



DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE HPLC NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Introdução

A técnica de HPLC é largamente utilizada na indústria farmacêutica. O uso de HPLC inclui acompanhamento de produção, controle de qualidade de matérias primas, testes de estabilidade e estudos de impurezas. O Centro de Avaliação e Pesquisa de Drogas (CDER) publicou um guia (3) que trata sobre assuntos relevantes à prática da técnica de HPLC. O ICH publicou um documento que serve como guia para realização de testes de especificação e critérios de aceitação para novas drogas. Esse documento classificou a técnica de HPLC como “Teste Universal” (4).

Testes de Procedimentos Analíticos

Um procedimento analítico é definido como: “O procedimento analítico se refere à maneira de realizar a análise. Ele deve descrever em detalhes as etapas necessárias para efetuar cada teste analítico. Deve incluir, mas não está limitado a: a amostra, o padrão de referência e ao preparo dos reagentes, uso do equipamento, geração da curva de calibração, uso de fórmulas para os cálculos necessários, etc”. O procedimento analítico pode ser referido como Procedimento Operacional Padrão (POP) ou método analítico de HPLC. Os testes mostrados abaixo devem fazer parte do procedimento analítico como parâmetros necessários ao desenvolvimento e validação:

- Testes de identificação
- Testes quantitativos para determinação de impurezas
- Testes de identificação e quantificação de enantiômeros
- Testes de limites para controle de impurezas
- Testes quantitativos de umidade em matérias primas e produtos acabados

Um procedimento analítico deve sempre ser desenvolvido com propósitos bem claros em mente. Os quatro tipos de testes citados acima devem ser usados para diferentes propósitos. Para uso em análise de matéria prima, produtos acabados, substâncias relacionadas e impurezas, o procedimento deve ser validado antes de ser usado. O objetivo da validação de procedimentos analíticos visam “demonstrar que o método é apropriado para seus propósitos” (1). Se o método não atender aos critérios de aceitação de um ou mais parâmetros de validação, ele não é apropriado para seus propósitos analíticos.

Cinco etapas de desenvolvimento analítico



- Definir o problema
- Testes com variáveis chave
- Avaliação
- Otimização
- Resolução de problemas

1. Definição de Problemas

- levantar a estrutura ou estruturas químicas e dados físico-químicos das substâncias que se deseja analisar;
- pesquisa bibliográfica das substâncias químicas (referências, farmacopéias, etc);
- aquisição de padrões primários e/ou secundários;
- tipo de metodologia a ser desenvolvida (teor matéria-prima ou produto acabado, dissolução, etc.).

2. Testes com variáveis chave

- em caso de existirem metodologias já elaboradas descritas na literatura ou farmacopéia, fazer testes de reprodução nas mesmas condições analíticas descritas;
- não havendo dados em literatura, seguir os seguintes passos:

2.1. Testes para preparo de amostras e padrões

- . Definir solubilidade da(s) substância química em função de suas propriedades físico-químicas. Se possível usar solventes que devam ser usados na composição da fase móvel.
- . Fazer ensaios de extração do analito com o solvente (tempo de ultra-som, uso de temperatura, agitação, etc.).
- . Definir diluições de modo que a amostra tenha uma concentração de analito ideal para a análise.

2.2. Testes para definir modo de detecção

Após definir o preparo de amostras e padrões e suas concentrações, o modo de detecção deve ser estabelecido:

- . Identificar na estrutura da substância química a presença de cromóforos. Caso existam, optar pela detecção de Ultra-Violeta. Em caso negativo, estudar possibilidades de detectores eletroquímicos, por índice de difração, fluorescência, etc.
- . Em caso de opção pela detecção por Ultra-Violeta, fazer testes de absorção máxima para se definir o comprimento de onda onde serão feitas as leituras. Estes testes podem ser realizados com o uso de detectores DAD e visualização de cromatogramas do tipo:

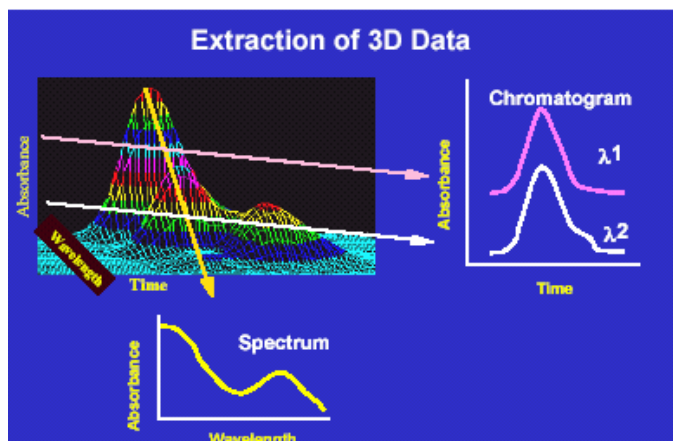


Fig.1. Neste cromatograma 3D observa-se duas absorções principais para uma dada substância. No comprimento de onda λ_1 tem-se uma absorção máxima e de melhor definição, portanto esse comprimento de onda pode ser utilizado para essa substância.

2.3. Testes de coluna

Os tipos mais comuns de colunas utilizadas são do tipo:

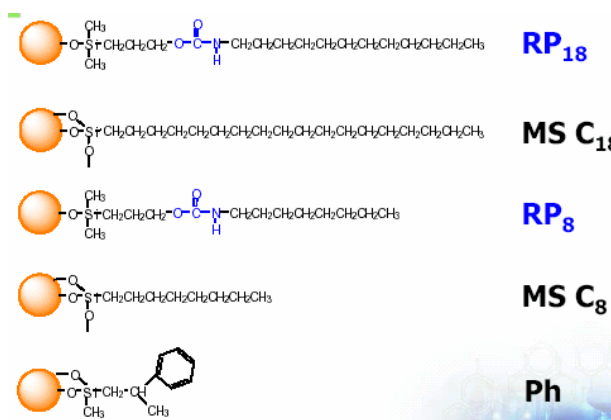


Fig. 2. Colunas mais comuns utilizadas em HPLC

Sendo que as do tipo C18 e C8 são as mais difundidas.

. A coluna pode ser escolhida levando-se em consideração a estrutura química do analito e de seus grupos funcionais. Com essas informações pode-se consultar na literatura o uso de colunas para estruturas químicas semelhantes.

. O teste de coluna deve ser feito em conjunto com teste de fase móvel. Os solventes mais utilizados são:

- Metanol
- Acetonitrila
- Tampão



Os menos comuns são:

Isopropanol

Etanol

THF

A distribuição relativa do soluto entre duas fases é determinada pela interação que este tem com cada fase. A afinidade que um soluto tem por uma fase depende principalmente das forças intermoleculares como de Van der Waals, ligações hidrogênio e polaridade. Deve-se encontrar uma fase móvel que promova um equilíbrio conveniente do soluto em relação à fase estacionária e a fase móvel, de modo que o analito elua de modo satisfatório.

A composição da fase móvel define a pode mudar de maneira significativa a seletividade do método e força de eluição da fase.

Na figura abaixo tem-se um exemplo de como a mudança de solvente na fase móvel pode alterar a seletividade e tempos de retenção:

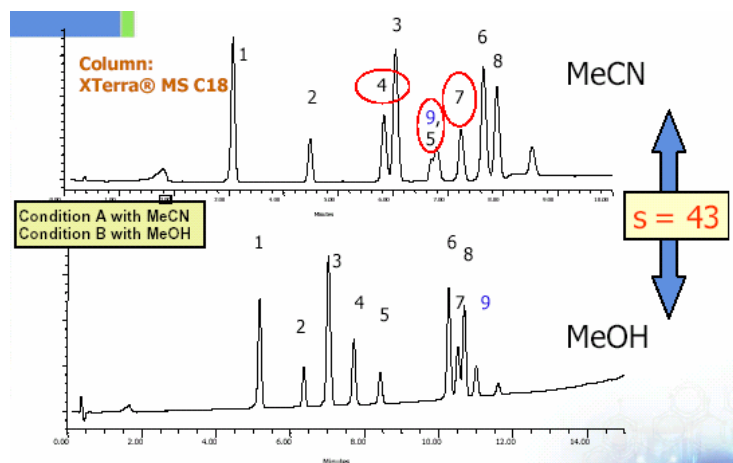


Fig.3. O uso de Acetonitrila ao invés de metanol, resulta em um cromatograma com melhor resolução e seletividade

. Na determinação da fase móvel deve-se fazer variações do tipo:

pH

Composição fase móvel ACN/MeOH/H₂O em várias combinações

Usos de tampão de acordo com os pK_a's da(s) substâncias de interesse

Essas variações podem ser realizadas de acordo com procedimentos estabelecidos

(5).

. Deve-se definir o modo de eluição (gradiente ou isocrático)

2.4. Definição dos parâmetros cromatográficos

Devem-se estabelecer condições cromatográficas para o método levando-se em consideração:

. Dimensões da coluna



- . Fase móvel
- . Volume de injeção da amostra
- . Fluxo da fase móvel em (ml/min)
- . Detector (comprimento de onda para leitura)
- . Tempo de análise
- . Temperatura (em caso de uso de forno)
- . Modo de eluição (isocrático ou gradiente)

2.5. Testes para determinação de impurezas

A presença de impurezas em produtos farmacêuticos podem ter efeitos significativos na qualidade e eficiência. Dessa forma, a investigação de teores e tipos de impurezas em um produto e em matérias primas são de órgãos como o ICH e FDA () para desenvolvimento de novos fármacos.

Várias técnicas de alta eficiência e sensibilidade tem sido utilizadas no estudo de impurezas com resultados satisfatórios. Dentre elas podemos citar:

- . Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
- . Eletroforese capilar (CE)
- . Cromatografia de camada delgada (TLC)
- . Cromatografia de fluido supercrítico (SFC)

Estas técnicas podem ser combinadas com outros métodos de detecção e identificação como:

- . Absorção por Ultra-violeta (UV)
- . Detecção com arranjo de fotodiodos (DAD)
- . Detecção por índice de refração (RI)
- . Espectrometria de massas (MS)

Abaixo descrevem-se três técnicas comumente utilizadas no estudo de impurezas.

2.5.1. Usando a técnica de HPLC com detecção UV

Nesta etapa o método já está praticamente desenvolvido. Deve-se então verificar se o método pode ser usado em estudos de estabilidade por exemplo, onde impurezas presentes são de interesse.

Primeiro verifica-se a pureza cromatográfica do pico principal. Pode-se “fatiar” o pico principal e obter espectros de UV de cada parte. Na figura abaixo tem-se o exemplo de dois picos “puros” onde todos os espectros tem mesmo perfil.

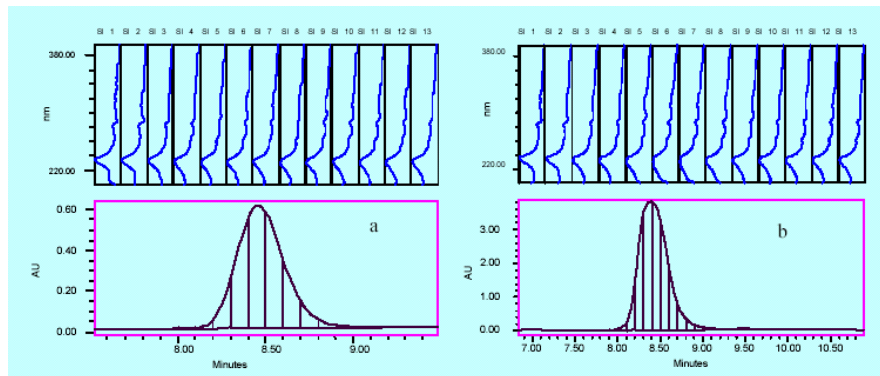


Fig. 4. Picos que boa pureza cromatográfica em função dos espectros de UV obtidos

Na figura abaixo, utilizando-se a mesma ferramenta de UV, verifica-se que o pico 1 apresenta uma impureza no “tailing” pois observam-se dois espectros diferentes de UV no início e no final do pico.

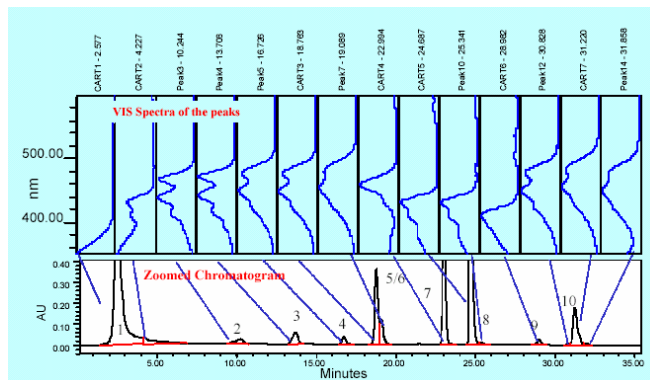


Fig. 5. O pico 1 apresenta dois espectros distintos no início e final

2.5.2. Usando a técnica de LC/MS

Estudos de pureza de picos com LC/MS

A especificidade (ou seletividade no caso de métodos cromatográficos) foram a base para uma caracterização completa do perfil de impurezas de uma amostra. Um importante aspecto na especificidade é a pureza do pico da substância ativa de interesse. A técnica de MS é capaz de detectar pequenos percentuais de impurezas que podem co-eluir com a substância ativa. Na figura 6 tem-se um exemplo de co-eluição.

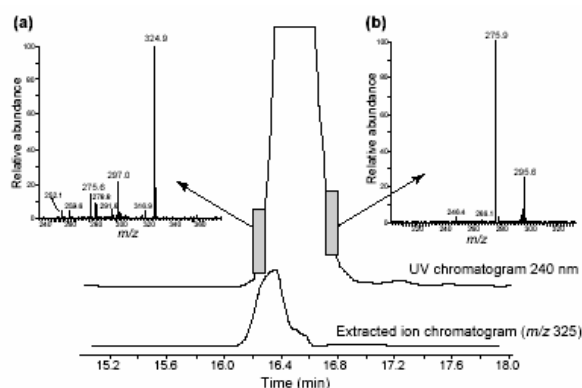


Fig. 6. Estudo de pureza de pico por LC/MS. A figura principal mostra um cromatograma obtido por detecção UV em 240nm. Os espectros de massa (a) e (b) mostram que existe uma impureza no final do pico principal em um percentual de 0,5%. A otimização das condições cromatográficas pode levar à separação das duas substâncias.

Essa identificação não seria possível usando-se a técnica de HPLC/UV no caso de duas substâncias com espectros de UV semelhantes.

Na figura abaixo tem-se um exemplo de quatro esteróides de estruturas químicas diferentes, que co-eluem em cromatografia líquida e apresentam espectros de UV iguais, o que impossibilita a sua diferenciação por HPLC/UV.

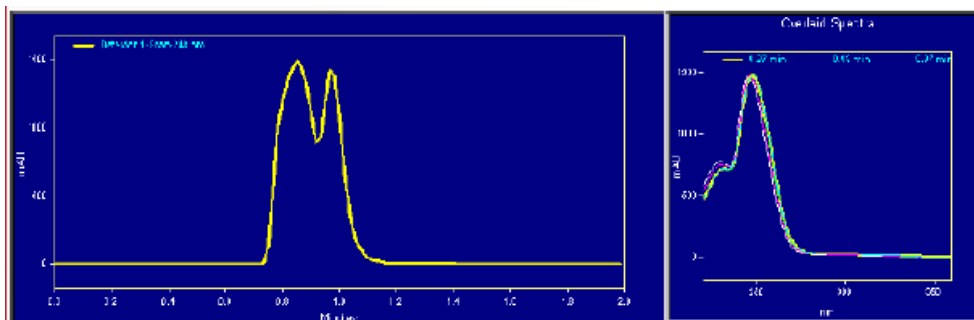


Fig. 7. À esquerda o cromatograma de UV dos quatro esteróides. À direita os espectros de UV sobrepostos: não é possível identificar as substâncias.

Já pela técnica de MS é possível a identificação e diferenciação das quatro substâncias pelos seus pesos moleculares:

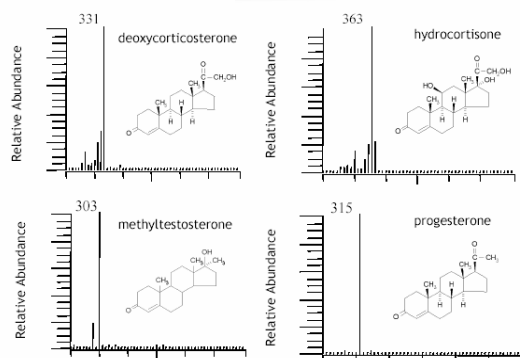


Fig.8. Quatro esteróides que podem ser diferenciados de acordo com o espectro de massas.

Caracterização do perfil de impurezas por LC/MS



O perfil de impurezas deve ser baseado em um cromatograma de UV. O principal objetivo da técnica LC/MS é obter informações de peso molecular dos picos identificados no cromatograma UV. O perfil de impurezas é útil no acompanhamento de produção, estudos de estabilidade e estudos de toxicidade. Na figura abaixo comparam-se os perfis de quatro lotes diferentes do mesmo produto. Por LC/MS pode-se acompanhar o aumento ou diminuição, deslocamento de tempos de retenção e degradação de impurezas.

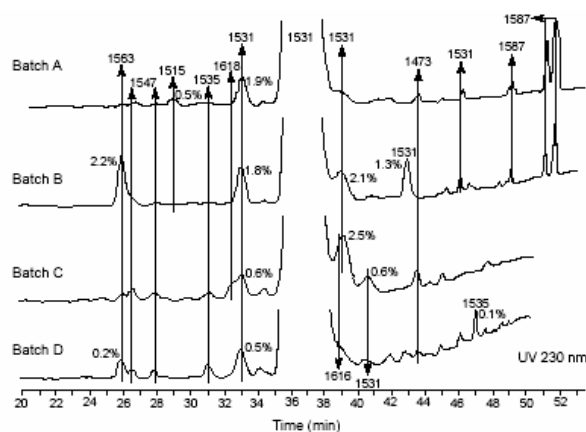


Fig. 9. Comparação de perfil de impurezas. As massas e percentuais são indicados para os picos relevantes.

2.5.3. Usando a técnica de LC/NMR

Em muitos casos de estudos de impurezas, o LC/MS é utilizada por ser uma técnica rápida e de grande sensibilidade (detecta impurezas em até 0,01%). Há casos porém, que o MS não consegue diferenciar estruturas de mesmos pesos moleculares e funções químicas diferentes, que caracterizam impurezas distintas.

Nesses casos, o uso da técnica de RMN se faz necessária para identificação de grupos funcionais e elucidação inequívoca das estruturas químicas das impurezas (fig. 10),

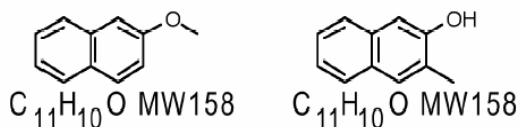


Fig. 10. Duas impurezas com mesmo peso molecular que somente são diferenciadas com o auxílio da técnica de RMN

2.5.4. Usando a técnica de Eletroforese Capilar

A técnica de Eletroforese capilar tem sido usada com sucesso na identificação de impurezas em fármacos e separação de enantiômeros. Essas separações quirais são realizadas com um eletrólito de fundo que discrimina enantiômeros. O enantiomerismo é um fenômeno de alta relevância já que um fármaco pode apresentar diferentes propriedades



farmacológicas e de toxicidade como consequência. O enantiômero que possui atividade farmacológica é chamado de “eutômero” e o inativo de “distômero”.

As recomendações dos órgãos fiscalizadores é que se comercialize fármacos na forma de um só enantiômero o que evita sub-dosagens e efeitos tóxicos do inativo. Dessa forma surgiu a necessidade das indústrias farmacêuticas desenvolverem métodos rápidos, sensíveis e seletivos, como a eletroforese capilar, para o controle de pureza enantiomérica das substâncias ativas.

DSC e Polimorfismo

Sabe-se que substâncias ativas para fabricação de medicamentos podem existir em diversas formas polimórficas. O polimorfismo inclui polimorfos, solvatos e amorfos, como definido pelo protocolo Q6A do ICH. As formas polimórficas de uma substância geralmente apresentam características distintas de solubilidade, em função das diferenças de redes cristalinas. A figura 11 mostra as formas polimórficas que uma determinada substância pode apresentar.

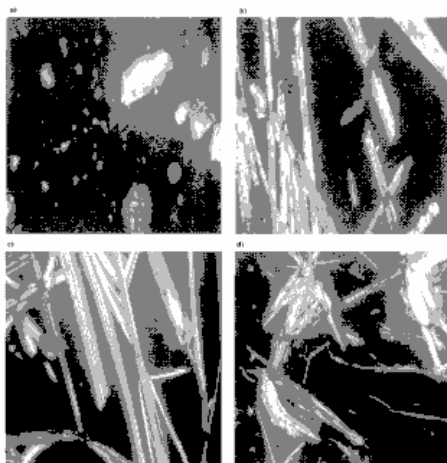


Fig. 11. Quatro formas polimórficas de uma mesma substância ativa. As formas de maior estabilidade apresentarão solubilidades menores e consequentemente biodisponibilidades menores.

As diferentes solubilidades dos polimorfos podem fazer com que mesmo medicamento varie, lote a lote, a biodisponibilidade da substância ativa ocasionada por diferenças de rota de síntese no processo de fabricação.

Dessa forma, é necessário que no desenvolvimento de um produto e no seu processo de fabricação, haja um controle do polimorfismo para assegurar biodisponibilidade e bioequivalência entre os lotes produzidos. A técnica analítica mais utilizada para avaliação de polimorfismo é o DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial).

Na figura abaixo observam-se os termogramas de três polimorfos. As diferenças de entalpias de fusão indicam diferentes solubilidades das formas polimórficas.

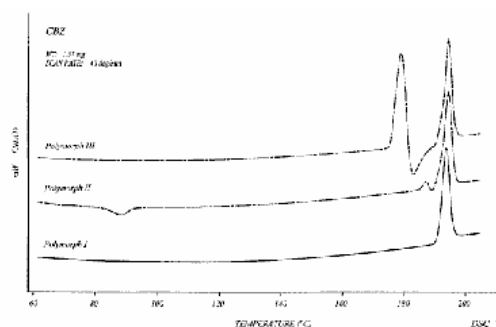


Fig.12. Os polimorfos I, II e III apresentam entalpias de fusão diferentes, ocasionando solubilidades diferentes.

3. Avaliação, Otimização e Resolução de problemas

Nesta etapa avaliam-se os resultados obtidos. Segue-se a otimização do método em caso de obtenção de dados satisfatórios. Caso alguns parâmetros do método não atendam aos critérios estabelecidos ou não resultem em dados satisfatórios, procura-se resolver os problemas por ajuste ou substituição de condições cromatográficas.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR HPLC

É necessário que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

1. Planejamento da Validação

Sugere-se uma seqüência de trabalho como a que se segue:

- Definir a aplicação, o objetivo e escopo do método;
- Definir parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
- Desenvolver um procedimento operacional para validação;
- Definir os experimentos de validação;
- Executar os experimentos preliminares de validação;
- Desenvolver e executar tratamento estatístico dos dados obtidos.

2. Parâmetros e características de desempenho de métodos

A validação de um método deve conter os testes relacionados abaixo, bem como a documentação necessária (cromatogramas, certificados, tratamento estatístico, etc):

- Especificidade e Seletividade
- Linearidade



- Precisão
- Exatidão Limites de quantificação e detecção
- Robustez

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO

Dissolução é uma técnica qualitativa e quantitativa que fornece informações sobre biodisponibilidade de um fármaco bem como desempenho e consistência do processo de fabricação.

Os resultados obtidos dos ensaios de dissolução são ferramentas de grande importância no desenvolvimento e avaliação de estabilidade de novas formulações e nas correlações *in vivo* – *in vitro*. Na área de produção e controle de qualidade, os resultados do teste de dissolução podem ser utilizados para detectar desvios de fabricação, para assegurar uniformidade durante a produção de um lote e reprodutibilidade lote a lote.

O desenvolvimento e validação dos métodos de dissolução devem seguir protocolos estabelecidos de acordo com as normas estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores.

1. Condições de teste para desenvolvimento de metodologia de Dissolução

O meio de dissolução e o equipamento escolhidos devem resultar em um método discriminativo, exato, robusto e fácil de ser transferido a outros laboratórios. As condições de teste de dissolução estão relacionadas com o mecanismo e os parâmetros escolhidos. Abaixo está uma relação dos principais aspectos que devem ser abordados:

- **Aparelho:** Normalmente seleciona-se entre aparelhos de pá ou cesta. Utiliza-se o cesto para cápsulas, com agitação de 50 a 100 rpm. O aparelho de pá é utilizado para comprimidos e cápsulas com agitação de 50 ou 75 rpm.
- **Velocidade de Agitação:** a velocidade deve ser mantida na faixa de 25 a 150 rpm. Velocidades abaixo de 25 rpm causam problemas hidrodinâmicos e velocidades acima de 150 rpm causam turbulência.
- **Meio de Dissolução:** As características físico-químicas do princípio ativo devem ser determinadas antes da seleção do meio de dissolução. A seleção do meio de dissolução deve ser feita considerando-se, em parte, a solubilidade e a faixa de dosagem do fármaco. Os meios de dissolução típicos são:
 - . HCl entre 0,1 e 0,001N
 - . Tampão acetato pH entre 4,1 e 5,5
 - . Tampão fosfato pH entre 5,8 e 8,0
 - . Água purificada
 - . Soluções de polisorbatos 20, 40, 60 e 80
 - . Soluções de lauril sulfato de sódio



- . Soluções de sais biliares
- . Fluido gástrico simulado

Para pás e cestos, o volume de meio de dissolução é de 500ml até 1000ml, sendo 900ml o volume mais utilizado.

- **Especificações:** Para formas farmacêuticas de liberação imediata, a duração do teste é, de 30 a 60 minutos e a especificação é de um único ponto. Para formas de liberação prolongada, são escolhidos no mínimo 3 pontos para caracterizar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco.

Durante o desenvolvimento de metodologia de dissolução, devem-se observar ainda parâmetros como temperatura, tempo total de dissolução, quantidade e volume de alíquotas coletadas, necessidade de reposição do meio, etc.

2. Validação de métodos de dissolução

Segundo o capítulo geral da USP <1225>, o teste de dissolução é considerado método analítico utilizado para determinação de características de desempenho. Os parâmetros exigidos para a validação deste tipo de teste estão listados a seguir:

- **Especificidade:** A interferência do placebo pode ser determinada utilizando amostras da mistura de excipientes equivalente à menor e maior dose presente na forma farmacêutica.
- **Faixa de linearidade:** É geralmente estabelecida utilizando-se cinco soluções padrão do fármaco, com concentração variando de +/- 20% da concentração mais baixa até +/- 20% da concentração mais alta que pode ocorrer durante a liberação da dose da forma farmacêutica.
- **Exatidão:** Utiliza-se o fármaco na forma pura a +/- 20% da concentração mais alta que é esperada durante a liberação a partir da forma farmacêutica em estudo. Mínimo de três níveis de concentração em triplicata.
- **Precisão:** Deve ser determinada fazendo-se réplicas das soluções padrão e seis injeções de cada. Calcula-se o desvio padrão que não deve ultrapassar a faixa de 2,0%. A precisão intermediária realiza-se com dois perfis de dissolução executados por dois analistas. A diferença no valor médio obtido por um analista em relação ao outro não deve ser maior que 10%.

REFERÊNCIAS

- Guideline for Industry, Text on Validation of Analytical Procedures, ICH-2QA, March 1995.
- Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, November 1996.



- Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November 1994, CMC 3.
- Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, International Conference on Harmonization; Guidance on Q6A Specifications; Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, Federal Register, Vol. 65, No. 251, Friday, December 29, 2000, Notices, page 83045.
- Guidance for Industry, Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), August 1999, ICH, page 17.
- 21 CFR Part 211 - Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 4-01-02 Edition, 211.194(a)(2), page 135.
- Guidance for Industry, Q3A Impurities in New Drug Substances, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), February 2003, ICH, Revision 1.