantificação descrito na Ph. Eur. 10. O método analítico de quantificação das impurezas da fluvoxamina tem como princípio a identificação e quantificação das impurezas descritas na monografia e o seu tempo de retenção relativo à SA. As impurezas conhecidas são a impurezas A, B, C, D, F e G, contudo neste método apenas estão descritas a A, B, C, F e G.

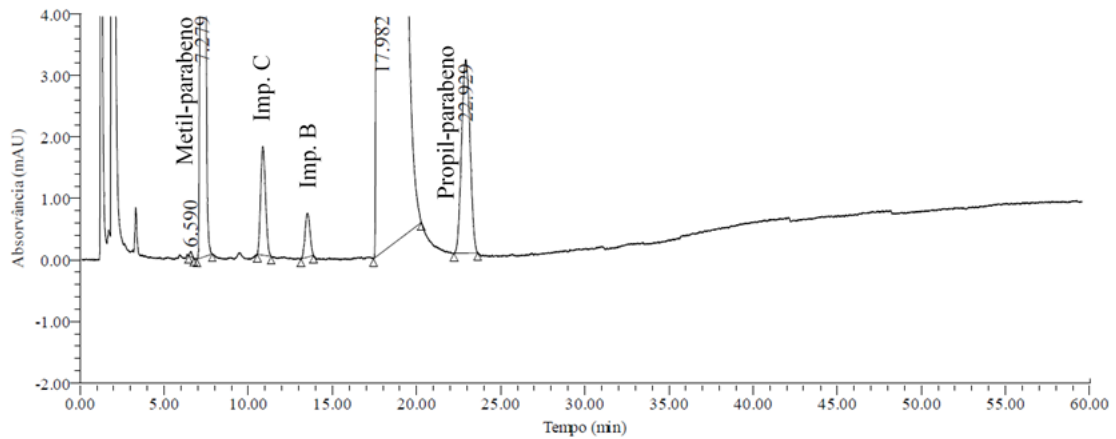
O método de impurezas deve apresentar seletividade entre os picos das impurezas e os picos correspondentes aos conservantes, à SA, e restantes excipientes. Contudo, para se obter o método pretendido, foi crucial estudar o perfil das impurezas através da comparação de cromatogramas de amostra com as soluções de impurezas de referência. O estudo do perfil de impurezas implicou comparação entre os cromatogramas da solução de referência *system suitability chemical reference substance (CRS)* obtida pelo método, e o cromatograma de referência disponibilizado pela *European Directorate for the Quality of medicines & Healthcare (EDQM)*.

O cromatograma da solução de referência *system suitability CRS* resultante do método em desenvolvimento, Figura 26-A, mostrou a existência das impurezas conhecidas descritas na monografia. Comparativamente com o cromatograma de referência, foi possível verificar que as impurezas tinham um perfil semelhante, contudo as impurezas F e C apresentavam uma maior separação cromatográfica. Uma maior separação cromatográfica permite uma resolução superior entre o pico da impureza F e C, que deve ser maior a 1,5, e neste caso foi 4,13. Em relação ao tempo de retenção relativo obtido, este foi igual ao de referência, Figura 26-B, sendo o da impureza A, B, C e F de 2,5; 0,8; 0,6 e 0,5, respetivamente.

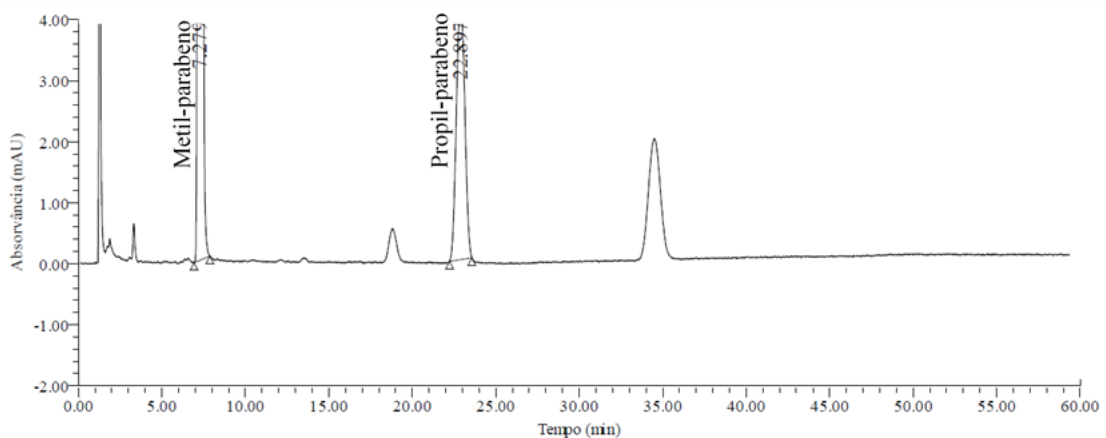


**Figura 26** - A: Cromatograma da solução de referência *system suitability* CRS obtida pelo método cromatográfico a desenvolver e B: Cromatograma da solução de referência *system suitability* CRS de referência.

O cromatograma da solução de referência *system suitability* CRS também deve ser comparado com os cromatogramas das soluções que continham a matriz com fluvoxamina e o placebo, Figura 27 e 28. Esta comparação permitiu demonstrar a seletividade entre os picos mais importantes, nomeadamente o pico dos conservantes e o da SA.



**Figura 27** - Cromatograma correspondente à solução que contém a matriz com fluvoxamina.



**Figura 28** - Cromatograma correspondente à solução de placebo.

No entanto, o método analítico a desenvolver pode ser otimizado, de modo a obter-se um cromatograma da solução de referência *system suitability* CRS semelhante ao cromatograma de referência.

O parâmetro mais comum que podia ser modificado, de modo a alterar o tempo de retenção dos compostos é a temperatura. A temperatura influencia parâmetros como a solubilidade, a viscosidade, a difusividade e a polaridade da fase móvel. O aumento da temperatura permite uma diminuição da viscosidade, e conseqüentemente um aumento da velocidade de difusão, que permite uma velocidade de transferência maior entre a fase estacionária e a fase móvel. O aumento da transferência permite aumentar a eficiência da coluna e diminuir o tempo de retenção dos compostos, e conseqüentemente aperfeiçoar a seletividade da separação. A temperatura também pode ser combinada com a alteração de

fluxo, de modo ajustar o método para se obter tempos de retenção semelhantes aos do cromatogramas de referência.

No entanto, também existem outras alterações que podem ser realizadas como o ajuste da proporção orgânica na fase móvel, contudo por vezes o aumento de 1% já ultrapassa o objetivo inicial. Deste modo, o melhor ajuste a utilizar quando a alteração é mínima é a variação da temperatura.

## 5. Conclusão

O desenvolvimento de um método analítico preditivo de estabilidade, apresenta como finalidade o desenvolvimento de um método que permite a quantificação da SA e outros compostos, nomeadamente produtos de degradação. O método de doseamento da fluvoxamina baseou-se no método cromatográfico para a quantificação de impurezas descrito na Ph. Eur. 10. Contudo, o desenvolvimento e a otimização do método de doseamento da fluvoxamina envolvia a utilização de uma abordagem sistemática designada por *QbD*. Esta abordagem envolveu uma análise de risco e o *DoE*. Os fatores críticos identificados através da FMEA foram a fração de ACN na fase móvel e o volume de injeção, enquanto as respostas escolhidas foram o fator de simetria, o tempo de retenção e o número de pratos teóricos. Esta análise permitiu concluir que os fatores não influenciam as respostas de igual modo. O volume de injeção e a sua combinação com a proporção de ACN na fase móvel influenciam bastante o fator de simetria, logo é necessária precaução quando se alteram estes fatores. Uma fração baixa de ACN requer também um volume de injeção bastante reduzido, enquanto que à medida de a fração aumenta o intervalo disponível para o volume de injeção também aumenta. O tempo de retenção da SA é exclusivamente influenciado pela fração de ACN. A proporção de fase orgânica na fase móvel tem um forte impacto no perfil cromatográfico da SA. O número de pratos teóricos é afetado pelos dois fatores, contudo para esta gama de ACN e volume de injeção, os valores obtidos nunca ficaram abaixo do limite aceitável. Posteriormente a esta análise foi possível determinar as condições cromatográficas ótimas, 40% de ACN na fase móvel e 6 $\mu$ L de volume de injeção. Contudo, também foi necessário avaliar se o método era robusto o suficiente para sofrer pequenas variações, em trabalho de rotina. Estas variações foram avaliadas com base no *design space*, permitindo concluir que para uma probabilidade de erro inferior a 5%, a fração de ACN apenas podia variar entre 39,7% e os 41,0% e o volume de injeção entre os 5 e 8  $\mu$ L.

Outro objetivo era o estudo da estabilidade intrínseca da SA, através de ensaios de degradação forçada. As condições de stress aplicadas à SA foram hidrolíticas, térmicas, fotolíticas e oxidativas. Este estudo permitiu o conhecimento de cinco produtos de degradação. O produto de degradação I (TRR=0,85) foi desenvolvido nas soluções com a SA quando expostas a meio ácido, térmico e fotolítico. O produto de degradação II (TRR=7,45) apenas surgiu no meio ácido nas soluções com SA. O produto de degradação III (TR=0,40) surgiu em todas as soluções em meio básico. O produto de degradação IV (TR=0,66) apenas surgiu na solução da formulação e do placebo em meio básico, o que

indica que este é um produto da degradação de algum excipiente, uma vez que este apenas está presente nas soluções que contém placebo. O produto de degradação V (TR=0,24) surgiu aquando da exposição das soluções à temperatura e luz UV. A exposição ao peróxido de hidrogénio não desencadeou a formação de nenhum produto de degradação. Além dos estudos sobre os produtos de degradação, esta análise também avaliou a estabilidade da fluvoxamina na presença de condições de stress. Deste modo, a fluvoxamina nas duas soluções avaliadas apresenta um menor teor quando exposta a condições ácidas e térmicas. Assim, é possível concluir que a fluvoxamina é mais sensível à presença do meio ácido e térmico, do que ao meio básico, oxidativo e fotolítico.

Um método analítico para a quantificação de uma SA para o uso rotineiro implica a sua validação. A validação avalia o método em diferentes domínios, como a seletividade, a precisão, a exatidão, linearidade, gama de trabalho, estabilidade de soluções e robustez. A seletividade é um dos parâmetros iniciais, verificando se os picos são seletivos uns em relação aos outros. A fluvoxamina é seletiva em relação aos conservantes quando presentes. Em relação à linearidade, este estudo permitiu verificar que os resultados apresentavam um melhor ajuste à curva de calibração linear, e que a concentração de trabalho de 400 µg/mL, foi selecionada corretamente. A gama de trabalho também foi estudada, e demonstrou através da homogeneidade de variâncias que a gama de trabalho escolhida estava bem ajustada. A precisão avaliou a repetibilidade e a precisão intermédia, e em ambas verificou-se que o método era preciso, e que variações como o equipamento, a coluna cromatográfica, o técnico e o dia da análise não tinham qualquer influência na quantificação da fluvoxamina. A avaliação da exatidão demonstrou que o método desenvolvido era exato, na gama de trabalho de 50% a 150%. A estabilidade de soluções permitiu verificar, que as soluções com fluvoxamina eram estáveis, neste caso foram estáveis durante 5 dias, quer armazenadas em vial no equipamento como à temperatura ambiente, com exceção da amostra que ficou armazenada no vial no interior do *autosampler*. Por fim, a robustez permitiu analisar possíveis variações do método analítico e a forma como estas afetam o doseamento da SA. As variações induzidas não afetaram a quantificação da fluvoxamina, deste modo é possível concluir que o método é robusto. A validação permitiu concluir que, o método é seletivo, preciso, exato e robusto, e que a sua utilização diária pode ser aplicada independentemente do técnico, do dia, do equipamento.

Por fim também se iniciou o desenvolvimento do método analítico para a quantificação de impurezas conhecidas, como a impureza A, B, C, F e G. O método

desenvolvido apresenta um perfil cromatográfico semelhante ao do cromatograma de referência. Contudo os tempos de retenção das impurezas e da SA são um pouco superiores, no entanto o TRR é igual. Todavia, este método pode ser melhorado, por exemplo através da alteração da temperatura da coluna, que influencia um conjunto de fatores permitindo uma eluição mais rápida e eficiente dos compostos.

Em suma, o método analítico desenvolvido com base no *QbD* permitiu quantificar a fluvoxamina e os produtos de degradação de forma eficiente. Este método é preciso, robusto, exato e pode ser utilizado de forma rotineira. O método de quantificação de impurezas foi desenvolvido, contudo pode ser ajustado e melhorado através do ajuste de diferentes fatores. A estabilidade intrínseca da SA foi avaliada e demonstrou uma maior sensibilidade ao meio ácido e térmico comparativamente aos outros.

## 6. Referências bibliográficas

- [1] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, “ICH Q8(R2) Pharmaceutical Development,” 2009.
- [2] J. J. Peterson, R. D. Snee, P. R. McAllister, T. L. Schofield, and A. J. Carella, “Statistics in pharmaceutical development and manufacturing,” *J. Qual. Technol.*, vol. 41, no. 2, pp. 111–134, 2009.
- [3] S. Dunne, B. Shannon, C. Dunne, and W. Cullen, “A review of the differences and similarities between generic drugs and their originator counterparts, including economic benefits associated with usage of generic medicines, using Ireland as a case study,” *BMC Pharmacol. Toxicol.*, vol. 14, pp. 1–19, 2013.
- [4] M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, and Y. K. Agrawal, “Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 4, pp. 159–165, 2013.
- [5] S. W. Baertschi, “Forced Degradation and Its Relation to Real Time Drug Product Stability,” in *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*, vol. 17, K. Huynh-Ba, Ed. New York: Springer-Verlag New York Inc., 2010, pp. 107–116.
- [6] T. Loftsson, “Stability Testing,” in *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*, K. Taylor, Ed. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2014, pp. 121–125.
- [7] S. W. Baertschi, P. J. Jansen, and K. M. Alsante, “Stress Testing: A predictive tool,” in *Pharmaceutical Stress Testing - Predicting Drug Degradation*, Second Edi., S. W. Baertschi, K. M. Alsante, and R. A. Reed, Eds. Bosa Roca: Taylor & Francis Inc, 2011, pp. 10–48.
- [8] International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, “Quality Guideline: stability testing of new drugs substance and products - Q1A,” 2003.
- [9] S. Bajaj, D. Singla, and N. Sakhuja, “Stability testing of pharmaceutical products,” *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 2, pp. 129–138, 2012.
- [10] S. Ausar, Hasija, Li, and Rahman, “Forced degradation studies: an essential tool for the formulation development of vaccines,” *Vaccine Dev. Ther.*, vol. 3, p. 11, 2013.
- [11] D. Zhou, W. R. Porter, and G. G. Z. Zhang, “Drug stability and degradation studies,” in *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition*, Y. Qiu, Y. Chen, G. Zhang, L. Yu, and R. M. V., Eds. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2017, pp. 113–149.

- [12] K. M. Alsante, S. W. Baertschi, M. Coutant, B. L. Marquez, T. R. Sharp, and T. C. Zelesky, "Degradation and Impurity Analysis for Pharmaceutical Drug Candidates," in *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, vol. 10, S. Ahuja and S. Scypinski, Eds. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2011, pp. 59–169.
- [13] T. Rawat and I. P. Pandey, "Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations," *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 7, pp. 238–241, 2015.
- [14] N. Soni, "Importance of Stability Indicating Analytical Methods for Active Pharmaceutical Ingredients," in *Stability Indicating Analytical Methods*, N. Soni, Ed. New York: Scholars Press, 2018, p. 23.
- [15] K. Huynh-Ba *et al.*, *Handbook of stability testing in pharmaceutical development*. New York: Springer US, 2009.
- [16] World Health Organization, "Guideline on Validation-Appendix 4 Analytical Method Validation," 2016.
- [17] WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, "Quality Guideline Q1F: Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished," 2017.
- [18] C. dos S. Moreira and F. R. Lourenço, "Development and optimization of a stability-indicating chromatographic method for verapamil hydrochloride and its impurities in tablets using an analytical quality by design (AQbD) approach," *Microchem. J.*, vol. 154, 2020.
- [19] D. Suryawanshi, D. K. Jha, U. Shinde, and P. D. Amin, "Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method of cholecalciferol in bulk and pharmaceutical formulations: Analytical quality by design approach," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 9, pp. 21–32, 2019.
- [20] N. K. Yadav, A. Raghuvanshi, G. Sharma, S. Beg, O. P. Katare, and S. Nanda, "QbD-based development and validation of a stability-indicating HPLC method for estimating ketoprofen in bulk drug and proniosomal vesicular system," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 377–389, 2016.
- [21] C. Hubert, P. Lebrun, S. Houari, E. Ziemons, E. Rozet, and P. Hubert, "Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing: A case of a learning process," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 88, pp. 401–409, 2014.

- [22] J. N. Sangshetti, M. Deshpande, Z. Zaheer, D. B. Shinde, and R. Arote, "Quality by design approach: Regulatory need," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, pp. S3412–S3425, 2017.
- [23] P. Ramalingam and B. Jahnavi, "QbD Considerations for Analytical Development," in *Pharmaceutical Quality by Design*, W. S. Schlindwein and M. Gibson, Eds. New York: John Wiley & Sons Inc, 2019, pp. 77–108.
- [24] J. Sousa, D. Holt, and P. A. Butterworth, "Analytical method design, development, and lifecycle management," in *Pharmaceutical Quality by Design*, W. S. Schlindwein and M. Gibson, Eds. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2018, pp. 257–279.
- [25] I. M. Fukuda, C. F. F. Pinto, C. D. S. Moreira, A. M. Saviano, and F. R. Lourenço, "Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD)," *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 54, pp. 1–16, 2018.
- [26] F. G. Vogt and A. S. Kord, "Development of Quality-By-Design Analytical Methods," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 7, pp. 2271–2280, 2010.
- [27] J. Kochling, W. Wu, Y. Hua, Q. Guan, and J. Castaneda-Merced, "A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC-MS methods development for protein analysis," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 125, pp. 130–139, 2016.
- [28] S. Orlandini, S. Pinzauti, and S. Furlanetto, "Application of quality by design to the development of analytical separation methods," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 2–3, pp. 443–450, 2013.
- [29] N. V. V. S. S. Raman, U. R. Mallu, and H. R. Bapatu, "Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing," *J. Chem.*, vol. 2015, 2015.
- [30] A. Ayre, P. Mane, K. Ghude, M. Nemade, and P. Gide, "Implementing Quality by Design-A methodical approach in the RP-HPLC method development process," *Int. J. Adv. Pharm. Anal.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–6, 2004.
- [31] J. M. Nicholas and H. Steyn, "Managing Risks in Projects," in *Project Management for Engineering, Business, and Technology*, 2012, pp. 351–388.
- [32] J. Tupa, J. Simota, and F. Steiner, "Aspects of Risk Management Implementation for Industry 4.0," *Procedia Manuf.*, vol. 11, no. June, pp. 1223–1230, 2017.
- [33] B. Purushothama, "Problem solving and change management," in *Training and Development of Technical Staff in the Textile Industry*, 2012, pp. 115–139.

- [34] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Q9 Quality Risk Management*, vol. 2006, no. June. 2006.
- [35] E. White, “Risk Management for Aseptic Processing,” *J. Valid. Technol.*, pp. 25–33, 2009.
- [36] J. K. and S. C. K. B. Subia, “Quality Risk Analysis: Value for Money in the Pharmaceutical Industry,” in *Risk Management – Current Issues and Challenges*, vol. 524, 2010, pp. 141–157.
- [37] H.-P. Berg, “Risk management: procedures, methods and experiences,” *Risk Manag.*, vol. 1, pp. 79–95, 2010.
- [38] S. Beg, M. S. Hasnain, M. Rahman, and S. Swain, “Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications,” in *Pharmaceutical Quality by Design*, W. S. Schlindwein and M. Gibson, Eds. New York: John Wiley & Sons Inc., 2019, pp. 1–17.
- [39] S. N. Politis, P. Colombo, G. Colombo, and D. M. Rekkas, “Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 43, pp. 889–901, 2017.
- [40] A. K. Das and S. Dewanjee, “Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation,” in *Computational Phytochemistry*, S. D. Sarker and L. Nahar, Eds. United States: Elsevier Science Publishing Co Inc., 2018, pp. 75–106.
- [41] P. K. Sahu, N. R. Ramiseti, T. Cecchi, S. Swain, C. S. Patro, and J. Panda, *An overview of experimental designs in HPLC method development and validation*, vol. 147. Elsevier B.V., 2018.
- [42] S. Beg, S. Swain, M. Rahman, M. S. Hasnain, and S. S. Imam, “Application of Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Product and Process Optimization,” in *Pharmaceutical Quality by Design*, W. S. Schlindwein and M. Gibson, Eds. New York: John Wiley & Sons Inc, 2019, pp. 43–64.
- [43] L. Vera Candiotti, M. M. De Zan, M. S. Cámara, and H. C. Goicoechea, “Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development,” *Talanta*, vol. 124, pp. 123–138, 2014.
- [44] A. S. Dhoot, G. J. Fernandes, A. Naha, M. Rathnanand, and L. Kumar, “Design of Experiments in Pharmaceutical Development,” *Pharm. Chem. J.*, vol. 53, pp. 730–735, 2019.
- [45] D. B. Hibbert, “Experimental design in chromatography: A tutorial review,” *J.*

- Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 910, pp. 2–13, 2012.
- [46] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments Eighth Edition*. 2012.
- [47] A. L. H. Müller, J. A. De Oliveira, O. D. Prestes, M. B. Adaime, and R. Zanella, “Design of experiments and method development,” in *Solid-Phase Extraction*, C. F. Pole, Ed. United States: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2019, pp. 589–608.
- [48] P. Sahoo and T. K. Barman, “ANN modelling of fractal dimension in machining,” in *Mechatronics and Manufacturing Engineering*, J. P. Davim, Ed. Cambridge: Elsevier Science & Technology, 2012, pp. 159–226.
- [49] J. Antony, “Full Factorial Designs,” in *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, J. Antony, Ed. London: Elsevier Health Sciences, 2014, pp. 63–85.
- [50] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, and L. A. Escaleira, “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry,” *Talanta*, vol. 76, pp. 965–977, 2008.
- [51] S. Beg, M. Rahman, and K. Kohli, “Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of nanopharmaceutical products,” *Drug Discov. Today*, vol. 24, pp. 717–725, 2019.
- [52] A. S. Bhadouria and J. Hahn, “Optimal experimental design using partial least squares regression,” *2015 41st Annu. Northeast Biomed. Eng. Conf. NEBEC 2015*, pp. 5–6, 2015.
- [53] B. Ait-Amir, P. Pougnet, and A. El Hami, “Meta-model development,” in *Embedded Mechatronic Systems 2*, vol. 2, P. Pougnet and A. El Hami, Eds. United Kingdom: ISTE Press Ltd - Elsevier Inc, 2015, pp. 151–179.
- [54] R. Peraman, K. Bhadraya, and Y. P. Reddy, “Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics,” *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2015, p. 9, 2015.
- [55] L. Huber, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Second edi. Bosa Roca: Taylor & Francis Inc, 2007.
- [56] European Medicines Agency, “Quality Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures,” 1995.
- [57] M. I. Jimisar, P. Heylen, and M. De Smet, “Method Validation,” in *HPLC Method Development for Pharmaceutical*, S. Ahuja and H. Rasmussen, Eds. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2007, pp. 441–459.
- [58] A. E. Bretnall and G. S. Clarke, “Validation of Analytical Test Methods,” in *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, 2nd ed., vol. 10, S. Ahuja and S.

- Scypinski, Eds. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2011, pp. 429–457.
- [59] V. Ravichandran, S. Shalini, K. M. Sundram, and H. Rajak, “Validation of analytical methods - Strategies & importance,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, pp. 18–22, 2010.
- [60] X. Fang, G. Carr, and R. C. Freeze, “Analytical development and validation for solid oral dosage forms,” in *Developing Solid Oral Dosage Forms*, Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Z. Zhang, L. Yu, and R. V. Mantri, Eds. San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2009, pp. 519–537.
- [61] J. Ermer, D. Rudd, and J. H. M. Miller, *Analytical chemistry in a GMP environment : a practical guide*. New York: John Wiley & Sons Inc, 2000.
- [62] F. Raposo, “Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 167–185, 2016.
- [63] International Organization for Standardization, “ISO 8466.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/15664.html>.
- [64] J. M. Andrade and M. P. Gómez-Carracedo, “Notes on the use of Mandel’s test to check for nonlinearity in laboratory calibrations,” *Anal. Methods*, vol. 5, no. 5, pp. 1145–1149, 2013.
- [65] M. de Sá *et al.*, “A liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of salicylic, jasmonic and abscisic acids in *Coffea arabica* leaves,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 3, pp. 529–536, 2014.
- [66] S. Ahuja, *Chromatography and Separation Science*. New York: Academic Press, 2006.
- [67] O. Coskun, “Separation Techniques: Chromatography,” *North. Clin. Istanbul*, vol. 3, pp. 156–160, 2016.
- [68] K. A. Clark and J. L. Moore, “Introduction and overview,” in *Handbook of HPLC*, D. Corradini, E. Eksteen, R. Eksteen, P. Schoenmakers, and N. Miller, Eds. Boca Raton: CRC Press, 1998.
- [69] A. Braithwaite and F. J. Smith, *Chromatographic Methods*. New York: Kluwer Academic Publishers, 1999.
- [70] R. F. Chust, “Introdução a cromatografia de líquidos (HPLC),” 1990.
- [71] M. W. Dong, *Modern HPLC for practicing scientists*. New York: John Wiley &

- Sons, 2006.
- [72] R. Malviya, V. Bansal, O. P. Palm, and P. K. Sharma, “High performance liquid chromatography: a short review,” *J. Glob. Pharma Technol.*, vol. 2, 2010.
- [73] E. Lacassie, J. M. Gaulier, P. Marquet, J. F. Rabatel, and G. Lachâtre, “Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 742, pp. 229–238, 2000.
- [74] C. Duverneuil, G. L. De la Grandmaison, P. De Mazancourt, and J. C. Alvarez, “A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs,” *Ther. Drug Monit.*, vol. 25, pp. 565–573, 2003.
- [75] E. S. Mitchell, *Antidepressants (Drugs: The Straight Facts)*. PBroomall: Chelsea House Publishers, 2004.
- [76] R. M. Foreman, M. Zappas, and C. Whitely, “Antidepressant withdrawal: A guide for primary care clinicians,” *J. Nurse Pract.*, vol. 16, no. 3, pp. 191–194, 2020.
- [77] K. Thorslund, T. Svensson, K. Nordlind, A. Ekbom, and C. M. Fored, “Use of serotonin reuptake inhibitors in patients with psoriasis is associated with a decreased need for systemic psoriasis treatment: A population-based cohort study,” *J. Intern. Med.*, vol. 274, pp. 281–287, 2013.
- [78] S. Eskeland, J. A. Halvorsen, and L. Tanum, “Antidepressants have anti-inflammatory effects that may be relevant to dermatology: A systematic review,” *Acta Derm. Venereol.*, vol. 97, pp. 897–905, 2017.
- [79] C. J. Connor, V. Liu, and J. G. Fiedorowicz, “Exploring the physiological link between psoriasis and mood disorders,” *Dermatol. Res. Pract.*, vol. 2015, 2015.
- [80] B. P. Chapman and J. Moynihan, “The brain-skin connection: Role of psychosocial factors and neuropeptides in psoriasis,” *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 623–627, 2009.
- [81] E. Souri, H. Donyayi, R. Ahmadkhaniha, and M. B. Tehrani, “A stability indicating HPLC method for the determination of Fluvoxamine in pharmaceutical dosage forms,” *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 14, pp. 1059–1065, 2015.
- [82] European Medicines Agency, *European Pharmacopeia 10*. .
- [83] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Fluvoxamine, “Fluvoxamine.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm>

- .nih.gov / composite / Fluvoxamine. [Accessed: 16-Mar-2020].
- [84] O. Spigset, S. Axelsson, Å. Norström, S. Hägg, and R. Dahlqvist, "The major fluvoxamine metabolite in urine is formed by CYP2D6," *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 57, pp. 653–658, 2001.
- [85] E. Perucca, G. Gatti, and E. Spina, "Clinical Pharmacokinetics of Halofantrine," in *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 27, no. 2, A. Prakash and A. van Rensburg, Eds. New York: Adis, 1994, pp. 104–119.
- [86] M. Miura and T. Ohkubo, "Identification of human cytochrome P450 enzymes involved in the major metabolic pathway of fluvoxamine," *Xenobiotica*, vol. 37, pp. 169–179, 2007.
- [87] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: Pharmaceutical Press.
- [88] T. R. Felthouse, J. C. Burnett, B. Horrell, M. J. Mummey, and Y. Kuo, "Maleic anhydride, maleic acid, and fumaric acid," Austin, 2001.
- [89] S. T. Yang, K. Zhang, B. Zhang, and H. Huang, "Fumaric Acid," in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, vol. 3, M. Moo-Young, Ed. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 2011, pp. 163–177.
- [90] G. Gupta and R. P. Mishra, "Comparative analysis of traditional and fuzzy FMECA approach for criticality analysis of conventional lathe machine," *Int. J. Syst. Assur. Eng. Manag.*, vol. 11, pp. 379–386, 2020.
- [91] E. R. Dawud and A. K. Shakya, "HPLC-PDA analysis of ACE-inhibitors, hydrochlorothiazide and indapamide utilizing design of experiments," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 5, pp. 718–728, 2019.
- [92] M. M. Elkhoudary, R. A. Abdel Salam, and G. M. Hadad, "Development and optimization of hplc analysis of metronidazole, diloxanide, spiramycin and cliquinol in pharmaceutical dosage forms using experimental design," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54, no. 10, pp. 1701–1712, 2016.
- [93] Sartorius Stedim Data Analytics, "User guide to MODDE 12 Version 12," pp. 1–394, 2017.
- [94] D. Lanari, M. C. Marcotullio, and A. Neri, "A design of experiment approach for ionic liquid-based extraction of toxic components-minimized essential oil from *Myristica fragrans* houtt," *Molecules*, vol. 23, p. 11, 2018.
- [95] B. A. Moussa, H. M. A. Hashem, M. A. Mahrouse, and S. T. Mahmoud, "Experimental design approach in HPLC method development: application for the

- simultaneous determination of sacubitril and valsartan in presence of their impurities and investigation of degradation kinetics,” *Chromatographia*, vol. 81, pp. 139–156, 2018.
- [96] A. T. Hemke and K. R. Gupta, “Force degradation study and rp-hplc method development for estimation of fluvoxamine maleate in tablet,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 7, pp. 196–202, 2015.

## **Anexos**

### **1.1. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação de fluvoxamina numa formulação semissólida.**

#### **1.1.1. Análise de Risco**

A avaliação do risco através da metodologia de FMEA permitiu estimar o risco através de diferentes fatores relacionados com o risco, nomeadamente a probabilidade, a severidade e a deteção. Estes parâmetros foram determinados com recurso a inquéritos realizados à equipa de controlo de qualidade dos Laboratórios Edol – Produtos farmacêuticos, S.A., I-1, I-2, I-3 e I-4.

**I-1** – Inquéritos realizados à equipa de controlo de qualidade dos Laboratórios Edol – Produtos farmacêuticos, S.A.

| <b>Inquérito nº 1</b> |  |   |                              |          |   |
|-----------------------|--|---|------------------------------|----------|---|
| <b>Falhas</b>         |  | <b>S</b>                                      | <b>P</b>                     | <b>D</b> |   |
| <b>Equipamento</b>    | <b>Preparação</b>  | Equipamento incorretamente limpo              | 6                            | 3        | 4 |
|                       |  | Equipamento incorretamente montado            | 7                            | 3        | 3 |
|                       |  | Operadores com pouca formação                 | 7                            | 2        | 1 |
|                       | <b>F. M</b>  | Inadequado grau pureza do tampão              | 4                            | 3        | 3 |
|                       |  | Alto ou baixo pH                              | 7                            | 4        | 4 |
|                       |  | Incorreta escolha do tampão                   | 6                            | 4        | 3 |
|                       |  | Incompatibilidade do solvente                 | 8                            | 5        | 2 |
|                       |  | Instabilidade do tampão                       | 7                            | 4        | 6 |
|                       |  | Inadequado gradiente da água                  | 5                            | 4        | 3 |
|                       |  | Inadequada Solução de lavagem                 | 6                            | 5        | 6 |
|                       |  | <b>Autosampler</b>                            | Inadequado volume de injeção | 7        | 3 |
|                       | Incorreta lavagem da agulha                              |   | 6                            | 2        | 3 |
|                       | Incorreta purga da agulha                                |   | 6                            | 5        | 3 |
|                       | Seleção incorreta da temperatura                         |   | 6                            | 5        | 1 |
|                       | <b>Bombas</b>  | Fluxo incorreto                               | 5                            | 4        | 1 |
|                       |  | Incorreta seleção dos parâmetros do gradiente | 6                            | 4        | 1 |
|                       |  | Incorreta purga das bombas                    | 7                            | 5        | 3 |
|                       | <b>Coluna</b>  | Variação da temperatura da coluna             | 4                            | 2        | 3 |
|                       |  | Variação da pressão da coluna                 | 8                            | 7        | 2 |
|                       |  | Seleção incorreta da temperatura              | 5                            | 4        | 2 |
| <b>Detector</b>       | Interferências no detetor ou variação do sinal           | 8   | 2                            | 4        |   |
|                       | Seleção incorreta do c.d.o                               | 10  | 2                            | 1        |   |
| <b>Lab</b>            | <b>Ambiente</b>  | Alta ou baixa temperatura                     | 5                            | 3        | 5 |
|                       |  | Alta ou baixa humidade                        | 5                            | 3        | 5 |
| <b>Resultados</b>     | Inadequada identificação do pico                         | 7   | 4                            | 3        |   |
|                       | Limites inadequados para os parâmetros                   | 7   | 3                            | 3        |   |
|                       | Estabelecimento inadequado de concentrações de LOD e LOQ | 7   | 5                            | 3        |   |
|                       | Run Time desadequado                                     | 8   | 3                            | 1        |   |
|                       | Limites de especificação de impureza incorretos          | 10  | 4                            | 2        |   |
|                       | Resultados Falsos  | 10  | 1                            | 2        |   |

*Em que F.M significa fase móvel, Lab – laboratório, c.d.o – comprimento de onda, LOD – limite de deteção, LOQ – limite de quantificação, P – probabilidade, S – severidade e D – deteção.*

**I-2 – Inquéritos realizados à equipa de controlo de qualidade dos Laboratórios Edol – Produtos farmacêuticos, S.A.**

| <b>Inquérito nº 2</b> |  |   |                              |          |   |
|-----------------------|--|---|------------------------------|----------|---|
| <b>Falhas</b>         |  | <b>S</b>                                      | <b>P</b>                     | <b>D</b> |   |
| <b>Equipamento</b>    | <b>Preparação</b>  | Equipamento incorretamente limpo              | 10                           | 4        | 3 |
|                       |  | Equipamento incorretamente montado            | 10                           | 2        | 4 |
|                       |  | Operadores com pouca formação                 | 9                            | 2        | 1 |
|                       | <b>F.M</b>   | Inadequado grau pureza do tampão              | 7                            | 4        | 3 |
|                       |  | Alto ou baixo pH                              | 8                            | 4        | 2 |
|                       |  | Incorreta escolha do tampão                   | 10                           | 4        | 2 |
|                       |  | Incompatibilidade do solvente                 | 10                           | 4        | 5 |
|                       |  | Inestabilidade do tampão                      | 10                           | 4        | 5 |
|                       |  | Inadequado gradiente da água                  | 8                            | 4        | 4 |
|                       |  | Inadequada Solução de lavagem                 | 8                            | 5        | 2 |
|                       |  | <b>Autosampler</b>                            | Inadequado volume de injeção | 8        | 4 |
|                       | Incorreta lavagem da agulha                              |   | 8                            | 3        | 5 |
|                       | Incorreta purga da agulha                                |   | 8                            | 3        | 4 |
|                       | Seleção incorreta da temperatura                         |   | 7                            | 4        | 3 |
|                       | <b>Bombas</b>  | Fluxo incorreto                               | 8                            | 4        | 2 |
|                       |  | Incorreta seleção dos parâmetros do gradiente | 8                            | 4        | 2 |
|                       |  | Incorreta purga das bombas                    | 8                            | 4        | 2 |
|                       | <b>Coluna</b>  | Varição da temperatura da coluna              | 8                            | 4        | 2 |
|                       |  | Varição da pressão da coluna                  | 8                            | 5        | 2 |
|                       |  | Seleção incorreta da temperatura              | 8                            | 4        | 2 |
| <b>Detector</b>       | Interferências no detetor ou variação do sinal           | 8   | 4                            | 2        |   |
|                       | Seleção incorreta do c.d.o                               | 8   | 3                            | 2        |   |
| <b>Lab</b>            | <b>Ambiente</b>  | Alta ou baixa temperatura                     | 6                            | 2        | 4 |
|                       |  | Alta ou baixa humidade                        | 6                            | 2        | 4 |
| <b>Resultados</b>     | Inadequada identificação do pico                         | 10  | 1                            | 1        |   |
|                       | Limites inadequados para os parâmetros                   | 10  | 1                            | 1        |   |
|                       | Estabelecimento inadequado de concentrações de LOD e LOQ | 8   | 2                            | 1        |   |
|                       | Run Time desadequado                                     | 8   | 2                            | 4        |   |
|                       | Limites de especificação de impureza incorretos          | 10  | 1                            | 1        |   |
|                       | Resultados Falsos  | 10  | 1                            | 1        |   |

*Em que F.M significa fase móvel, Lab – laboratório, c.d.o – comprimento de onda, LOD – limite de deteção, LOQ – limite de quantificação, P – probabilidade, S – severidade e D – deteção.*

**I-3** – Inquéritos realizados à equipa de controlo de qualidade dos Laboratórios Edol – Produtos farmacêuticos, S.A.

| <b>Inquérito nº 3</b> |  |   |                              |          |   |
|-----------------------|--|---|------------------------------|----------|---|
|                       | <b>Falhas</b>  | <b>S</b>                                      | <b>P</b>                     | <b>D</b> |   |
| <b>Equipamento</b>    | <b>Preparação</b>  | Equipamento incorretamente limpo              | 5                            | 5        | 5 |
|                       |  | Equipamento incorretamente montado            | 5                            | 1        | 5 |
|                       |  | Operadores com pouca formação                 | 2                            | 2        | 4 |
|                       | <b>F.M</b>   | Inadequado grau pureza do tampão              | 5                            | 2        | 2 |
|                       |  | Alto ou baixo pH                              | 6                            | 7        | 8 |
|                       |  | Incorreta escolha do tampão                   | 7                            | 5        | 5 |
|                       |  | Incompatibilidade do solvente                 | 6                            | 2        | 3 |
|                       |  | Instabilidade do tampão                       | 5                            | 5        | 5 |
|                       |  | Inadequado gradiente da água                  | 5                            | 2        | 2 |
|                       |  | Inadequada Solução de lavagem                 | 3                            | 2        | 2 |
|                       |  | <b>Autosampler</b>                            | Inadequado volume de injeção | 10       | 6 |
|                       | Incorreta lavagem da agulha                              |   | 8                            | 6        | 3 |
|                       | Incorreta purga da agulha                                |   | 6                            | 6        | 3 |
|                       | Seleção incorreta da temperatura                         |   | 8                            | 3        | 6 |
|                       | <b>Bombas</b>  | Incorreto fluxo                               | 10                           | 6        | 7 |
|                       |  | Incorreta seleção dos parâmetros do gradiente | 8                            | 6        | 7 |
|                       |  | Incorreta purga das bombas                    | 6                            | 5        | 3 |
|                       | <b>Coluna</b>  | Variação da temperatura da coluna             | 6                            | 1        | 1 |
|                       |  | Variação da pressão da coluna                 | 7                            | 2        | 6 |
|                       |  | Seleção incorreta da temperatura              | 6                            | 4        | 6 |
| <b>Detector</b>       | Interferências no detetor ou variação do sinal           | 9   | 6                            | 8        |   |
|                       | Seleção incorreta do c.d.o                               | 10  | 4                            | 8        |   |
| <b>Lab</b>            | <b>Ambiente</b>  | Alta ou baixa temperatura                     | 5                            | 5        | 2 |
|                       |  | Alta ou baixa humidade                        | 5                            | 2        | 1 |
| <b>Resultados</b>     | Inadequada identificação do pico                         | 10  | 5                            | 8        |   |
|                       | Limites inadequados para os parâmetros                   | 8   | 5                            | 5        |   |
|                       | Estabelecimento inadequado de concentrações de LOD e LOQ | 7   | 2                            | 5        |   |
|                       | Run Time desadequado                                     | 7   | 2                            | 7        |   |
|                       | Limites de especificação de impureza incorretos          | 8   | 2                            | 2        |   |
|                       | Resultados Falsos  | 7   | 3                            | 4        |   |

*Em que F.M significa fase móvel, Lab – laboratório, c.d.o – comprimento de onda, LOD – limite de deteção, LOQ – limite de quantificação, P – probabilidade, S – severidade e D – deteção.*

**I-4** – Inquéritos realizados à equipa de controlo de qualidade dos Laboratórios Edol – Produtos farmacêuticos, S.A.

| <b>Inquérito nº 4</b> |  |   |                              |          |   |
|-----------------------|--|---|------------------------------|----------|---|
|                       | <b>Falhas</b>  | <b>S</b>                                      | <b>P</b>                     | <b>D</b> |   |
| <b>Equipamento</b>    | <b>Preparação</b>  | Equipamento incorretamente limpo              | 6                            | 4        | 3 |
|                       |  | Equipamento incorretamente montado            | 8                            | 3        | 2 |
|                       |  | Operadores com pouca formação                 | 5                            | 3        | 2 |
|                       | <b>F.M</b>   | Inadequado grau pureza do tampão              | 6                            | 4        | 3 |
|                       |  | Alto ou baixo pH                              | 7                            | 5        | 5 |
|                       |  | Incorreta escolha do tampão                   | 10                           | 5        | 4 |
|                       |  | Incompatibilidade do solvente                 | 8                            | 4        | 3 |
|                       |  | Instabilidade do tampão                       | 8                            | 4        | 6 |
|                       |  | Inadequado gradiente da água                  | 7                            | 3        | 3 |
|                       |  | Inadequada Solução de lavagem                 | 5                            | 4        | 4 |
|                       |  | <b>Autosampler</b>                            | Inadequado volume de injeção | 9        | 4 |
|                       | Incorreta lavagem da agulha                              |   | 7                            | 4        | 3 |
|                       | Incorreta purga da agulha                                |   | 7                            | 4        | 4 |
|                       | Seleção incorreta da temperatura                         |   | 8                            | 3        | 4 |
|                       | <b>Bombas</b>  | Incorreto fluxo                               | 7                            | 5        | 2 |
|                       |  | Incorreta seleção dos parâmetros do gradiente | 7                            | 6        | 3 |
|                       |  | Incorreta purga das bombas                    | 6                            | 5        | 3 |
|                       | <b>Coluna</b>  | Varição da temperatura da coluna              | 7                            | 3        | 3 |
|                       |  | Varição da pressão da coluna                  | 8                            | 4        | 4 |
|                       |  | Seleção incorreta da temperatura              | 7                            | 5        | 3 |
| <b>Detector</b>       | Interferências no detetor ou variação do sinal           | 9   | 5                            | 4        |   |
|                       | Seleção incorreta do c.d.o                               | 10  | 3                            | 3        |   |
| <b>Lab</b>            | <b>Ambiente</b>  | Alta ou baixa temperatura                     | 5                            | 4        | 3 |
|                       |  | Alta ou baixa humidade                        | 5                            | 3        | 4 |
| <b>Resultados</b>     | Inadequada identificação do pico                         | 10  | 5                            | 3        |   |
|                       | Limites inadequados para os parâmetros                   | 8   | 4                            | 3        |   |
|                       | Estabelecimento inadequado de concentrações de LOD e LOQ | 8   | 4                            | 3        |   |
|                       | Run Time desadequado                                     | 8   | 3                            | 5        |   |
|                       | Limites de especificação de impureza incorretos          | 10  | 3                            | 2        |   |
|                       | Resultados Falsos  | 10  | 2                            | 2        |   |

*Em que F.M significa fase móvel, Lab – laboratório, c.d.o – comprimento de onda, LOD – limite de deteção, LOQ – limite de quantificação, P – probabilidade, S – severidade e D – deteção.*

Com recurso às classificações obtidas determinou-se o valor de RPN e de CRIT para cada um dos modos de falha, Tabela A.

**Tabela A** - FMEA para o desenvolvimento de um método analítico cromatográfico.

| Causas      | Modos de Falha                                | Severidade |      | Probabilidade |      | Deteção |      | RPN | CRIT |
|-------------|---|------------|------|---------------|------|---------|------|-----|------|
|             |   | M          | DP   | M             | DP   | M       | DP   |     |      |
| Preparação  | Equipamento incorretamente limpo              | 7          | 1,90 | 4             | 0,70 | 4       | 0,80 | 112 | 28   |
|             | Equipamento incorretamente montado            | 8          | 1,80 | 2             | 0,80 | 4       | 1,10 | 64  | 16   |
|             | Operadores com pouca formação                 | 6          | 2,60 | 2             | 0,40 | 2       | 1,20 | 24  | 12   |
| Fase Móvel  | Inadequado grau pureza do tampão              | 6          | 1,10 | 3             | 0,80 | 3       | 0,40 | 54  | 18   |
|             | Alto ou baixo pH                              | 7          | 0,70 | 5             | 1,20 | 5       | 2,20 | 175 | 35   |
|             | Incorreta escolha do tampão                   | 8          | 1,80 | 5             | 0,50 | 4       | 1,10 | 160 | 40   |
|             | Incompatibilidade do solvente                 | 8          | 1,40 | 4             | 1,10 | 3       | 1,10 | 96  | 32   |
|             | Instabilidade do tampão                       | 8          | 1,80 | 4             | 0,40 | 6       | 0,50 | 192 | 32   |
|             | Inadequado gradiente da água                  | 6          | 1,30 | 3             | 0,80 | 3       | 0,70 | 54  | 18   |
|             | Inadequada Solução de lavagem                 | 6          | 1,80 | 4             | 1,20 | 4       | 1,70 | 96  | 24   |
|             | Inadequado volume de injeção                  | 9          | 1,10 | 4             | 1,10 | 4       | 2,70 | 144 | 36   |
| Autosampler | Incorreta lavagem da agulha                   | 7          | 0,80 | 4             | 1,50 | 4       | 0,90 | 112 | 28   |
|             | Incorreta purga da agulha                     | 7          | 0,80 | 5             | 1,10 | 4       | 0,50 | 140 | 35   |
|             | Seleção incorreta da temperatura              | 7          | 0,80 | 4             | 0,80 | 4       | 1,80 | 112 | 28   |
| Bombas      | Fluxo incorreto                               | 8          | 1,80 | 5             | 0,80 | 3       | 2,30 | 120 | 40   |
|             | Incorreta seleção dos parâmetros do gradiente | 7          | 0,80 | 5             | 1,00 | 3       | 2,30 | 105 | 35   |

|            |  |    |      |   |      |   |      |     |    |
|------------|--|----|------|---|------|---|------|-----|----|
|            | Incorreta purga das bombas                               | 7  | 0,80 | 5 | 0,40 | 3 | 0,40 | 105 | 35 |
| Coluna     | Varição da temperatura da coluna                         | 6  | 1,50 | 3 | 1,10 | 2 | 0,80 | 36  | 18 |
|            | Varição da pressão da coluna                             | 8  | 0,40 | 5 | 1,80 | 4 | 1,70 | 160 | 40 |
|            | Seleção incorreta da temperatura                         | 7  | 1,10 | 4 | 0,40 | 3 | 1,60 | 84  | 28 |
|            | Interferências no detetor ou variação do sinal           | 9  | 0,50 | 4 | 1,50 | 5 | 2,20 | 180 | 36 |
| Detector   | Seleção incorreta do c.d.o                               | 10 | 0,90 | 3 | 0,70 | 4 | 2,70 | 120 | 30 |
|            | Alta ou baixa temperatura                                | 5  | 0,40 | 4 | 1,10 | 4 | 1,10 | 80  | 20 |
| Ambiente   | Alta ou baixa humidade                                   | 5  | 0,40 | 3 | 0,50 | 4 | 1,50 | 60  | 15 |
|            | Inadequada identificação do pico                         | 9  | 1,30 | 4 | 1,60 | 4 | 2,60 | 144 | 36 |
| Resultados | Limites inadequados para os parâmetros                   | 8  | 1,10 | 3 | 1,50 | 3 | 1,40 | 72  | 24 |
|            | Estabelecimento inadequado de concentrações de LOD e LOQ | 8  | 0,50 | 3 | 1,30 | 3 | 1,40 | 72  | 24 |
|            | Run Time desadequado                                     | 8  | 0,40 | 3 | 0,50 | 4 | 2,20 | 96  | 24 |
|            | Limites de especificação de impureza incorretos          | 10 | 0,90 | 3 | 1,10 | 2 | 0,40 | 60  | 30 |
|            | Resultados Falsos  | 9  | 1,30 | 2 | 0,80 | 2 | 1,10 | 36  | 18 |

*Em M significa média e o PD o desvio-padrão.*

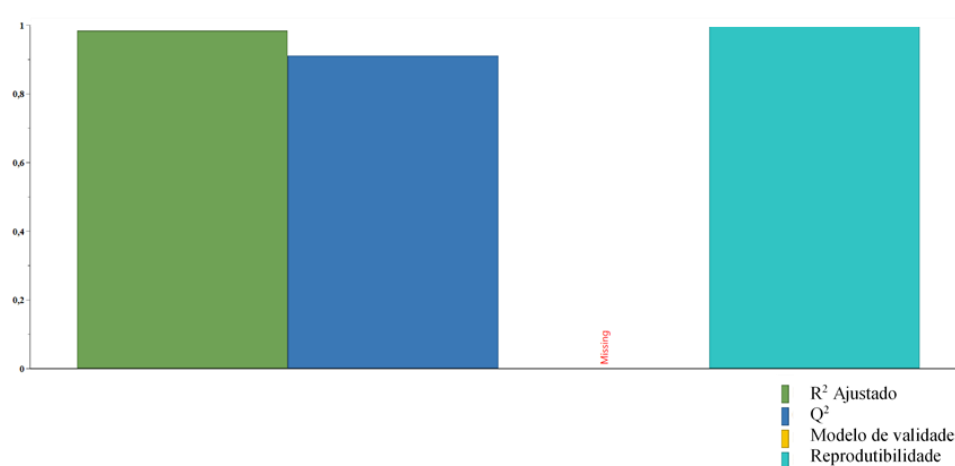
## 1.1.2. Modelos de Otimização

### 1.1.2.1. Fator de Simetria

O modelo de otimização para o fator de simetria foi obtido por uma modelação de regressão linear múltipla. O modelo de otimização correspondente ao fator de simetria necessitou de ajustes, de modo a obter parâmetros de ajuste dentro de especificação para um modelo significativo.

#### a) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

O modelo correspondente ao fator de simetria apresentava antes de sofrer qualquer ajuste valores de  $R^2$ ,  $Q^2$  e R bastante elevados, o que significava que o modelo podia ser significativo, Tabela B e Figura A . Contudo, não apresentava validade de modelo, uma vez que as replicas eram semelhantes, e consequentemente o erro puro não pode ser estimado.



**Figura A** - Representação gráfica do resumo dos parâmetros obtidos por modelação de regressão linear múltipla.

**Tabela B** - Resultados dos parâmetros estatísticos para modelo correspondente ao fator de simetria.

|                   | R <sup>2</sup> Ajustado | Q <sup>2</sup> | Reprodutibilidade |
|-------------------|-------------------------|----------------|-------------------|
| Fator de Simetria | 0,984                   | 0,912          | 1                 |

$R^2$  - coeficiente de regressão;  $Q^2$  - coeficiente preditivo.

Os valores obtidos são positivos, contudo podem ser melhorados com pequenas alterações, como por exemplo a alteração do tipo de transformação matemática e a eliminação de *outliers*. Contudo, para decidir o ajuste é necessário avaliar outros

parâmetros, nomeadamente a interação entre os fatores e o seu significado, a probabilidade residual normal e a relação entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo.

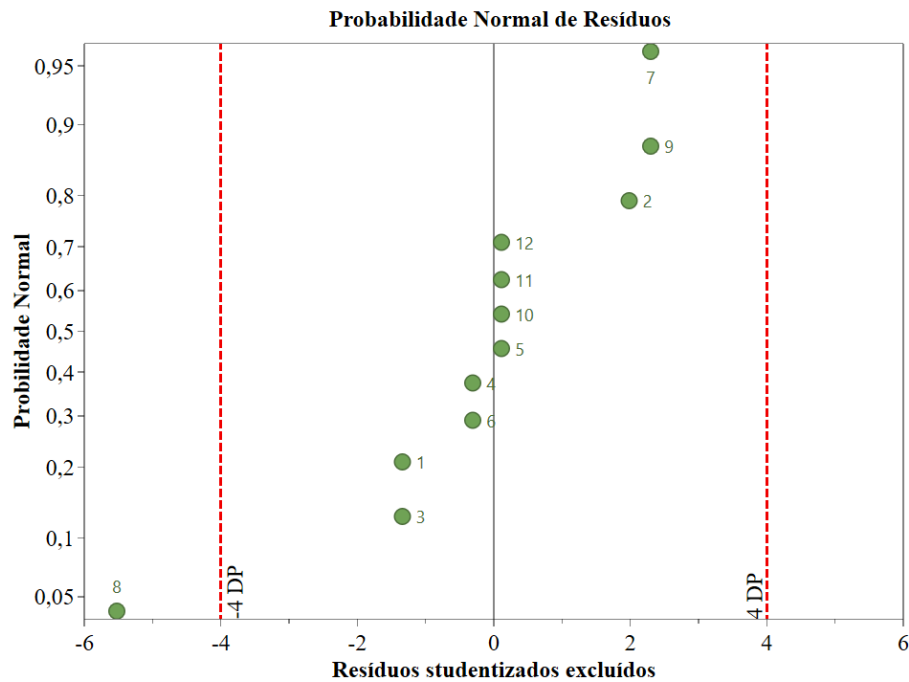
**Tabela C** - Valores estatísticos obtidos na análise dos coeficientes. O valor a azul significa que este coeficiente não é significativo para o modelo.

| Fator de Simetria         | Coef. CS | DP   | P                                       | Intervalo de confiança ( $\pm$ ) |
|---------------------------|----------|------|---|----------------------------------|
| Constante                 | 1,37     | 0,01 | $9,99 \times 10^{-12}$                  | 0,02                             |
| Proporção de acetonitrilo | -0,14    | 0,01 | $4,18 \times 10^{-6}$                   | 0,02                             |
| Volume de Injeção         | 0,15     | 0,01 | $3,40 \times 10^{-6}$                   | 0,02                             |
| ACN*ACN                   | 0,04     | 0,01 | $3,08 \times 10^{-2}$                   | 0,03                             |
| V.Inj*V.Inj               | -0,01    | 0,01 | <b><math>5,94 \times 10^{-1}</math></b> | 0,03                             |
| ACN*V.Inj                 | -0,14    | 0,01 | $1,37 \times 10^{-5}$                   | 0,03                             |

*Em que, Coef.CS significa coeficientes (em escala e centralizado), DP – desvio-padrão P - Probabilidade de significância, ACN – acetonitrilo e V.inj – volume de injeção. O valor a azul significa que este coeficiente não é significativo para o modelo.*

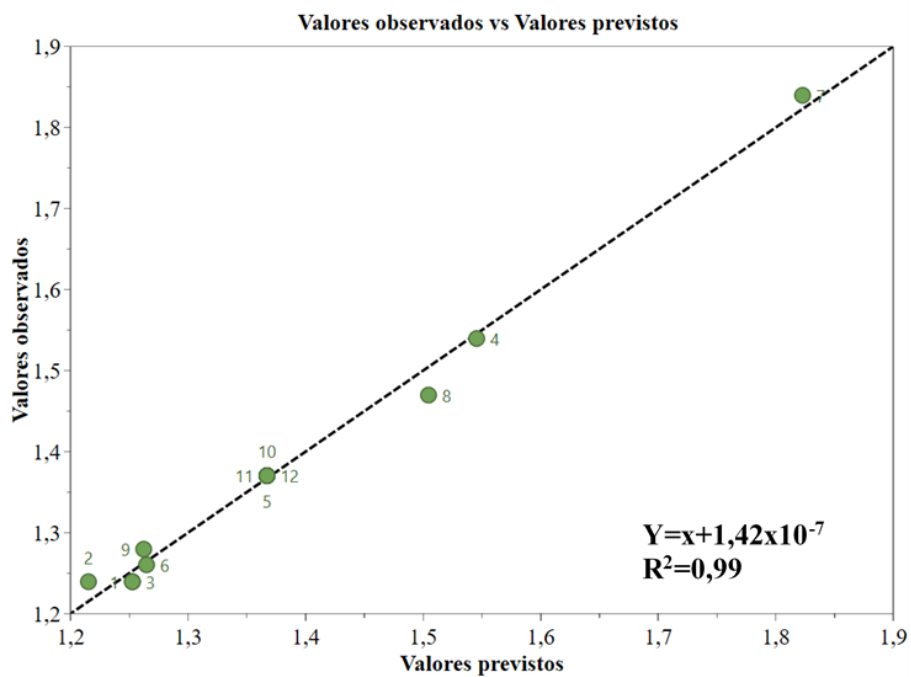
Os valores de probabilidade obtidos, Tabela C, mostram que a interação entre o volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) e o próprio não apresentam significado estatístico, logo se for necessário ajuste pode ser retirado.

Relativamente à análise de probabilidade residual normal, esta mostra a existência de possíveis *outliers*, quando o valor destes é mais ou menos 4 vezes o desvio-padrão, como na Figura B.



**Figura B** - Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da probabilidade normal de resíduos. Em que DP significa desvio padrão.

Esta Figura mostra a existência de um possível *outliers*, contudo a sua confirmação deve incluir o estudo dos valores observados *versus* os valores previstos, Figura C.



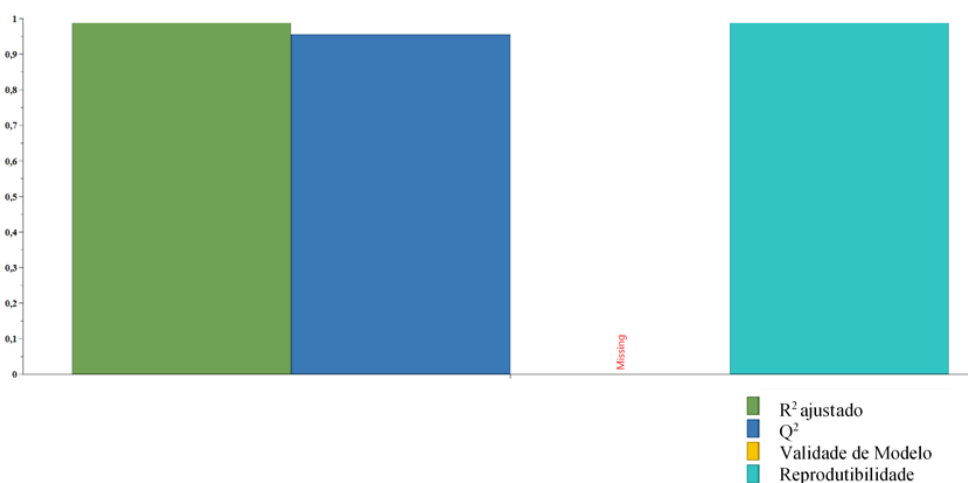
**Figura C** - Representação gráfica dos valores observados vs valores previstos

Os resultados obtidos, Figura C, mostram que a experiência 8 localiza-se próximo da linha que descreve os valores previstos, logo este valor não deve ser retirado. Quando se retira uma experiência o erro aumenta, uma vez que o número de experiências é reduzido.

Tendo em conta a análise de todos os gráficos e tabelas, determinou-se que as alterações que iriam ser realizadas eram a transformação matemática e a remoção da interação não significativa. O possível *outlier* não foi retirado pela razão anteriormente apresentada. A alteração da transformação irá permitir melhorar os parâmetros estatísticos correspondentes a esta resposta.

### b) Ajuste do modelo

Posteriormente aos ajustes, os valores dos parâmetros estatísticos melhoraram, sendo que o coeficiente de regressão e o preditivo melhoraram 0,30% e 4,59%, respetivamente. Contudo o valor de reprodutibilidade não se alterou, Figura D e Tabela D.



**Figura D** - Representação gráfica do resumo dos parâmetros obtidos por modelação de regressão linear múltipla após o ajuste.

**Tabela D** - Resultados dos parâmetros estatísticos para modelo correspondente à fator de simetria após o ajuste.

|                          | R <sup>2</sup> Ajustado | Q <sup>2</sup> | Reprodutibilidade |
|--------------------------|-------------------------|----------------|-------------------|
| <b>Fator de Simetria</b> | 0,987                   | 0,956          | 1                 |

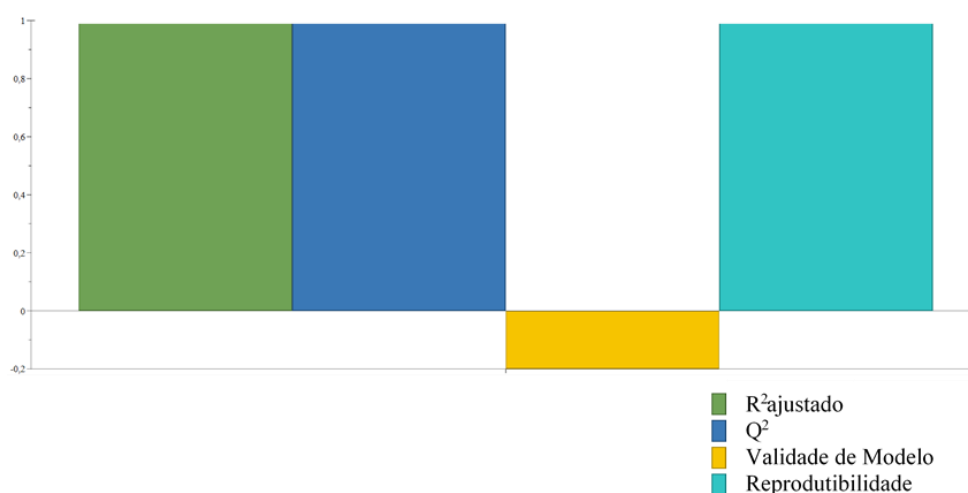
*R<sup>2</sup>* - coeficiente de regressão; *Q<sup>2</sup>* - coeficiente preditivo.

### 1.1.2.2. Tempo de Retenção

Assim como no fator de simetria, este modelo sofreu uma modelação matemática de regressão linear múltipla. Este também sofre transformações, de modo a melhorar os parâmetros estatísticos.

#### a) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

Os parâmetros obtidos para este modelo apresentaram valores positivos próximos do valor ótimo, com exceção da validade do modelo, Tabela E e Figura E. O resultado para a validade do modelo é um valor negativo, -0,20, o que significa que o modelo precisa de ajuste ou que os valores das replicas são extremamente semelhantes.



**Figura E** - Representação gráfica do resumo dos parâmetros obtidos por modelação de regressão linear múltipla.

**Tabela E** - Resultados dos parâmetros estatísticos para modelo correspondente ao tempo de retenção

|                          | R <sup>2</sup> Ajustado | Q <sup>2</sup> | Validade de Modelo | Reprodutibilidade |
|--------------------------|-------------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| <b>Tempo de Retenção</b> | 0,999                   | 0,999          | -0,20              | 0,999             |

*R<sup>2</sup> - coeficiente de regressão; Q<sup>2</sup> - coeficiente preditivo.*

Com referido anteriormente, é necessário o estudo da probabilidade residual normal e da relação entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo, para se retirar conclusões sobre os ajustes ao modelo.

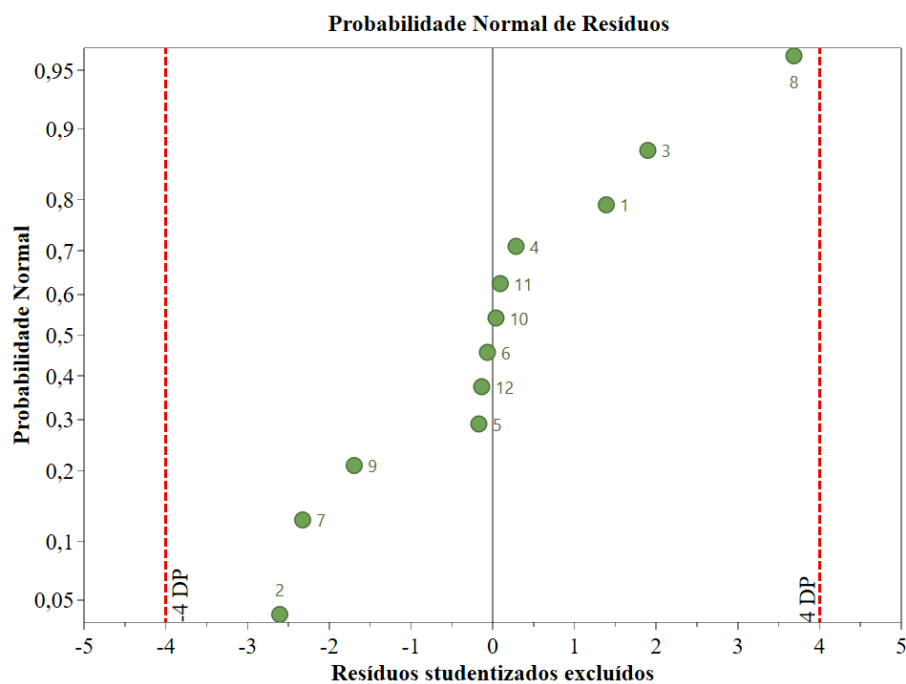
Em relação à análise das interações entre os fatores e o seu significado verificou, assim como no modelo anterior, que termo quadrático do volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) não era significativo para o modelo, Tabela F. Conseqüentemente, este termo pode ser retirado do modelo, se a sua remoção justificar um melhor ajuste do mesmo.

**Tabela F** - Valores estatísticos obtidos na análise dos coeficientes.

| <b>Fator de Simetria</b>         | <b>Coef. CS</b> | <b>DP</b> | <b>P</b>                                | <b>Intervalo de confiança (<math>\pm</math>)</b> |
|----------------------------------|-----------------|-----------|---|--|
| <b>Constante</b>                 | 6,74            | 0,03      | $4,29 \times 10^{-13}$                  | 0,07   |
| <b>Proporção de acetonitrilo</b> | -9,08           | 0,03      | $3,68 \times 10^{-14}$                  | 0,06   |
| <b>Volume de Injeção</b>         | -0,13           | 0,03      | $2,75 \times 10^{-3}$                   | 0,06   |
| <b>ACN*ACN</b>                   | 5,83            | 0,04      | $5,99 \times 10^{-12}$                  | 0,10   |
| <b>V.Inj*V.Inj</b>               | -0,01           | 0,04      | <b><math>8,58 \times 10^{-1}</math></b> | 0,10   |
| <b>ACN*V.Inj</b>                 | 0,17            | 0,0       | $1,52 \times 10^{-3}$                   | 0,08   |

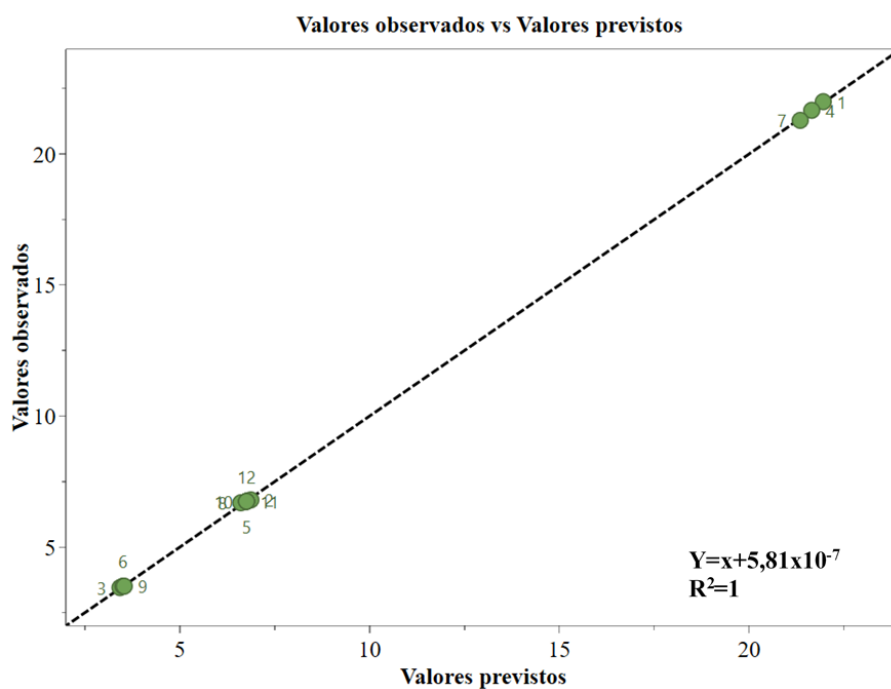
*Em que, Coef.CS significa coeficientes (em escala e centralizado), DP – desvio-padrão P - Probabilidade de significância, ACN – acetonitrilo e V.inj – volume de injeção. O valor a azul significa que este coeficiente não é significativo para o modelo.*

A análise de probabilidade residual normal demonstrou que para este modelo de resposta não existiam possíveis *outliers*, uma vez que os valores obtidos para cada experiência estão entre  $-4\text{DP}$  e  $4\text{DP}$ , Figura F.



**Figura F** - Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da probabilidade normal de resíduos. Em que DP significa desvio padrão.

A análise dos valores observados *versus* os previsto permitiu verificar que os valores observados localizam-se sobre a reta de previsão, deste modo confirma-se a não existência de *outliers*, Figura G.

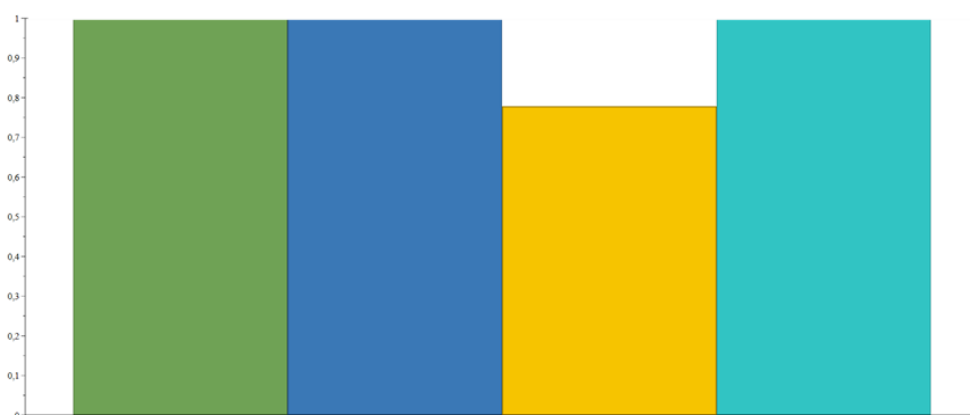


**Figura G** - Representação gráfica dos valores observados vs valores previstos.

Considerando todas as análises realizadas, definiu-se que a única alteração que se iria efetuar era a alteração da transformação matemática, de modo a melhorar os parâmetros estatísticos.

### b) Ajuste do modelo

Após os ajustes considerados, o único parâmetro que sofre alterações foi a validade do modelo, que passou de -0,200 para 0,778, Figura H e Tabela G.



**Figura H** - Representação gráfica do resumo dos parâmetros obtidos por modelação de regressão linear múltipla, após reajustes.

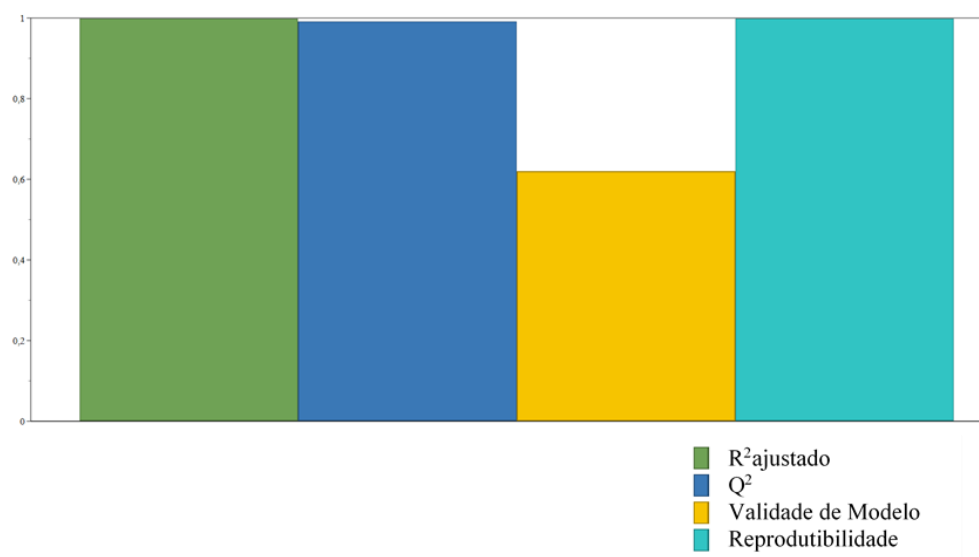
**Tabela G** - Resultados dos parâmetros estatísticos para modelo correspondente ao tempo de retenção após reajustes.

|                          | R <sup>2</sup> Ajustado | Q <sup>2</sup> | Validade de Modelo | Reprodutibilidade |
|--------------------------|-------------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| <b>Tempo de Retenção</b> | 0,99                    | 0,99           | 0,78               | 0,99              |

*R<sup>2</sup> - coeficiente de regressão; Q<sup>2</sup> - coeficiente preditivo.*

#### 1.1.2.3. Pratos teóricos

À semelhança dos outros dois modelos de resposta, este também é uma modelação matemática de regressão linear múltipla. No entanto, este modelo foi o único que não sofreu alterações, que visavam a obtenção de melhores parâmetros estatísticos. Os parâmetros obtidos foram positivos e próximos dos valores ótimos, Figura I e Tabela H.



**Figura I** - Representação gráfica do resumo dos parâmetros obtidos por modelação de regressão linear múltipla,

**Tabela H** - Resultados dos parâmetros estatísticos para modelo correspondente aos pratos teóricos.

|                        | R <sup>2</sup> Ajustado | Q <sup>2</sup> | Validade de Modelo | Reprodutibilidade |
|------------------------|-------------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| <b>Pratos teóricos</b> | 0,998                   | 0,992          | 0,619              | 0,999             |

*R<sup>2</sup> - coeficiente de regressão; Q<sup>2</sup> - coeficiente preditivo.*

Embora os parâmetros sejam positivos, é necessário avaliar a probabilidade residual normal e a relação entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo.

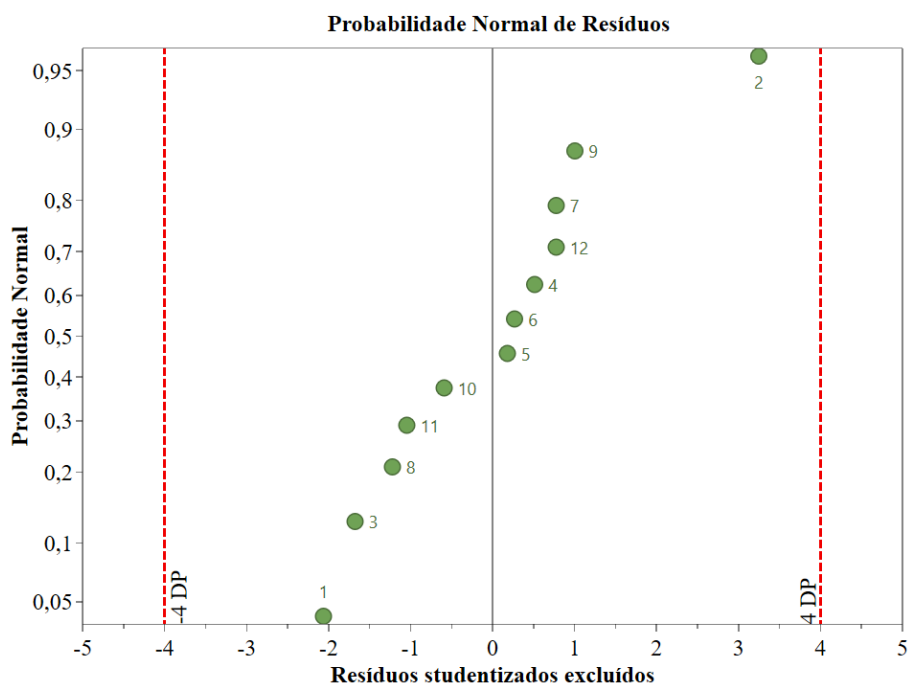
Relativamente às interações entre fatores observou-se que como no modelo do fator de simetria, a interação entre o volume de injeção ( $\mu\text{L}$ ) e o termo quadrático do próprio não era significativo para o modelo, Tabela I.

**Tabela I** - Valores estatísticos obtidos na análise dos coeficientes. O valor a azul significa que este coeficiente não é significativo para o modelo.

| Pratos teóricos           | Coeff. CS | DP    | P                      | Intervalo de confiança (±) |
|---------------------------|-----------|-------|------------------------|----------------------------|
| Constante                 | 5037,87   | 18,63 | $1,73 \times 10^{-13}$ | 45,59                      |
| Proporção de acetonitrilo | -984,33   | 16,66 | $1,58 \times 10^{-9}$  | 40,77                      |
| Volume de Injeção         | -571,50   | 16,66 | $4,09 \times 10^{-8}$  | 40,77                      |
| ACN*ACN                   | 437,87    | 24,99 | $2,22 \times 10^{-6}$  | 61,16                      |
| V.Inj*V.Inj               | 41,37     | 24,99 | <b>0,15</b>            | 61,16                      |
| ACN*V.Inj                 | 425,00    | 20,41 | $7,98 \times 10^{-7}$  | 49,94                      |

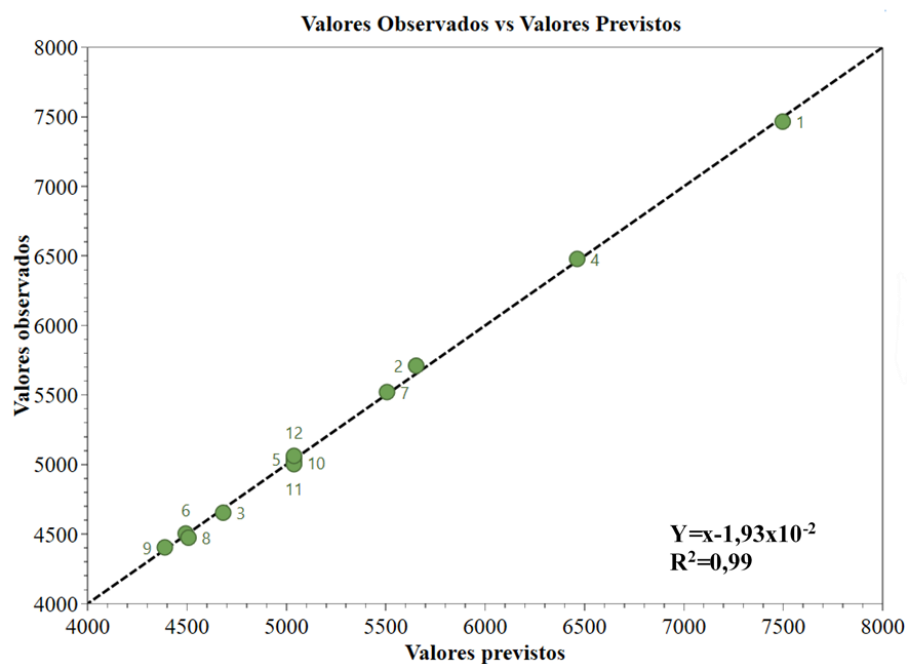
Em que, Coef.CS significa coeficientes (em escala e centralizado), DP – desvio-padrão P - Probabilidade de significância, ACN – acetonitrilo e V.inj – volume de injeção. O valor a azul significa que este coeficiente não é significativo para o modelo.

Esta interação podia ser retirada do modelo, contudo neste modelo não houve qualquer alteração realizada. A análise de probabilidade residual normal determinou que este modelo de resposta não apresentava *outliers*, Figura J, logo este modelo não necessita não necessita de ajuste.



**Figura J** - Representação gráfica dos resultados obtidos na análise da probabilidade normal de resíduos. Em que DP significa desvio padrão.

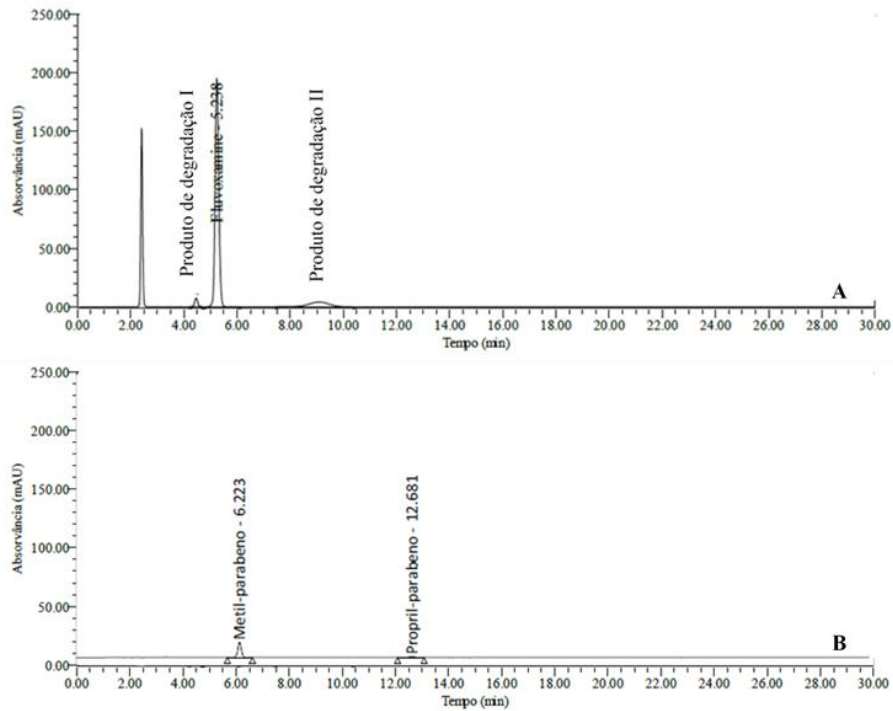
Seguidamente, a análise dos valores observados versus o previsto foi analisada e verificou-se a ausência de *outliers*, Figura K.



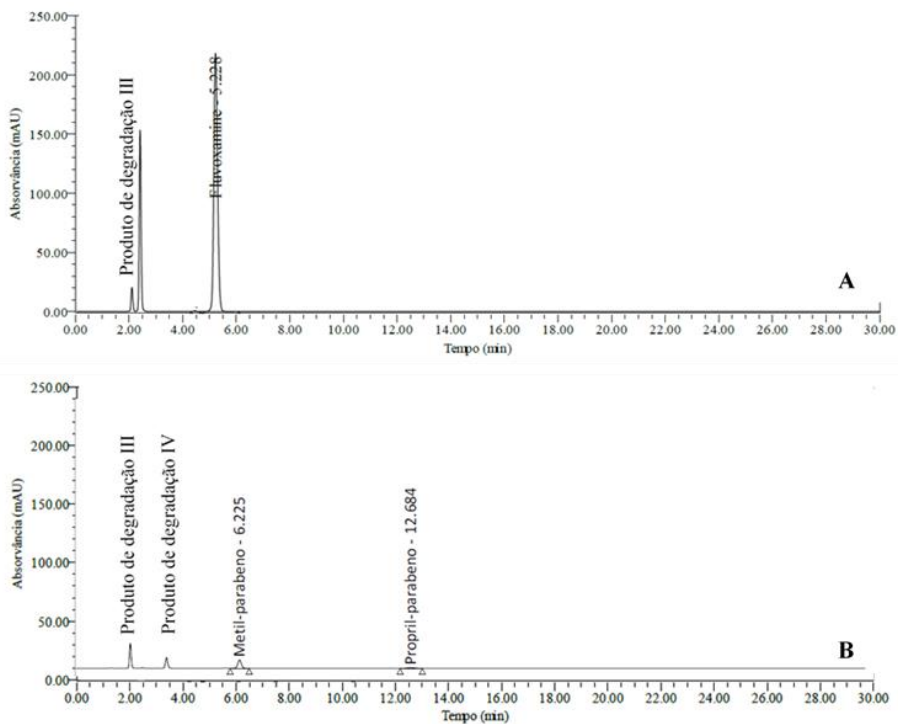
**Figura K** - Representação gráfica dos valores observados vs valores previstos.

## 1.2. Estudos de degradação forçada

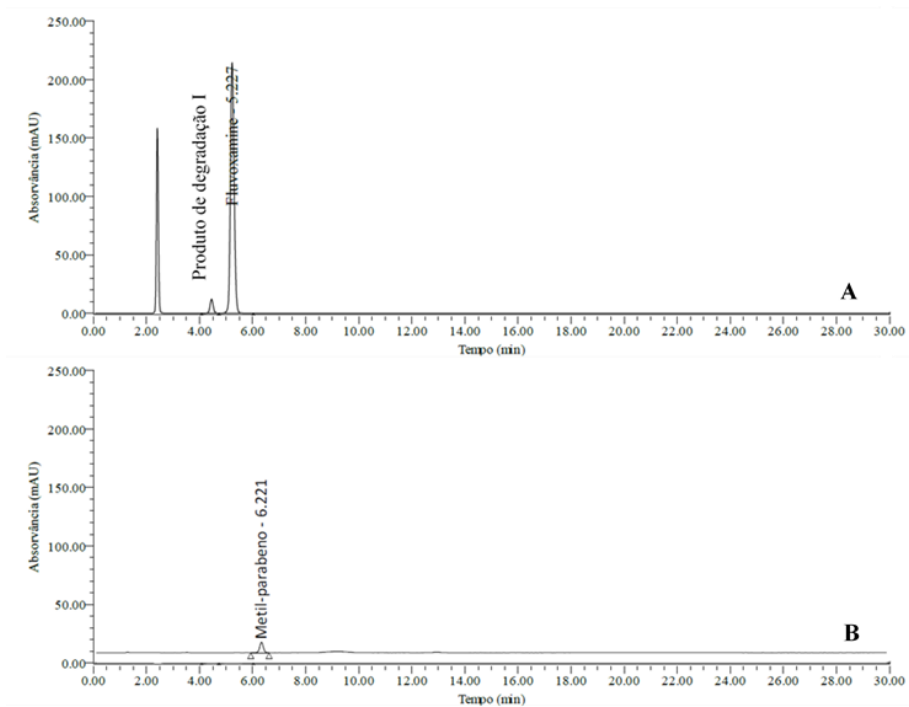
Os estudos de degradação forçada avaliados em três soluções, solução com SA, solução com formulação e placebo. As figuras que se seguem representam os cromatogramas das soluções de SA e placebo.



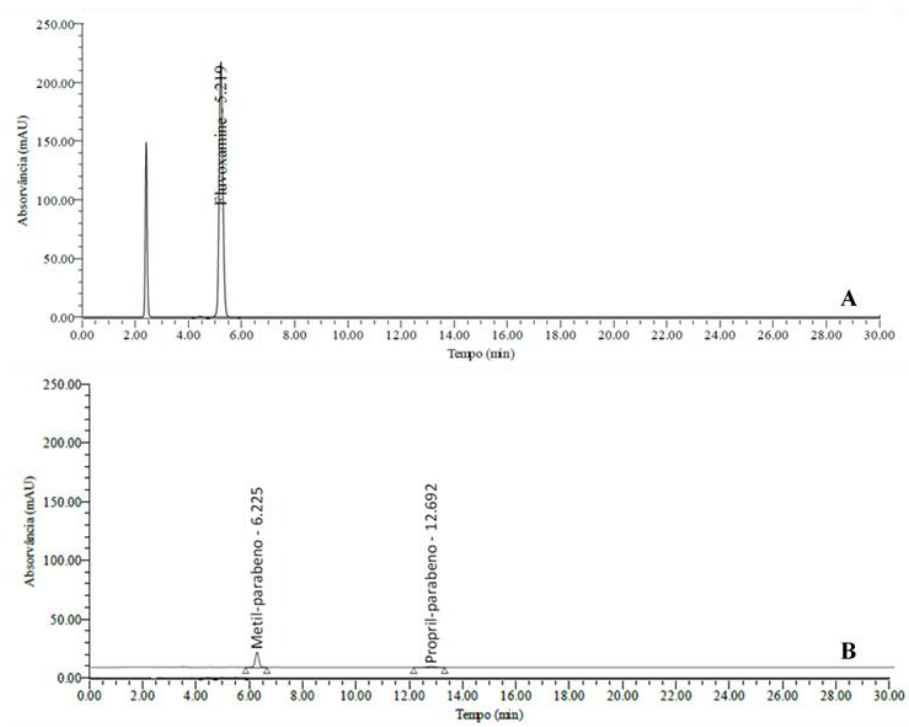
**Figura L** - A: Cromatograma do ensaio de degradação por meio ácido correspondente à solução de fluvoxamina e B: Cromatograma do ensaio de degradação por meio ácido correspondente à solução de placebo.



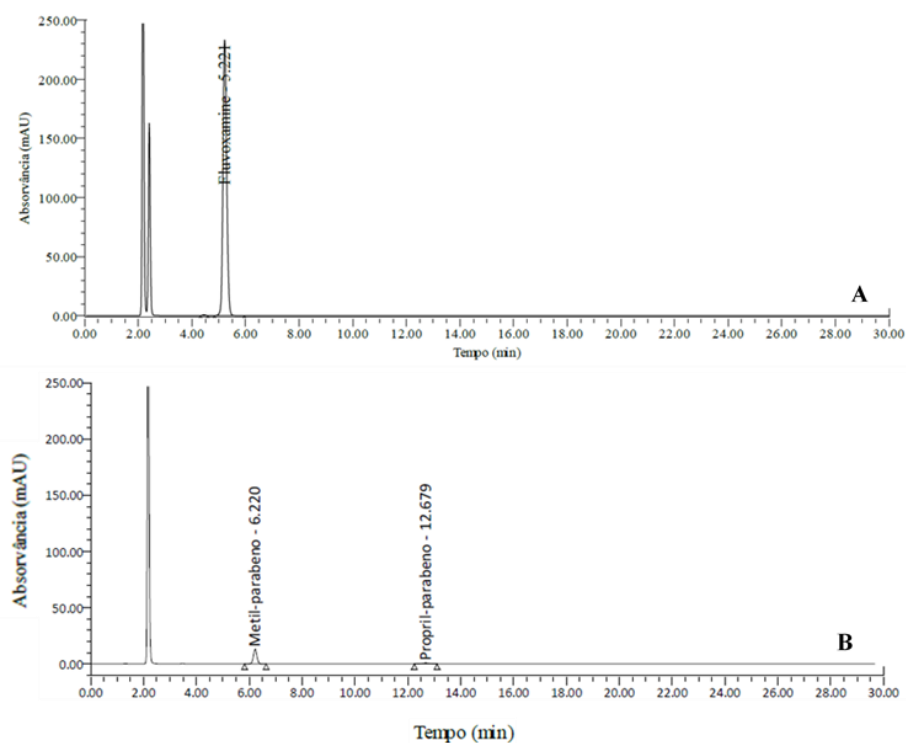
**Figura M** - A: Cromatograma do ensaio de degradação por meio básico correspondente à solução de fluvoxamina e B: Cromatograma do ensaio de degradação por meio básico correspondente à solução de placebo.



**Figura N** - A: Cromatograma do ensaio de degradação térmica correspondente à solução de fluvoxamina e B: Cromatograma do ensaio de degradação térmica correspondente à solução de placebo.



**Figura O** - A: Cromatograma do ensaio de degradação fotolítica correspondente à solução de fluvoxamina e B: Cromatograma do ensaio de degradação fotolítica correspondente à solução de placebo.



**Figura P** - A: Cromatograma do ensaio de degradação por meio oxidativo correspondente à solução de fluvoxamina e B: Cromatograma do ensaio de degradação por meio oxidativo correspondente à solução de placebo.

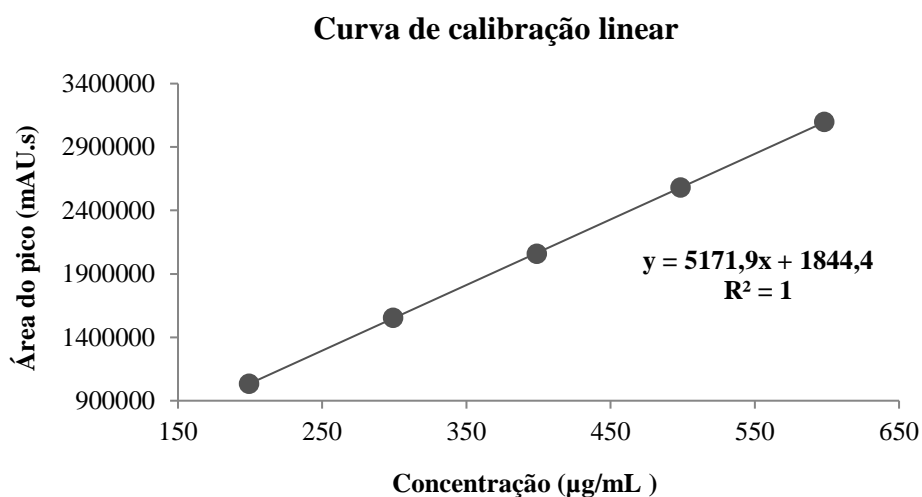
### 1.3. Validação do método analítico por HPLC para a quantificação de fluvoxamina

A validação de um método analítico inclui a análise de diferentes parâmetros. As tabelas e figuras que se seguem demonstram os resultados obtidos em alguns desses parâmetros. As Tabelas J, K, L e M e as Figuras Q e R representam os resultados da linearidade. Os resultados da gama de trabalho encontram-se representados na Tabela N. Os resultados obtidos na precisão encontram-se sumarizados nas Tabelas O e P.

**Tabela J** - Resultados da linearidade obtidos na validação do método de quantificação de fluvoxamina com base na curva de calibração.

| Nível de concentração (%)             | 50%       | 75%       | 100%      | 125%      | 150%      |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Média da área do pico (mAU.s)         | 1 032 682 | 1 553 401 | 2 057 986 | 2 580 717 | 3 097 220 |
| DP                                    | 2084,05   | 514,66    | 5045,79   | 4204,89   | 4214,05   |
| CV (%)                                | 0,20      | 0,03      | 0,25      | 0,16      | 0,14      |
| Concentração (ug/ml)                  | 199       | 299       | 399       | 499       | 598       |
| Concentração obtida pela reta (ug/ml) | 199,31    | 300,00    | 397,56    | 498,63    | 598,50    |
| % Recuperação                         | 99,96     | 100,30    | 99,69     | 100,03    | 100,05    |

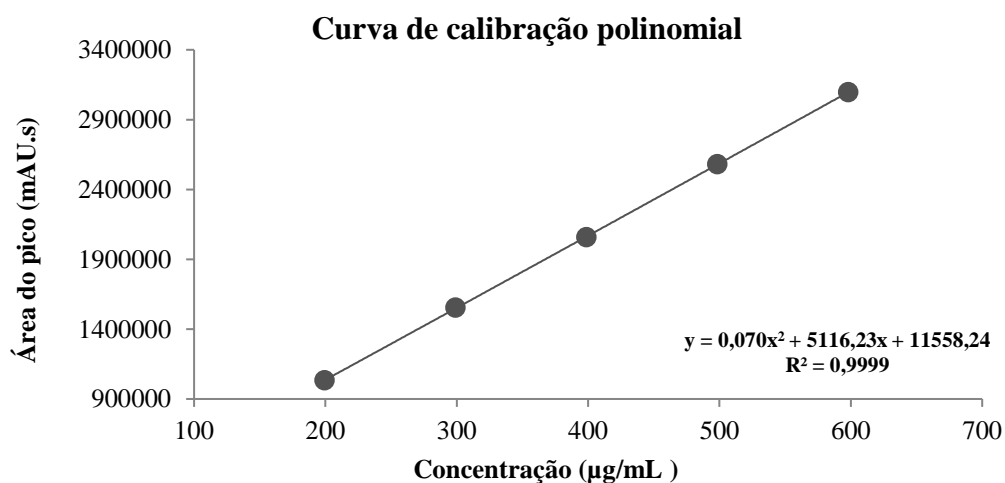
Em que DP significa desvio padrão e CV – coeficiente de variação.



**Figura Q** - Representação gráfica da reta de regressão linear das áreas do pico (mAU.s) em função da concentração (µg/mL) de fluvoxamina.

**Tabela K** - Resultados da linearidade obtidos na validação do método de quantificação de fluvoxamina com base no teste de Mandel.

| Concentração (ug/ml) | Média da área do pico (mAU.s) (Yi) | Sinal de ajuste linear (Ypi) | Sinal de ajuste polimomial (Ypi) |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 199,40               | 1 032 682                          | 1 033 123                    | 1 034 511                        |
| 299,10               | 1 553 401                          | 1 548 762                    | 1 548 068                        |
| 398,80               | 2 057 986                          | 2 064 401                    | 2 063 014                        |
| 498,50               | 2 580 717                          | 2 580 040                    | 2 579 347                        |
| 598,20               | 3 097 220                          | 3 095 680                    | 3 097 067                        |



**Figura R** - Representação gráfica da reta de regressão polinomial das áreas do pico (mAU.s) em função da concentração (µg/mL) de fluvoxamina.

**Tabela L** - Resultados dos ajuste linear e polinomial para o teste de Mandel para a validação do método de quantificação de fluvoxamina.

|                          |                       |                     |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>Ajuste Linear</b>     | (i)                   | (y-yi) <sup>2</sup> |
|                          | 1                     | 194 316,39          |
|                          | 2                     | 21 520 011,73       |
|                          | 3                     | 41 153 336,94       |
|                          | 4                     | 457 688,33          |
|                          | 5                     | 2 372 852,70        |
|                          | <b>Soma</b>           | 65 698 206,10       |
|                          | <b>N-2</b>            | 3                   |
| $S_{y/x}$                | 4679,68               |                     |
| <b>Ajuste Polinomial</b> | (i)                   | (y-yi) <sup>2</sup> |
|                          | 1                     | 3 343 443,60        |
|                          | 2                     | 28 438 908,21       |
|                          | 3                     | 25 274 664,58       |
|                          | 4                     | 1 877 925,68        |
|                          | 5                     | 23 320,78           |
|                          | <b>Soma</b>           | 58 958 262,84       |
|                          | <b>N-3</b>            | 2                   |
| $S_{(y/x)^2}$            | 5 429,47              |                     |
| <b>Resultados</b>        | <b>DS<sup>2</sup></b> | 6 739 943,26        |
|                          | <b>VT</b>             | 0,23                |
|                          | <b>F</b>              | 10,13               |

Em que  $N$  significa o  $n^{\circ}$  número de concentrações estudadas,  $S(y/x)$  - desvio padrão residual do ajuste polinomial de 1<sup>o</sup> grau,  $S_{(y/x)^2}$  - Desvio padrão residual do ajuste polinomial de 2<sup>o</sup> grau,  $SD^2$  – diferença de variâncias,  $VT$  – valor de teste,  $F$  - Teste de Snedecor/Fisher.

**Tabela M** - Resultados obtidos através da análise de resíduos na validação do método de quantificação de fluvoxamina.

| (i) | Concentração (µg/mL) | Área do pico (mAU.s) | Área do pico estimada (mAU.s) | Resíduos |
|-----|----------------------|----------------------|-------------------------------|----------|
| 1   | 199                  | 1032682              | 1033122,81                    | -0,04    |
| 2   | 299                  | 1553401              | 1548762,03                    | 0,30     |
| 3   | 399                  | 2057986              | 2064401,25                    | -0,31    |
| 4   | 499                  | 2580717              | 2580040,47                    | 0,03     |
| 5   | 598                  | 3097220              | 3095679,69                    | 0,05     |

**Tabela N** - Resultados obtidos da homogeneidade de variâncias para o estudo da gama de trabalho para validação do método de quantificação de fluvoxamina.

| <b>Concentração (ug/mL)</b> | 199        | 598         |
|-----------------------------|------------|-------------|
|                             | 1031677    | 3091376     |
|                             | 1029185    | 3088817     |
|                             | 1030670    | 3096602     |
|                             | 1030743    | 3099956     |
| <b>Área do pico (mUA.s)</b> | 1032711    | 3102777     |
|                             | 1032821    | 3096406     |
|                             | 1034314    | 3098167     |
|                             | 1034409    | 3098749     |
|                             | 1035494    | 3099253     |
|                             | 1034796    | 3100098     |
| <b>Média</b>                | 1032682    | 3097220     |
| <b>DP</b>                   | 2065,30    | 4214,05     |
| <b>DP relativo (%)</b>      | 0,20       | 0,14        |
| <b>Variância</b>            | 4265475,36 | 17758203,66 |
| <b>PG</b>                   |            | 4,16        |
| <b>F</b>                    |            | 5,35        |

Em que DP significa desvio-padrão, PG – Progressão linear e F - Teste de Snedecor/Fisher.

**Tabela O** - Resultados obtidos para a repetibilidade na validação do método de quantificação de fluvoxamina.

| <b>Amostra</b>               | <b>1</b>  | <b>2</b>  | <b>3</b>  | <b>4</b>  | <b>5</b>  | <b>6</b>  |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Áreas do pico (mAU.s)</b> | 2 154 662 | 2 192 294 | 2 176 816 | 2 164 817 | 2 162 522 | 2 156 892 |
|                              | 2 143 722 | 2 211 758 | 2 142 818 | 2 165 160 | 2 153 594 | 2 149 491 |
|                              | 2 163 603 | 2 204 411 | 2 172 255 | 2 172 233 | 2 165 134 | 2 158 964 |
| <b>Média</b>                 | 2 153 996 | 2 202 821 | 2 163 963 | 2 167 403 | 2 160 417 | 2 155 116 |
| <b>DP</b>                    | 9957,24   | 9828,93   | 18453,56  | 4186,13   | 6051,22   | 4980,06   |
| <b>CV (%)</b>                | 0,46      | 0,45      | 0,85      | 0,19      | 0,28      | 0,23      |
| <b>Massa amostra (g)</b>     | 0,8001    | 0,8087    | 0,8017    | 0,8081    | 0,8050    | 0,8010    |
| <b>Con. amostra (µg/mL)</b>  | 400,05    | 404,35    | 400,85    | 404,05    | 402,50    | 400,50    |
| <b>Teor da amostra (%)</b>   | 102,29    | 103,50    | 102,56    | 101,91    | 101,9697  | 102,23    |

Em que DP significa desvio padrão e CV – coeficiente de variação.

**Tabela P** -Resultados obtidos para a precisão intermédia na validação do método de quantificação de fluvoxamina.

| <b>Amostra</b>               | <b>1</b> | <b>2</b>  | <b>3</b>  | <b>4</b>  | <b>5</b>  | <b>6</b>  |
|------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Áreas do pico (mAU.s)</b> | 1839206  | 2 048 179 | 2 051 124 | 2 049 637 | 2 124 958 | 2 131 683 |
|                              | 1862445  | 2 051 989 | 2 051 789 | 2 060 676 | 2 116 376 | 2 123 591 |
|                              | 1905374  | 2 074 257 | 2 045 190 | 2 084 770 | 2 156 204 | 2 172 307 |
| <b>Média</b>                 | 1869008  | 2 058 142 | 2 049 368 | 2 065 028 | 2 132 513 | 2 142 527 |
| <b>DP</b>                    | 33568,72 | 14085,70  | 3633,21   | 17966,21  | 20961,21  | 26105,68  |
| <b>CV (%)</b>                | 1,80     | 0,68      | 0,18      | 0,87      | 0,98      | 1,22      |
| <b>Massa amostra (g)</b>     | 0,7700   | 0,8394    | 0,8190    | 0,8219    | 0,8516    | 0,8672    |
| <b>Conc. amostra (µg/mL)</b> | 387,30   | 419,7     | 409,5     | 410,95    | 425,80    | 433,60    |
| <b>Teor da amostra (%)</b>   | 97,98    | 99,57     | 101,61    | 102,03    | 101,69    | 100,33    |

*Em que DP significa desvio padrão e CV – coeficiente de variação.*