

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Desenvolvimento de método cromatográfico compatível com LC-MS/MS, indicativo de estabilidade para associação de losartana potássica e hidroclorotiazida em comprimidos pela abordagem Quality by Design e avaliação de incertezas.

Ariel Lucas Rocha

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Professor Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2023

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Desenvolvimento de método cromatográfico compatível com LC-MS/MS, indicativo de estabilidade para associação de losartana potássica e hidroclorotiazida em comprimidos pela abordagem Quality by Design e avaliação de incertezas.

Ariel Lucas Rocha

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Professor Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2023

Ariel Lucas Rocha

Desenvolvimento de método cromatográfico compatível com LC-MS/MS, indicativo de estabilidade para associação de losartana potássica e hidroclorotiazida em comprimidos pela abordagem Quality by Design e avaliação de incertezas.

Comissão Julgadora

Da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

orientador/presidente

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R672d Rocha, Ariel Lucas  
Desenvolvimento de método cromatográfico compatível com LC-MS/MS, indicativo de estabilidade para associação de losartana potássica e hidroclorotiazida em comprimidos pela abordagem Quality by Design e avaliação de incertezas. / Ariel Lucas Rocha. - São Paulo, 2023.  
109 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Lourenço, Felipe Rebello

1. Quality by Design (AQbD). 2. Desenvolvimento de método. 3. Espectrometria de massas. 4. Estudo de estabilidade. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello, orientador.

## RESUMO

ROCHA, A.L. Desenvolvimento de método cromatográfico compatível com LC-MS, indicativo de estabilidade para associação de losartana potássica e hidroclorotiazida em comprimidos pela abordagem *Quality by Design* e avaliação de incertezas. 2023. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O conceito de *Analytical Quality by Design* (AQbD) vem como uma alternativa mais robusta, econômica e cientificamente embasada para o desenvolvimento analítico, em detrimento ao OFAT (*one factor at a time*). Esse novo entendimento aplicável ao desenvolvimento é recomendado uma vez que se pode obter flexibilidade regulatória e garantir resultados mais confiáveis ao longa da vida do produto. Aplicou-se essa nova abordagem a fim de elaborar um método analítico indicativo de estabilidade para um produto farmacêutico de associação entre a Losartana Potássica e a Hidroclorotiazida, considerado a primeira linha potencial para o tratamento de hipertensão. A primeira etapa do desenvolvimento analítico consistiu no levantamento bibliográfico das propriedades físico-químicas das moléculas em questão para definir um método inicial. Após a definição das condições analíticas iniciais, utilizou-se as ferramentas estatísticas de planejamento de experimentos (DoE) para as etapas de triagem e otimização. Na etapa de triagem optou-se pelo delineamento de Plackett-Burman, utilizando 11 fatores e 2 níveis, pelo qual foi possível avaliar inúmeras variáveis e determinar suas significâncias em relação as respostas. A seguir, realizou-se a otimização com o delineamento experimental de composto central com 4 fatores e 5 níveis, que permitiu modelar uma superfície resposta complexa e avaliar os fenômenos de interações entre os fatores. Dessa forma, as condições analíticas otimizadas foram definidas, considerando-se gradiente de ácido fórmico 0,3% como eluente A e uma mistura de acetonitrila e metanol (80:20) como eluente B, coluna cromatográfica X-Bridge C18 (150mm x 4,6mm x 3,5µm), temperatura da coluna de 40°C, fluxo de 1,3 mL/minuto, volume de injeção de 10µL. Através dessa metodologia, foi possível realizar a identificação de um produto de degradação desconhecido da Hidroclorotiazida, formado pela reação com a lactose (excipiente presente na formulação do medicamento), comprovando que o método pode ser aplicável tanto à detectores de DAD como em detector de espectrometria de massas. Também foi comprovada através do estudo de degradação forçada que o método é indicativo de estabilidade, além de ser validado e robusto para o seu propósito.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Quality by Design* (AQbD), desenvolvimento de método, espectrometria de massas, estudo de estabilidade, cromatografia líquida de alta eficiência.

## ABSTRACT

ROCHA, A.L. Development of a chromatographic method compatible with LC-MS, indicative of stability for the association of losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets using the Quality by Design approach and evaluation of uncertainties. 2023. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The concept of Analytical Quality by Design (AQbD) comes as a more robust, economical, and scientifically based alternative for analytical development, to the detriment of OFAT (one factor at a time). This new understanding applicable to analytical development is recommended since regulatory flexibility can be achieved and ensure more reliable results throughout the life of the product. This new approach was applied to develop an analytical procedure indicative of stability for a pharmaceutical product of association of Losartan Potassium and Hydrochlorothiazide, considered a potential first line for the treatment of hypertension. The first stage of the analytical development consisted of a bibliographic survey of the physicochemical properties of the molecules in question to define an initial method. After defining the initial analytical conditions, statistical tools for design of experiments (DoE) were used for the screening and optimization steps. In the screening stage, the Plackett-Burman design was chosen, using 11 factors and 2 levels, through which it was possible to evaluate numerous variables and determine their significance in relation to the responses. Next, optimization was carried out with the experimental design of a central composite with 4 factors and 5 levels, which allowed modeling a complex response surface and evaluating the phenomena of interactions between the factors. Thus, the optimized analytical conditions were defined, considering a 0.3% formic acid gradient as eluent A and a mixture of acetonitrile and methanol (80:20) as eluent B, X-Bridge C18 chromatographic column (150mm x 4.6mm x 3.5 $\mu$ m), column temperature of 40°C, flow rate of 1.3 mL/minute, injection volume of 10 $\mu$ L. Through this methodology, it was possible to identify an unknown degradation product of Hydrochlorothiazide, formed by the reaction with lactose (excipient present in the drug formulation), proving that the method can be applicable both to DAD detectors and to spectrometry and mass detectors. It was also proven through the forced degradation study that the method is indicative of stability, in addition to being validated and robust for its purpose.

**KEYWORDS:** Quality by Design (AQbD), analytical development, mass spectrometry, stability study, high performance liquid chromatography.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	6
SUMÁRIO.....	7
PARTE 1: Revisão bibliográfica e fluxo aplicado a Qualidade por <i>Design</i> Analítico (AQbD).....	10
1. Introdução.....	11
2. Revisão Bibliográfica .....	13
2.1 Etapas .....	13
2.1.1 Definição do Perfil Analítico Alvo ( <i>ATP – Analytical Target Profile</i> ) .....	13
2.1.2 Características do desempenho do método analítico ( <i>AMPC – Analytical Method Performance Characteristics</i> ).....	13
2.1.3 Seleção da técnica analítica.....	14
2.1.4 Análise de risco .....	14
2.1.5 Planejamento de experimentos ( <i>DoE – Design of Experiments</i> ) .....	14
2.1.5.1 Delineamentos de triagem.....	15
2.1.5.2 Delineamentos de otimização.....	16
2.1.6 Definição da Região de Operação do Método ( <i>MODR - Method Operable Design Region</i> ).....	17
2.1.7 Estabelecendo estratégias de controle e melhoria contínua para a metodologia (robustez e definição de <i>system suitability</i> ).....	18
OBJETIVOS.....	20
PARTE 2: Desenvolvimento e validação do método cromatográfico indicativo de estabilidade para análise de Hidroclorotiazida e Losartana Potássica em comprimidos revestidos.....	21
3. Introdução.....	22
4. Propriedades físico-químicas.....	23
4.1. Losartana Potássica .....	24
4.2. Hidroclorotiazida.....	28
4.3. Literatura disponível .....	30
5. Definição das condições iniciais da metodologia.....	33
6. Delineamentos Experimentais .....	37
6.1. Triagem .....	37
6.1.1 Criação dos experimentos .....	38
6.1.2 Resultados e discussão .....	39

6.1.2.1	Análise de variância (ANOVA) e regressão .....	40
6.1.2.2	Parâmetros críticos .....	40
6.1.2.3	Considerações finais.....	46
6.2.	Otimização .....	48
6.2.1	Respostas avaliadas .....	48
6.2.2	Modelo experimental adotado.....	49
6.2.3	Criação de experimentos .....	49
6.2.4	Resultados e discussão .....	50
6.2.4.1	Análise de variância .....	52
6.2.4.2	Análise gráfica.....	54
6.2.4.3	Definição do método analítico .....	59
7.	Método Analítico Otimizado .....	60
8.	Robustez cromatográfica e definição dos parâmetros de adequabilidade ( <i>system suitability</i> ).....	65
8.1	Criação dos experimentos .....	66
8.2	Resultados e discussão .....	67
8.2.1	Avaliação da Robustez Cromatográfica.....	67
8.2.1.1	Tempo de retenção para HCTZ.....	70
8.2.1.2	Tempo de retenção para LOS.....	71
8.2.1.3	Pratos teóricos para HCTZ.....	72
8.2.1.4	Pratos teóricos para LOS.....	73
8.2.1.5	Fator de capacidade da Benzotidiazina Composto Relacionado A (BZTD CR A) 74	
8.2.1.6	Assimetria de pico para HCTZ.....	75
8.2.1.7	Assimetria de pico para LOS.....	75
8.2.1.8	Resolução entre o pico de HCTZ e BZTD CR A.....	75
8.3	Definição de <i>System Suitability</i> , controle e melhoria contínua .....	75
9.	Validação analítica .....	76
9.1	Procedimento.....	77
9.2	Resultados e discussão .....	78
9.2.1	Teor .....	78
9.2.2	Produtos de degradação .....	79
10.	Degradação forçada .....	80
11.	Identificação das impurezas por LC-MS/MS .....	90
11.1	Impurezas formadas na estabilidade .....	90



11.1 Identificação das impurezas conhecidas (BZTD CR A e Impureza K de LOS)	92
11.2 Identificação da impureza desconhecida de HCTZ	94
12. Correlação metrológica entre os componentes da matriz e o impacto nas tomadas de decisões	97
13. Conclusão	101
ANEXO	103
14. Referências	106

**PARTE 1: Revisão bibliográfica e fluxo aplicado a Qualidade por *Design Analítico*  
(AQbD)**

## 1. Introdução

Antes de 1992, o conceito de garantia da qualidade era inteiramente limitado a inspeção do produto apenas no final de toda cadeia produtiva, onde esse poderia ser aceito ou descartado no final do processo. Joseph Moses Juran, por sua vez, nesse mesmo ano, para garantir a total segurança de seus produtos ao consumidor final, traz um novo conceito de qualidade que determina que essa não se deve ser apenas testada, mas planejada desde a concepção do produto / processo, tendo sido o primeiro a introduzir o princípio do QbD (*Quality by Design*) (1).

Essa abordagem, hoje inserida na indústria farmacêutica, traz maior robustez, conhecimento científico e estatístico ao processo de fabricação e ao produto em si, além de garantir a produção de acordo com o “seis-sigma”, termo usado para definir um conjunto de práticas sistemáticas a fim de melhorar o processo produtivo continuamente e diminuir significativamente a possibilidade de produtos fora de especificação (2,3). Além disso, a abordagem QbD traz menos risco ao consumidor, maior velocidade ao lançamentos de novos produtos e uma enorme flexibilidade regulatória (4).

Com base em todas as vantagens da qualidade pelo *design*, a aplicação desse conceito traz a possibilidade de desenvolver métodos analíticos com maior grau de confiabilidade e robustez. Uma vez que os métodos analíticos são indispensáveis para o controle da qualidade de produtos farmacêuticos, essa etapa do desenvolvimento farmacêutico é bastante crítica e pode fornecer um alto grau de variabilidade aos resultados ou trazer dificuldades na transferência de tecnologia de um laboratório para outro. Essa nova abordagem para o desenvolvimento analítico é denominada de *Analytical Quality by Design* (AQbD) (2,5)

O AQbD vem como uma alternativa mais robusta, econômica e cientificamente embasada para o desenvolvimento analítico, em detrimento ao OFAT (*one fator at a time*), prática mais amplamente empregada atualmente dentro dos laboratórios analíticos. A abordagem OFAT consiste em otimizar um único parâmetro por vez para se obter a resposta desejada, enquanto os outros parâmetros analíticos são mantidos constantes. Esse tipo de prática de desenvolvimento analítico acaba, por muitas vezes, levando a obtenção de um método falho e pouco robusto, acarretando em retrabalho como revalidação da metodologia após a transferência do método ou até mesmo a necessidade de desenvolver um método alternativo para análise do produto (2,6). Com a utilização das ferramentas de DoE (*Design of Experiments*), o AQbD permite realizar uma análise multivariada durante

e após o desenvolvimento analítico, o que viabiliza verificar os efeitos de interação entre os parâmetros analíticos variados simultaneamente durante o desenvolvimento do método, assim como possibilita estabelecer uma região de operação do método, conhecido como MODR (*Method Operable Design Region*). O MODR é o objetivo final do AqBd, uma vez que nele será possível definir a região de controle onde o método poderá ser operado durante rotina no controle de qualidade, garantindo assim flexibilidade regulatória ao procedimento analítico, já que o método se torna amplamente entendido (2,5,6).

Porém, antes de definir a região de operação do método (MODR), é necessário estabelecer as características mínimas necessárias, ou seja, o perfil analítico alvo (ATP – *Analytical Target Profile*) que a metodologia deverá atender. O ATP é o objetivo do procedimento ao desenvolver um método analítico pela abordagem do AqBd. Após a definição do ATP, através do delineamento experimental (DoE) é possível determinar a região (MODR), onde todos os critérios pré-estabelecidos que garantem a qualidade e desempenho do procedimento serão atendidos, resultando em uma metodologia mais robusta, econômica e flexível (2).

A qualidade pelo *design* aplicado ao desenvolvimento de métodos analíticos dentro da indústria farmacêutica encontra-se em bastante evidência, uma vez que o ICH está prestes a lançar um guia (Guia Q14), atualmente em consulta pública, o qual surge com o propósito de revisar o guia Q2 (R1) e complementar os guias Q8(R2) a Q12, para implementação dos conceitos do AqBd no desenvolvimento farmacêutico tal como na validação dos métodos analíticos, e assim suprir a falta de base científica para a flexibilidade regulatória em procedimentos já aprovados por órgãos reguladores em todo mundo (14).

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Etapas**

A aplicação do AQbD compreende uma abordagem sistemática para se desenvolver um método analítico, o que consiste na realização de diversas etapas, de forma a garantir o completo entendimento científico e estatístico da metodologia analítica (7). As diversas etapas incluem: a) definição do Perfil Analítico Alvo (*ATP – Analytical Target Profile*); b) definição das características do desempenho do método analítico (*AMPC – Analytical Method Performance Characteristics*); c) seleção da técnica analítica; d) análise de risco; e) planejamento de experimentos (*DoE – Design of Experiments*); f) definição da Região de Operação do Método (*MODR – Method Operable Design Region*); e g) estabelecimento de estratégias de controle e melhoria contínua para a metodologia (robustez e definição de *system suitability*).

#### **2.1.1 Definição do Perfil Analítico Alvo (*ATP – Analytical Target Profile*)**

O AQbD começa com a determinação do ATP, justamente por ser a etapa onde se estabelece a definição da metodologia que se deseja desenvolver, ou seja, é nessa etapa do processo em que se definem os objetivos do método: o que deverá ser mensurado (por exemplo o teor de um princípio farmacêutico ativo ou de uma impureza), em que se deseja mensurar (por exemplo em uma determinada formulação, seja ela, líquida, sólida ou semi-sólida) e o porquê deve-se realizar essa medida (por exemplo para o acompanhamento da estabilidade de um produto farmacêutico ao longo do seu tempo de prateleira), assim como a definição dos critérios mínimos de aceitação da qualidade para especificidade, exatidão e precisão dos resultados obtidos (5,8). A seleção bem definida dos principais objetivos do método evita o desperdício de tempo e recursos (9).

#### **2.1.2 Características do desempenho do método analítico (*AMPC – Analytical Method Performance Characteristics*)**

É dentro dessa etapa onde serão definidas as características mínimas de desempenho da metodologia analítica a fim de garantir o que foi estabelecido anteriormente no ATP. AMPC pode ser classificado em duas categorias, conforme a fonte do erro: erro sistemático (viés), onde estão inclusos os parâmetros de exatidão, seletividade e linearidade; e a erro aleatório (variabilidade), onde estão presentes os

parâmetros de precisão, limite de quantificação e limite de detecção (2). Alternativamente, o desempenho do método analítico pode considerar os erros sistemáticos e aleatórios de maneira combinada, por exemplo pela definição da incerteza padrão alvo (incerteza máxima admissível).

### **2.1.3 Seleção da técnica analítica**

Nessa etapa ocorre a pesquisa bibliográfica a fim de fundamentar o conhecimento a respeito das propriedades físico-químicas das moléculas (por exemplo, pKa, solubilidade, ponto de ebulição, polaridade, presença ou não de grupos cromóforos, etc.) que serão analisadas e das matrizes nas quais elas serão analisadas. Sendo assim, após esse estudo prévio torna-se possível selecionar uma ou mais técnicas analíticas que poderão satisfazer ao que foi anteriormente definido no ATP e nas AMPC (2).

### **2.1.4 Análise de risco**

Após a definição da técnica analítica, AQBd foca no desenvolvimento do método propriamente dito e assim inclui uma avaliação detalhada do risco associado ao efeito de cada parâmetro analítico, tais como a configuração do equipamento utilizado, características da amostra, etapas do preparo da amostra, condições ambientais, dentre outros fatores que possam impactar no ATP (2).

Há três elementos principais na avaliação do risco, definidos pelo guia ICH Q9, sendo eles: a) a identificação do risco (uso sistemático da informação para identificar potenciais fontes de impactos prejudiciais ao ATP através de um histórico de dados), b) a análise de risco (estimar o risco associado com as fontes identificadas); e c) avaliação do risco (comparação entre os riscos fazendo o uso de escalas quantitativas ou qualitativas para determinar suas respectivas significâncias) (2,8). Exemplos de ferramentas bastante utilizadas para esse tipo de avaliação dentro da indústria farmacêutica são o diagrama de Ishikawa (diagrama de causa-efeito ou espinha de peixe), como ferramenta qualitativa, e o FMEA e a matriz de riscos (*Risk Priority Number*), como exemplos de ferramentas quantitativas (2).

### **2.1.5 Planejamento de experimentos (*DoE – Design of Experiments*)**

A aplicação do planejamento experimental é uma estratégia organizada para determinação de modelos matemáticos pelos quais as variáveis independentes (fatores)

explicam as variáveis dependentes (respostas). Nessa etapa, todos os fatores selecionados na metodologia são variados sistematicamente para encontrar os possíveis impactos em cada resposta, tornando possível determinar quais os fatores mais significantes dentro do modelo e como esses devem ser configurados de forma a obter as respostas desejadas ao método, assim como elucidar as interações entre os fatores (5,8,9).

Para selecionar o tipo de DoE é necessário considerar várias aspectos da metodologia, tais como: o ATP bem definido, o número de fatores que podem interferir nas respostas que serão avaliadas para atingir os objetivos do método, possíveis interações entre os fatores, a validade estatística e a eficácia de cada delineamento disponível. Os delineamentos de experimentos podem se dividir em dois tipos: a) delineamentos de triagem (*screening*) e b) delineamentos de otimização (*optimization*) (7,8).

### 2.1.5.1 Delineamentos de triagem

A triagem é a etapa onde as variáveis independentes serão rastreadas a fim de identificar quais delas afetam as respostas a serem avaliadas, além de indicar e selecionar os níveis de cada fator a ser levado para a etapa de otimização. Em outras palavras, os delineamentos de triagem são realizados com o objetivo de selecionar os fatores mais significativos dentro das inúmeras variáveis independentes que podem afetar o método analítico em questão (2,8).

As principais ferramentas utilizadas para a triagem são: Delineamento Fatorial Completo (2 níveis), Delineamento Fatorial Fracionado ou Plackett-Burman. A seleção da melhor ferramenta se dá através do número de variáveis envolvidas e o nível de detalhamento que se deseja extrair do modelo matemático, conforme indicado na Tabela 1 (8).

**Tabela 1.** Delineamentos que podem ser empregados na etapa de triagem

Delineamento	-	Fatores		Res	Números de experimentos
		Tipo	Número		
Fatorial completo (2 níveis)		Numérico Texto	$2 \leq k \leq 5$	-	$2^k$
Fatorial fracionado (2 níveis)		Numérico Texto	$> 4$	III ou $>$	$2^{k-p}$
Plackett-Burman		Numérico Texto	$< k-1$	III	k (múltiplo de 4)

k = número de fatores; p = número escolhido para fracionar o delineamento; Res = resolução.

O delineamento de Fatorial Completo de 2 níveis é a ferramenta que fornece o maior nível de informação a respeito da avaliação dos fatores que estão sendo levados em consideração, uma vez que esse tipo de ferramenta permite identificar e diferenciar os efeitos principais das variáveis independentes, assim como as suas interações sobre as respostas. No entanto, para alcançar esse nível de detalhamento, essa ferramenta requer um grande número de experimentos quando comparados ao Fatorial Fracionado ou Plackett-Burman (8,10,11).

O delineamento Fatorial Fracionado de 2 níveis é uma ferramenta bastante utilizada na etapa de triagem, uma vez que possibilita a avaliação de um grande número de fatores com um número reduzido de experimentos, porém sua desvantagem consiste na limitada avaliação dos efeitos de interação entre os fatores. Isso ocorre devido a redução no número de experimentos, o que leva a perda de resolução e, conseqüentemente, na possibilidade de confusão entre efeitos principais e efeitos de interação, podendo levar a interpretação incorreta dos resultados (8,10,11).

O delineamento de Plackett-Burman é um tipo especial de delineamento do fatorial fracionado de 2 níveis com resolução III, que permitem estudar um grande número de fatores com um número bastante reduzido de experimentos conforme indicado na Tabela 1 (8,10,11).

### **2.1.5.2 Delineamentos de otimização**

Com a identificação dos principais fatores que afetam as respostas de interesse na etapa de triagem, torna-se possível otimizá-los através do DoE, empregando-se um delineamento de otimização. Na etapa de otimização, usualmente utiliza-se de 3 a 5 níveis de cada fator, possibilitando a construção de modelos matemáticos de segunda ordem (quadráticos). O ajuste de modelos quadráticos permite visualizar a curvatura na superfície resposta, o que não pode ser avaliado nos delineamentos de triagem, uma vez que utilizar apenas 2 níveis de cada fator e permitem o ajuste de modelos matemáticos de primeira ordem (lineares) (8,10,11).

Os delineamentos mais comuns utilizados na etapa de otimização são: fatorial completo de 3 níveis, composto central (CCD) e Box-Behnken (BBD), pois permitem modelar superfícies respostas com maior grau de complexidade. Entretanto, devido ao grande número de experimentos necessários nessas ferramentas, são utilizados para estudar um número pequeno de fatores, como mostra a Tabela 2 (8,10,11).



**Tabela 2.** Elineamentos empregados na etapa de otimização

<b>Delineamento</b>	<b>Tipo</b>	<b>Níveis</b>	<b>Números de experimentos</b>
Compósito Central (CCD)	Numérico Texto	5	$2^k + 2k + C_p$
Box-Behnken (BBD)	Numérico Texto	3	$2k(k-1) + C_p$
Fatorial completo	Numérico Texto	3	$3^k$

k = número de fatores; Cp: ponto central.

O fatorial completo de 3 níveis é mais utilizado quando se tem um número baixo de fatores que se deseja estudar, uma vez que requer um grande número de experimentos (8,10,11).

O delineamento de Compósito Central (CCD) é bastante utilizado pois permite a avaliação de 5 níveis de cada fator com um número menor de experimentos em comparação com o fatorial completo de 3 níveis (2,8,9,12).

Já o delineamento de Box-Behnken (BBD) corresponde a um tipo de fatorial incompleto de 3 níveis, que permite elucidar modelos tanto de primeira (linear) como segunda (quadrática) ordem, com um número reduzido de experimentos (2,8,9,12).

Após a aplicação de um dos delineamentos apresentados, é possível determinar o modelo matemático que explica a variação das respostas avaliadas em função dos fatores considerados no estudo. O modelo é selecionado com base em análise de variância (ANOVA), análise de resíduos, valor-*p* e ajuste do modelo de regressão múltipla com base nos coeficientes de determinação encontrados (2,8,9,12).

### **2.1.6 Definição da Região de Operação do Método (*MODR - Method Operable Design Region*)**

No contexto do desenvolvimento analítico, o MODR consiste na região que assegura atendimento aos critérios mínimos de aceitação. Em outras palavras, é a combinação multidimensional e a interação de condições analíticas que asseguram o desempenho do método para obter as respostas mínimas e necessárias para atingir o ATP anteriormente definido; incluindo, por exemplo, a resolução entre dois picos, assimetria do pico de interesse, pratos teóricos, entre outros parâmetros cromatográficos relevantes (5,8).

Sendo o desenvolvimento do método embasado no conhecimento obtido a partir da etapa de delineamento de experimentos, é possível construir gráficos de contorno a partir dos modelos matemáticos para cada resposta, que podem ser sobrepostos de forma a resultar na região onde as múltiplas respostas estão dentro dos critérios de aceitação pré-definidos. De forma complementar, a condição analítica otimizada pode ser estimada por funções de desejabilidade, que são usadas para atingir, maximizar ou minimizar as respostas conforme o critério a ser atingido (2,5,8).

Uma prática bastante relevante para a validação do MODR e, conseqüentemente, atingir a flexibilidade regulatória para a metodologia é a realização de teste confirmatórios em pontos específicos dentro da região estipulada. Sendo assim, torna-se possível comparar os resultados encontrados experimentalmente com os preditos pelo modelo matemático, permitindo avaliar se o método apresenta robustez adequada e pode ser operado com flexibilidade dentro dessa região (5).

### **2.1.7 Estabelecendo estratégias de controle e melhoria contínua para a metodologia (robustez e definição de *system suitability*)**

Como mencionado anteriormente, é necessário garantir que todos os critérios mínimos necessários para o propósito da metodologia analítica sejam atingidos tanto na transferência do método como em seu uso na rotina laboratorial. Tendo em vista a necessidade dessa estratégia, torna-se necessário estabelecer uma região de controle, a qual deve encontrar-se dentro da região de operação (MODR), de forma a possibilitar o contínuo monitoramento e melhoria da metodologia (5,8).

No AQB, a estratégia de controle consiste nos dados coletados ao longo de toda a vida do método (desenvolvimento, verificação, validação, transferência e rotina) (5). Porém, na verificação da metodologia, a obtenção de resultados em diferentes pontos dentro da região de operação do método, além da análise multivariada para a garantia da robustez, possibilita a flexibilidade regulatória e a definição da região em que o método é controlado, assim como permite estabelecer os critérios de *system suitability* para métodos cromatográficos (como a cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC) (13).

Por muito tempo, a robustez foi considerada como um parâmetro do método analítico a ser avaliada apenas na validação, porém a principal vantagem de se realizar a avaliação da robustez antes da validação da metodologia é a possibilidade de verificar se de fato o método é robusto antes de prosseguir para a próxima etapa e evitar retrabalho no desenvolvimento (13).

Para a realização do teste de robustez pelo AQbD, o ideal é utilizar delineamentos de triagem de 2 níveis, pois permitem avaliar muitos fatores com um número reduzido de experimentos, tal como o delineamento de Plackett-Burman, um dos mais indicados para essa avaliação. Os fatores serão variados dentro da MODR, e essa variabilidade permite avaliar quais fontes de variação impactam nas respostas da metodologia (8,13).

As diretrizes do ICH recomendam que os critérios de *system suitability* sejam estabelecidos através dos resultados de robustez cromatográfica para garantir que o procedimento esteja plenamente adequado no momento da utilização da metodologia analítica (14). Logo, pode-se realizar a predição para o critério mínimo do *system suitability* frente ao experimento que apresentou o pior resultado para cada resposta dentro do delineamento da robustez e assim, devido a determinação dos critérios com base em dados experimentais e não arbitrariamente, possibilita que os mesmos sejam utilizados para o controle adequado da metodologia analítica (8,13).

## OBJETIVOS

O objetivo do projeto é desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade que seja aplicável tanto na utilização do detector de arranjo de diodo (DAD) como no detector de espectrômetro de massas (MS), utilizando a abordagem AQbD, para um produto que possui em sua formulação a associação dos princípios ativos Losartana Potássica e Hidroclorotiazida na forma farmacêutica sólida (comprimidos), tendo como objetivos específicos:

- Desenvolver um método analítico capaz de separar e quantificar os princípios ativos Losartana e Hidroclorotiazida, assim como seus potenciais produtos de degradação.
- Definir a região de operação do método empregando os conceitos de Qualidade por Design Analítico (AQbD), através de modelos matemáticos que determinam como as respostas da metodologia são explicadas pelas condições cromatográficas mais relevantes.
- Definir os parâmetros de *System Suitability* do método empregando também os conceitos de AQbD.
- Validar os métodos de teor e produtos de degradação avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão.
- Determinar a incerteza de medição associada ao procedimento analítico utilizando os dados da validação analítica (abordagem *top-down*) e fazer uma comparação com os resultados encontrados pelo procedimento da propagação de erros (abordagem *bottom-up*).

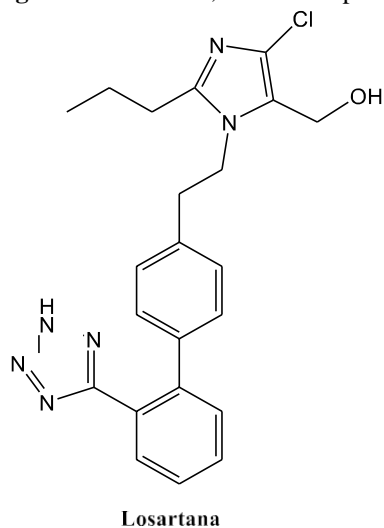
**PARTE 2: Desenvolvimento e validação do método cromatográfico indicativo de estabilidade para análise de Hidroclorotiazida e Losartana Potássica em comprimidos revestidos**

### 3. Introdução

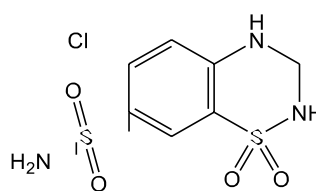
A Losartana (LOS) ou 2-n-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il)metil]imidazol (Figura 1) é um potente agente antagonista dos receptores de Angiotensina II. É atualmente considerado a primeira linha potencial para o tratamento de hipertensão. Atua na proteção do paciente contra o acidente vascular cerebral não apenas através do controle da hipertensão, mas também via efeitos secundários benéficos sobre a agregação plaquetária, o metabolismo do ácido úrico, o diabetes e a fibrilação atrial (16).

A Hidroclorotiazida (HCTZ) ou 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dioxo (Figura 1) é um diurético tiazídico, que atua no aumento da excreção urinária de sódio e água pela inibição da reabsorção de sódio nos túbulos renais, isso faz com que ocorra uma modesta redução do volume intravascular (17). Devido ao efeito diurético da HCTZ em associação com a Losartana, existe um efeito aditivo na redução da pressão arterial, em comparação com os componentes isolados, acreditando assim que esse efeito seja resultado de mecanismos complementares de ambos os fármacos (18).

**Figura 1.** Estruturas, fórmulas e pesos moleculares da Losartana e Hidroclorotiazida.



Fórmula Molecular:  $C_{22}H_{23}ClN_6O$   
Peso Molecular: 422,92 g/mol



**Hidroclorotiazida**

Fórmula Molecular  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$   
Peso Molecular: 297,73 g/mol

Para garantir a qualidade, segurança e a eficácia de um medicamento com o insumo farmacêutico ativo (IFA) sintético ou semi-sintético (como no caso das moléculas

apresentadas) é preciso apresentar estudo de estabilidade do mesmo, uma vez que o fármaco pode sofrer alterações em sua composição decorrente a fatores ambientais, tal como: temperatura, umidade e luz no qual o produto estará exposto ao longo de seu prazo de validade. Tendo em vista à importância e o impacto que tem esse aspecto para o registro de um medicamento e a sua posterior comercialização, órgãos reguladores do mundo todo propuseram guias e critérios para que se evidencie como a qualidade de um IFA ou produto responde em função do tempo sob a influência de variações dos fatores ambientais, não apenas para definir o seu prazo de validade, mas também para determinar as condições nas quais o medicamento deverá ser transportado e/ou armazenado (19-20).

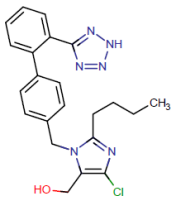
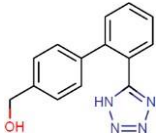
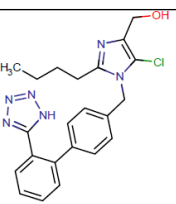
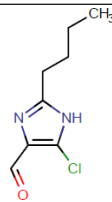
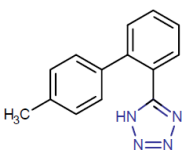
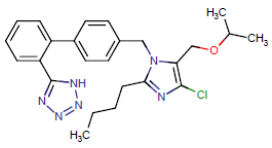
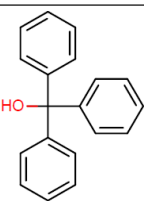
Com isso, a fim de se desenvolver uma metodologia analítica para atender o aspecto regulatório e científico, foi realizado o levantamento bibliográfico das moléculas dos IFA's em questão, tais como suas respectivas impurezas e potenciais produtos de degradação que podem ser gerados a partir delas e propriedades físico-químicas em *sites* especializados, compêndios oficiais e literatura científica disponível.

#### **4. Propriedades físico-químicas**

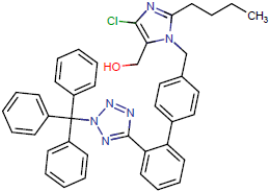
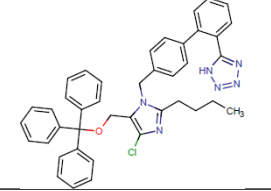
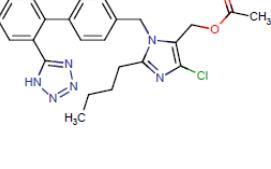
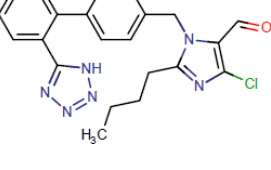
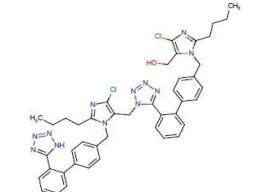
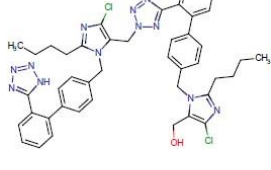
As características físico-químicas das moléculas em estudo podem ser usadas para definir as condições cromatográficas iniciais para o desenvolvimento do método analítico. O pKa é utilizado para definir qual o pH indicado para o método, sendo que o mais comumente definido é utilizar um valor de pH que seja pelo menos 2 ou mais unidades distante do pKa da molécula, ou seja, a molécula deve estar totalmente na sua forma molecular ou ionizada (definido conforme o tipo de coluna e técnica cromatográfica que será utilizada), além da solubilidade e a lipofilicidade (Log P) da molécula que permite definir o tipo e a proporção do solvente que se deve utilizar nas etapas de extração da amostra e separação cromatográfica.

## 4.1. Losartana Potássica

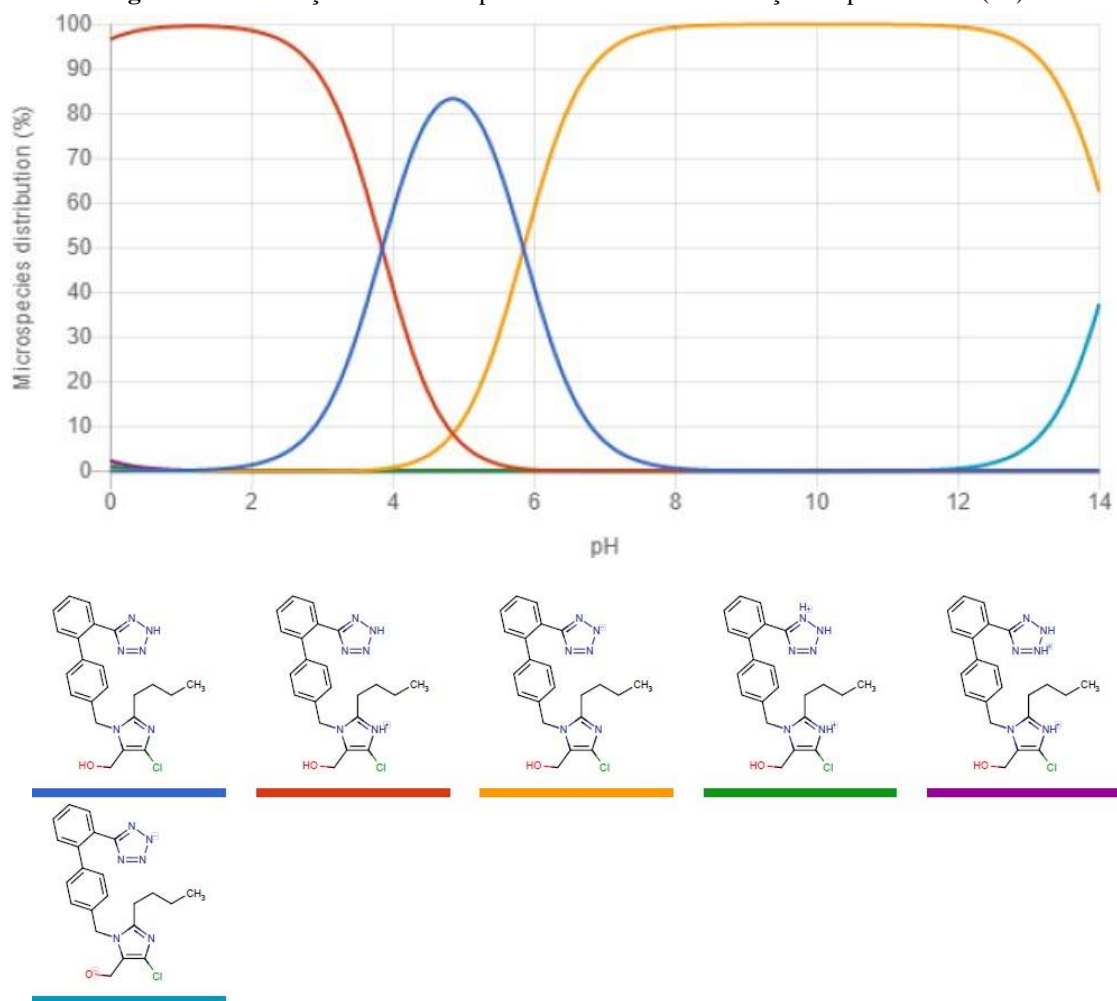
**Tabela 3.** Características da Losartana e das principais impurezas (21)

Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa exata	pKa	pH	Log D
LOS	124750-99-8		C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>6</sub> O	422,1622	5,85 e 3,85	1,7	3,42
						4,6	5,00
						6,5	4,40
						7,4	3,82
						8,0	3,63
						1,7	2,13
Impureza B (EP)	160514-13-6		C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	252,1011	5,85	4,6	1,64
						6,5	0,61
						7,4	0,53
						8,0	0,52
						1,7	2,55
Impureza C (EP)	114799-13-2		C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>6</sub> O	422,1622	5,85 e 4,72	4,6	3,40
						6,5	2,55
						7,4	2,48
						8,0	2,47
						1,7	0,77
Impureza D (EP)	83857-96-9		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	186,0560	9,43 e 3,31	4,6	2,11
						6,5	2,27
						7,4	2,26
						8,0	2,23
						1,7	3,41
Impureza E (EP)	120568-11-8		C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	236,1062	5,85	4,6	2,92
						6,5	1,89
						7,4	1,81
						8,0	1,81
						1,7	4,36
Impureza F (EP)	1332713-64-0		C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>6</sub> O	465,2091	5,85 e 3,85	6,5	4,31
						7,4	4,24
						8,0	4,23
						1,7	4,64
						4,6	4,64
						6,5	4,64
Impureza G (EP) - Trifenilmetanol	76-84-6		C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O	260,1201	12,74	7,4	4,64
						8,0	4,64

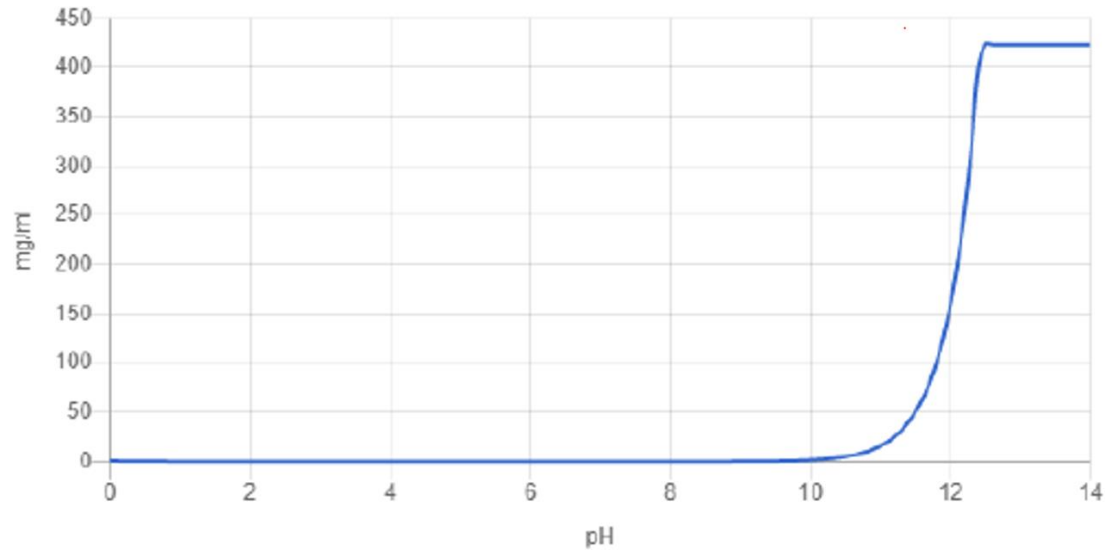


Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa exata	pKa	pH	log D
Impureza H (EP)	133909- 99-6		C <sub>41</sub> H <sub>37</sub> ClN <sub>6</sub> O	664,2717	14,22 e 3,85	1,7	8,70
						4,6	10,29
						6,5	10,36
						7,4	10,36
Impureza I (EP)	1006062- 28-7		C <sub>41</sub> H <sub>37</sub> ClN <sub>6</sub> O	665,2717	5,85 e 3,85	1,7	8,74
						4,6	9,69
						6,5	8,69
						7,4	8,62
Impureza J (EP)	1006062- 27-6		C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	464,1727	5,85 e 3,84	1,7	3,38
						4,6	4,33
						6,5	3,33
						7,4	3,26
Impureza K (EP)	114798- 36-6		C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>6</sub> O	420,1465	5,85 e 2,83	1,7	3,87
						4,6	4,40
						6,5	3,37
						7,4	3,30
Impureza L (EP)	230971- 71-8		C <sub>44</sub> H <sub>44</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>12</sub> O	826,3138	5,85 e 5,85	4,6	8,88
						6,5	7,95
						7,4	7,88
						8,0	7,87
Impureza M (EP)	230971- 72-9		C <sub>44</sub> H <sub>44</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>12</sub> O	827,3138	5,85 e 4,28	4,6	9,72
						6,5	8,82
						7,4	8,76
						8,0	8,75

**Figura 2.** Distribuição das microespécies de Losartana em função do pH do meio (21)

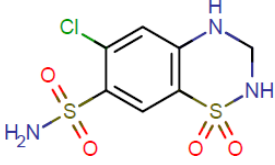
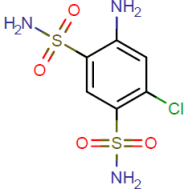
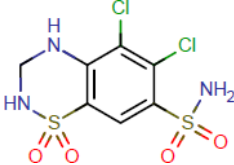
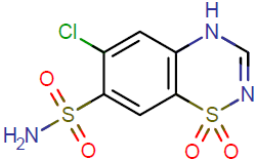
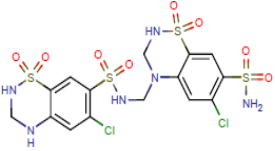


**Figura 3.** Solubilidade da Losartana (mg/mL) em função do pH (21)

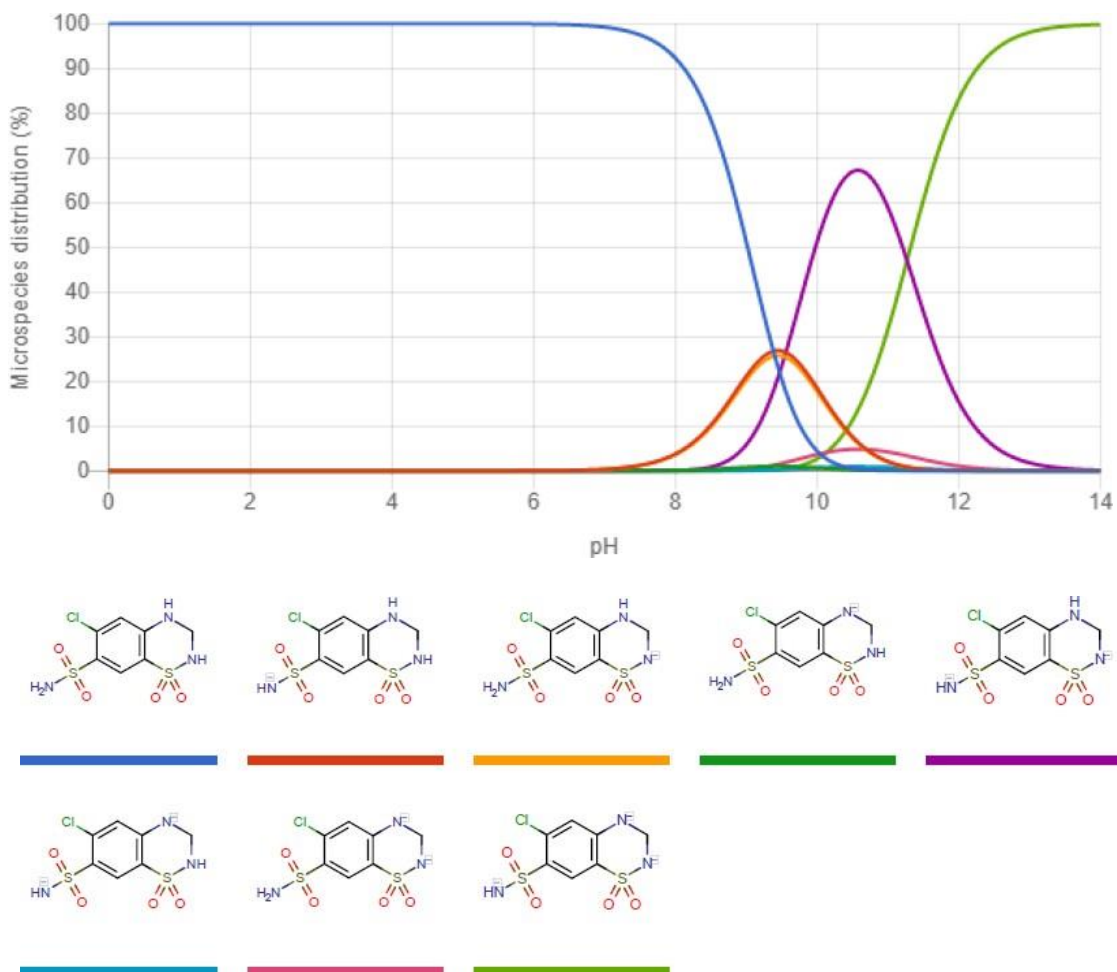


## 4.2. Hidroclorotiazida

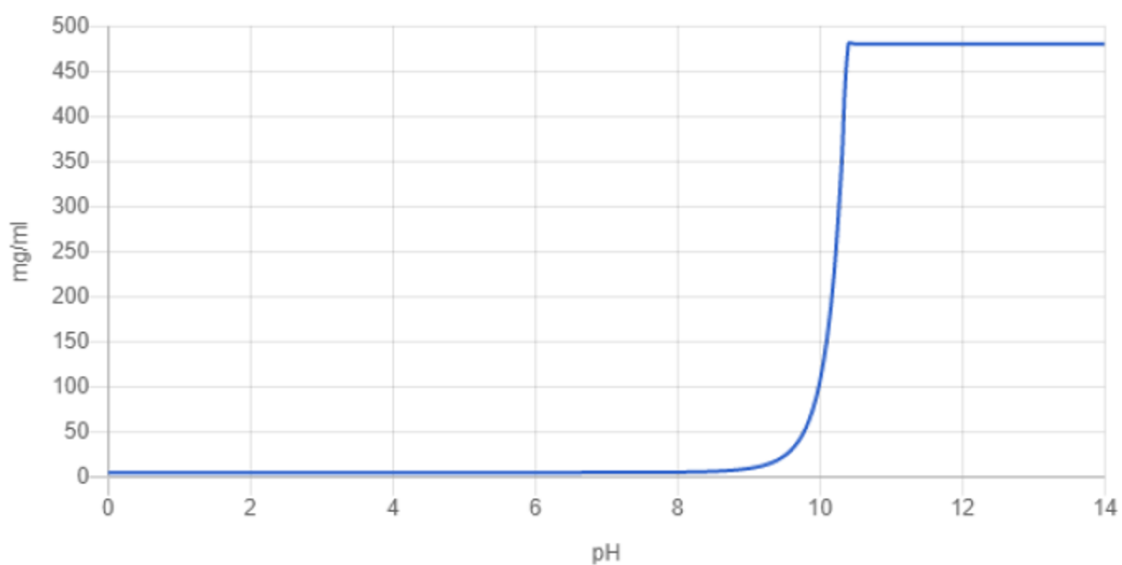
**Tabela 4.** Características da Hidroclorotiazida e das principais impurezas (21)

Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa exata	pKa	pH	logD
HCTL	58-93-5		C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	297,9645	9,09	1,7	-0,58
						4,6	-0,58
						6,5	-0,58
						7,4	-0,58
						8,0	-0,61
Benzotiazina Composto Relacionado A  (USP)	27907- 29-5		C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	284,9645	9,19	1,7	-1,04
						4,6	-1,04
						6,5	-1,04
						7,4	-1,05
						8,0	-1,06
5- clorohidrocloro tiazida (USP)	5233-42- 1		C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	330,9255	8,44	1,7	0,03
						4,6	0,03
						6,5	0,02
						7,4	-0,01
						8,0	-0,10
Clorotiazida (USP)	58-94-6		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	294,9488	9,19	1,7	-0,44
						4,6	-0,44
						6,5	-0,44
						7,4	-0,45
						8,0	-0,47
Dímero Hidroclorotiazida (USP)	407274- 96-8		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	605,9289	8,74	1,7	-0,35
						4,6	-0,35
						6,5	-0,36
						7,4	-0,37
						8,0	-0,42

**Figura 4.** Distribuição das microespécies de Hidroclorotiazida em função do pH do meio (21)



**Figura 5.** Solubilidade da Hidroclorotiazida (mg/mL) em função do pH (21)



### 4.3. Literatura disponível

Para definir as condições iniciais do método analítico foi realizado um levantamento bibliográfico das propriedades físico-químicas (apresentadas nas tabelas 3 e 4 e nas figuras 2, 3, 4 e 5) referentes aos ativos e de suas impurezas conhecidas e de metodologias analíticas para teor e produtos de degradação em *sites* especializados, compêndios oficiais e literatura científica dos quais mostraram-se potenciais métodos capazes de serem adaptados para a utilização da técnica de cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas, apresentados nas tabelas abaixo.

**Tabela 5.** Métodos para Losartana matéria-prima encontrados em monografias oficiais

<b>Parâmetros</b>	<b>Farmacopeia Americana (2020)</b>	<b>Farmacopeia Britânica (BP, 2019)</b>				
<b>Fase Móvel</b>	FMA: 0,1% Ácido fosfórico em água FMB: ACN	FMA: 0,1% Ácido fosfórico em água FMB: Acetonitrila				
<b>Diluyente</b>	Metanol	Metanol				
<b>Coluna</b>	4,0mm x 250mm C18	4,6mm x 250mm x 5µm C18				
<b>Condição</b>	Gradiente					
	Tempo (min)	FM A (%)	FM B (%)	Tempo (min)	Gradiente FM A (%)	FM B (%)
	0	75	25	0 – 5	75	25
	25	10	90	5 – 30	75 - 10	25 – 90
	35	10	90	30 – 40	10	90
	45	75	25			
50	75	25				
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min	1,3 mL/min				
<b>Tempo</b>	50 minutos	40 minutos				
<b>Injeção</b>	10 µL	10 µL				
<b>Temperatura</b>	25°C	35°C				
<b>Detecção</b>	220 nm	220 nm				

FM: Fase Móvel

**Tabela 6.** Métodos de impurezas para Hidroclorotiazida matéria-prima encontrados em monografias oficiais

<b>Parâmetros</b>	<b>Farmacopeia Americana (2020)</b>	<b>Farmacopeia Britânica (BP, 2019)</b>				
<b>Fase Móvel</b>	FMA: ACN e Metanol (75:25) FMB: Ácido Fórmico em água (5 em 1000)	FM A: Tampão Fosfato pH 3,2 : Metanol : THF (940:60:10) FM B: Metanol : Tampão Fosfato pH 3,2 : THF (50:50:5)				
<b>Diluyente</b>	Acetonitrila e Tampão Fosfato de Sódio Monobásico 2,76g/L pH 2,7 (30:70)	Metanol, Acetonitrila e Tampão Fosfato pH 3,2				
<b>Coluna</b>	4,6mm x 50mm x 3,5µm C18	4,6mm x 100mm x 3µm C18				
<b>Condição</b>	Gradiente					
	Tempo (min)	FM A (%)	FM B (%)	Tempo (min)	Gradiente FM A (%)	FM B (%)
	0	3	97	0 – 17	100 - 55	0 - 45
	5	3	97	5 – 30	55	45
	14	36	64			
	18	3	97			
20	3	97				
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min	0,8 mL/min				
<b>Tempo</b>	20 minutos	30 minutos				
<b>Injeção</b>	10 µL	10 µL				
<b>Temperatura</b>	35°C	25°C				
<b>Detecção</b>	275 nm	224 nm				

FM: Fase Móvel e THF: Tetrahydrofurano



**Tabela 7.** Métodos para Hidroclorotiazida, Valsartana e Anlodipino encontrados em literatura

Parâmetros	Aplicação de um método LC-MS/MS para a análise de Anlodipino, Valsartana e Hidroclorotiazida (J. V. Shah – 2017)	Determinação simultânea de Hidroclorotiazida, Valsartana e Anlodipino. (S. G. Gadepalli – 2013)
Fase Móvel	Acetonitrila : Formiato de amônio 2mM pH 4,0 (90:10)	Ácido Fórmico 0,1% : Acetonitrila (50:50)
Diluyente	Metanol	Acetonitrila
Coluna	Chromolith RP18 (100mm x 4,6mm)	Aquasil C18 (50mm x 2,1mm x 5µm)
Condição	Isocrático	Isocrático
Fluxo	1,0 mL/min	0,2 mL/min
Tempo	2,5 minutos	3 minutos
Injeção	5 µL	20 µL
Temperatura	35°C	20°C
Deteção	235 nm	228 nm

## 5. Definição das condições iniciais da metodologia

Para iniciar o estudo optou-se como método base o apresentado para determinação de produtos de degradação de Hidroclorotiazida da Farmacopeia Americana (USP), indicado na Tabela 6, uma vez que nessa metodologia faz-se o uso de reagentes voláteis utilizados no preparo das fases móveis, com isso torna-se possível acoplar a cromatografia líquida ao espectrômetro de massas. Além disso, a fase móvel A é composta por ácido fórmico 0,5% em água, o que garante um pH próximo de 2,0 à essa solução, o que do ponto de vista da cromatografia é vantajoso, uma vez que nessa faixa de pH ambas as moléculas se encontram-se majoritariamente como uma única microespécie, como pode-se observar nas Figura 3 e Figura 4, estando a LOS em sua forma ionizada (carga nominal +1) e a HCTZ em sua forma neutra (carga nominal 0).

A metodologia da farmacopeia parece ser bastante promissora para se alcançar o propósito final do método a ser desenvolvido, tendo em vista que nesse método já se tornar possível a separação e a quantificação os produtos de degradação da HCTZ, além da possibilidade de acoplamento ao espectrômetro de massas. Porém, como o método da USP não foi desenvolvido para a associação da HCTZ com a LOS e seus respectivos

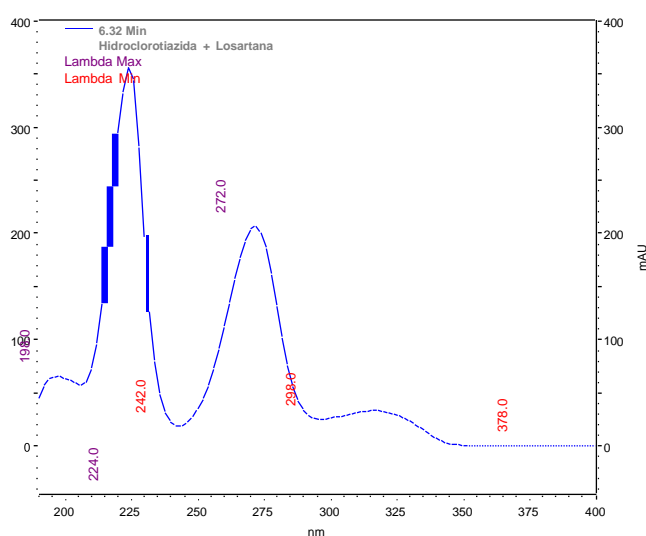
produtos de degradação, percebeu-se a necessidade de realizar alguns ajustes para que o método seja aplicável ao produto acabado em questão.

A primeira alteração proposta foi referente a coluna cromatográfica, optando-se por uma coluna X-Bridge C18 com comprimento de 15 centímetros ao invés de 5 centímetros, devido à esse tipo de coluna suportar uma ampla faixa de pH (1-12) com alta estabilidade, alta eficiência e ótima simetria de pico devido a tecnologia BEH (ponte de Etileno híbrido), que garante às partículas alta resistência em faixas críticas de temperatura e pH. (22).

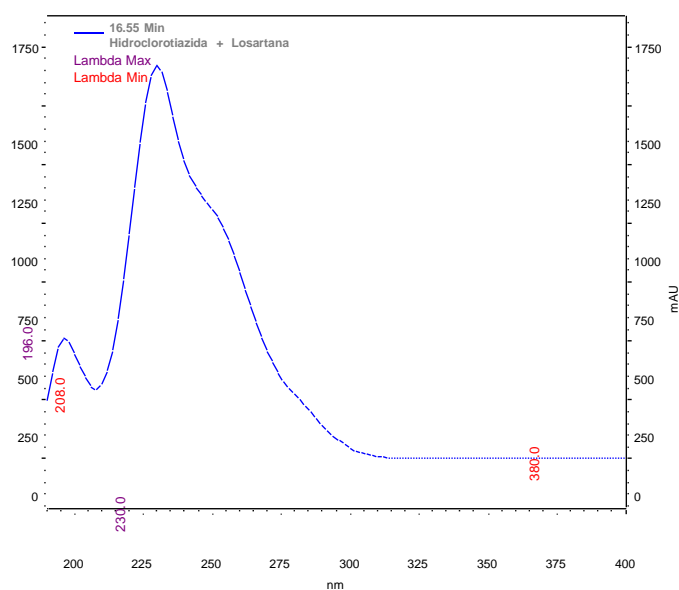
O gradiente e a proporção de acetonitrila (85% de acetonitrila para 15% de metanol) na fase móvel B foram alterados. Como a LOS possui um valor de LogP alto, faz com que essa molécula tenha uma forte afinidade pela fase estacionária apolar. Com isso, para favorecer a sua eluição é necessário o aumento da concentração solvente orgânico ao longo da corrida cromatográfica a fim de se conseguir a eluição da LOS em um menor tempo de corrida (23).

Apesar do comprimento de onda de absorção máximo dentro do espectro de ultravioleta serem diferentes de uma molécula para outra (como pode-se observar nas figuras 6 e 7). Optou-se por seguir com o comprimento de onda já estabelecido no método da farmacopeia (275nm), uma vez que no produto que se deseja quantificar esses ativos a concentração da LOS está quatro vezes maior em relação a concentração da HCTZ, dessa forma, pode-se garantir que ambos os ativos serão detectados no detector arranjo de diodo.

**Figura 6.** Comprimentos de onda máximos da HCTZ (224nm e 272nm)



**Figura 7.** Comprimentos de onda máximos da LOS (230nm)



Com base nas informações e justificativas apresentadas para as devidas mudanças da metodologia da farmacopeia, propôs-se o método descrito a seguir como condição inicial do estudo:

**Diluyente:**

Água e acetonitrila (80:20)

**Fase Móvel A:**

Ácido Fórmico em água (5 em 1000)

**Fase Móvel B:**

Acetonitrila e Metanol (85:15)

**Solução padrão:**

Pesar aproximadamente cerca de 50 mg de Losartana Potássica padrão de referência e 12,5 mg de Hidroclorotiazida padrão de referência para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionar 15 mL de diluyente e levar a banho de ultrassom por 10 minutos. Completar o volume do balão com diluyente, homogeneizar e filtrar através de membrana PDVF 0,45µm para um *vial* de HPLC.

**Solução amostra:**

Pesar aproximadamente cerca de 160 mg de amostra triturada para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionar 15 mL de diluente e levar a banho de ultrassom por 10 minutos. Completar o volume do balão com diluente, homogeneizar e filtrar através de membrana para um *vial* de HPLC.

**Condições Cromatográficas:**

Equipamento: HPLC

Coluna: XBridge C18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm)

Temperatura da coluna: 35°C

Temperatura do rack de vials: 15°C

Detector: UV 275 nm

Fluxo: 1,0 mL/minuto

Volume de injeção: 10 µL

Tipo de eluição: Gradiente

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0,0	97	3
5,0	97	3
25,0	20	80
35,0	20	80
37,0	97	3
42,0	97	3

Para seguir com a etapa de triagem, definir os ATPs da metodologia, selecionar as melhores soluções para se avaliar cada uma das respostas, predizer os potenciais produtos de degradação de cada ativo, as amostras de matérias primas isoladas e associadas, além do medicamento e placebo foram expostas às seguintes condições de estresse:

**Tabela 8.** Condições de estresse das amostras estudadas

Tipo de estresse	Agente degradante	Concentração do agente degradante	Tempo de exposição	Condição de temperatura	Uso de co-solvente
Hidrólise ácida	HCl	1,0M	3 dias	70°C	Acetonitrila
Hidrólise alcalina	NaOH	1,0M	3 dias	70°C	Acetonitrila
Oxidação	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30%	3 dias	TA	Acetonitrila
Degradação por íons metálicos	Fe <sub>3</sub>	0,05M	1 dia	TA	Acetonitrila
Térmica seca	70°C ± 5°C	NA	16 dias	70°C	NA
Térmica úmida	70°C ± 5°C 90% ± 5%UR	NA	16 dias	70°C	NA
Fotólise	Branca: 2 ciclos (2 x 1200 klux/h) UV: 2 ciclos (2 x 200 Watt.hora/m <sup>2</sup> )	NA	13 dias	TA	NA

TA: temperatura ambiente, NA: não se aplica, UR: umidade relativa

## 6. Delineamentos Experimentais

### 6.1. Triagem

O principal objetivo da etapa de triagem dentro do desenvolvimento do método analítico é poder avaliar a relevância (significância) dos fatores estudados em relação as respostas observadas ao longo dos experimentos delineados, para posteriormente seguir com a otimização apenas dos fatores mais significativos da metodologia analítica.

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental do tipo Plackett-Burman, com 11 fatores e 2 níveis, pelo qual foi possível avaliar inúmeras variáveis e determinar suas significâncias em relação as respostas.

As respostas avaliadas e as respectivas amostras analisadas nesse estudo estão indicadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Respostas avaliadas no delineamento experimental para o método

Ref.	Resposta	Tipo de Amostra
R1	Resolução Impureza B – LOS e Dímero HCTZ	Mistura de padrões de impureza e ativos
R2	Sinal Ruído HCTZ	Mistura de padrões de ativos 0,1%
R3	Sinal Ruído LOS	Mistura de padrões de ativos 0,1%
R4	Resolução Impureza C – LOS e Impureza D - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativos
R5	Resolução Diluente 2 e Impureza M - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativos
R6	Resolução Diluente 1 e Impureza G - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativos
R7	Pratos Teóricos HCTZ	Solução Amostra
R8	Pratos Teóricos LOS	Solução Amostra
R9	Assimetria HCTZ	Solução Amostra
R10	Assimetria LOS	Solução Amostra
R11	Resolução Impureza anterior e HCTZ	Amostra de degradação ácida
R12	Resolução Impureza posterior e HCTZ	Amostra de degradação ácida
R13	Resolução Impureza anterior e LOS	Amostra de degradação ácida
R14	Resolução Impureza anterior e HCTZ	Amostra de degradação oxidativa
R15	Resolução Impureza anterior e LOS	Amostra de degradação oxidativa
R16	Linha de Base	Mistura de padrões de ativos 0,1%

Ref. = Referência

### 6.1.1 Criação dos experimentos

O delineamento experimental do tipo Plackett-Burman, com 11 fatores e 2 níveis, foi proposto segundo os fatores indicados na Tabela 10 e os experimentos indicados na Tabela 11, respectivamente.

**Tabela 10.** Variáveis avaliadas no delineamento experimental para método

Ref.	Nome	Unidade	Inferior	Superior
A	Tampão	Texto	Sem	Formiato Amônio 10mM
B	% Ácido Fórmico (FMA)	%	0,1	0,5
C	% Acetonitrila (FMB)	%	80	90
D	Temperatura	°C	30	40
E	Volume de Injeção	µL	5	15
F	Tempo de Isocrático Inicial	minutos	2	7
G	% FMA Inicial	%	92	98
H	Fluxo	mL/min	0,8	1,2
J	Tempo de gradiente	minutos	15	25
K	% FMA Final	minutos	15	25

Ref. = Referência e FM = Fase Móvel

**Tabela 11.** Experimentos para o delineamento de triagem

Variável Exp.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K
1	Sem	0,1	80	30	5	2	92	0,8	15	15
2	Sem	0,1	80	40	15	7	92	1,2	25	15
3	Sem	0,1	90	40	15	2	98	1,2	15	25
4	Sem	0,5	80	30	5	7	98	1,2	15	25
5	Sem	0,5	90	40	5	7	98	0,8	25	15
6	Sem	0,5	90	30	15	2	92	0,8	25	25
7	Formiato 10 mM	0,1	80	30	15	7	98	0,8	25	25
8	Formiato 10 mM	0,1	90	30	5	2	98	1,2	25	15
9	Formiato 10 mM	0,1	90	40	5	7	92	0,8	15	25
10	Formiato 10 mM	0,5	80	40	15	2	98	0,8	15	15
11	Formiato 10 mM	0,5	80	40	5	2	92	1,2	25	25
12	Formiato 10 mM	0,5	90	30	15	7	92	1,2	15	15

### 6.1.2 Resultados e discussão

Após a execução dos experimentos delineados na Tabela 11, as respostas obtidas para cada experimento realizado foram plotadas no software Minitab 21 (como indicadas na Tabela 12) para posterior análise estatística.

**Tabela 12.** Resultados

Resp Exp	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16
1	1,58	322,4	58,9	7,82	0,00	3,05	68179	280544	1,22	1,00	2,76	2,93	2,70	1,27	1,80	10
2	9,23	292,5	226,6	1,63	10,57	0,00	7772	355261	1,24	0,75	1,65	3,56	2,93	1,28	2,96	10
3	4,35	686,1	554,4	4,77	3,45	1,12	43495	219952	1,17	0,75	1,38	3,59	2,77	1,42	3,26	10
4	3,58	78,4	163,7	4,07	2,96	1,35	13879	653031	1,23	0,91	1,60	7,42	2,01	2,68	5,48	10
5	5,08	95,1	177,1	5,41	1,29	1,39	13209	549305	1,29	0,87	1,54	6,64	1,99	2,01	4,15	10
6	0,00	591,1	449,4	4,39	1,21	1,42	26042	146219	1,28	0,74	2,41	2,78	2,32	1,22	2,31	10
7	1,31	445,2	0,0	8,38	4,32	1,14	38214	447555	1,25	0,88	1,59	5,15	1,79	2,28	1,77	0
8	0,88	208,9	0,0	9,59	6,83	0,00	76187	424859	1,11	0,92	2,11	4,45	2,12	1,66	2,08	0
9	2,62	134,1	142,4	4,89	0,00	2,64	13995	559568	1,29	0,97	2,41	4,37	2,26	1,30	2,24	0
10	5,15	870,9	1043,6	3,47	0,00	2,43	46070	260663	1,23	0,92	1,53	2,81	2,59	1,32	3,77	0
11	9,83	162,5	94,8	6,13	12,05	0,00	16497	320713	1,22	0,94	2,22	4,09	3,09	1,37	3,86	0
12	1,26	287,3	490,2	0,00	1,81	2,03	9612	453524	1,27	0,83	2,19	4,10	3,33	1,39	2,02	0

### 6.1.2.1 Análise de variância (ANOVA) e regressão

A ANOVA é a ferramenta que permite comparar a variabilidade referente ao tratamento (variação do nível dos fatores) com a variabilidade referente ao erro residual. Com base nessa comparação foi possível determinar quais foram as variáveis relevantes para cada resposta obtida experimentalmente.

Os p-valores determinaram se os fatores avaliados foram relevantes ou não para a resposta observada. Quando o p-valor encontrado foi menor do que 0,05 considerou-se que o fator foi significativamente diferente de 0, conseqüentemente a resposta obtida experimentalmente foi afetada pela variação do nível desse. Por outro lado, quando o p-valor foi maior que 0,05 significa que a resposta não foi afetada pela variação do nível do fator, sendo assim o mesmo não foi significativo para a resposta avaliada.

Nessa primeira etapa não foram avaliados os critérios de aceitação para o modelo matemático, pois ainda poderiam ser incluídos termos de interação e/ou quadráticos durante a etapa de otimização para o ajuste correto do modelo.

**Tabela 13.** p-valores obtidos para cada resposta avaliada na ANOVA.

Ref.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16
A	0,390	0,763	-	-	0,152	-	0,118	0,104	0,198	0,010	0,027	0,131	-	0,246	0,135	-
B	0,240	-	0,093	0,039	0,144	0,401	0,027	0,407	0,017	0,312	0,046	0,040	0,457	0,152	0,050	-
C	0,075	0,309	0,679	-	0,056	0,424	0,368	0,736	0,592	0,019	0,028	-	-	0,074	0,175	-
D	0,045	0,133	0,149	0,133	0,084	0,156	0,037	0,267	0,127	0,216	0,010	0,153	0,225	0,035	0,110	-
E	0,452	0,003	0,046	0,029	0,415	0,692	0,108	0,010	0,127	0,004	0,010	0,010	0,179	0,057	0,179	-
F	0,628	0,007	0,167	0,056	0,306	0,490	0,019	0,005	0,009	0,312	0,013	0,005	0,247	0,016	0,468	-
G	0,278	0,042	0,418	0,068	0,125	0,114	0,038	0,041	0,017	-	0,005	0,009	0,033	0,009	0,092	-
H	0,092	0,027	0,543	0,126	0,028	0,007	0,087	0,184	0,010	0,025	0,018	0,084	0,062	-	0,172	-
J	0,156	0,043	0,085	0,073	0,031	0,005	0,188	0,184	-	0,025	0,054	0,206	0,210	0,331	-	-
K	0,585	0,886	0,335	0,311	0,235	0,191	0,049	-	0,127	0,155	0,111	0,066	0,210	0,060	0,342	-

### 6.1.2.2 Parâmetros críticos

Para determinar os fatores significativos do delineamento no desenvolvimento do método em questão fez a avaliação do gráfico de Pareto, obtidos pela análise dos modelos de cada uma das respostas selecionadas (R1 ao R16). Esses gráficos, por sua vez, demonstram os valores absolutos dos efeitos padronizados (do maior ao menor efeito). Esses efeitos são estatística t que testam a hipótese nula de que o efeito é 0, para isso, o gráfico de Pareto delimita uma linha de referência para indicar quais fatores são estatisticamente significativos, ou seja, as barras que ultrapassam essa linha são correspondentes aos fatores que afetam significativamente a resposta avaliada (24).



Além disso, através da avaliação dos gráficos de efeitos principais, pode-se verificar o sentido em que cada fator afeta a resposta, ou seja, se o aumento do nível do fator (de -1 para +1) aumenta ou diminui a resposta.

Para a resposta R1, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que o único fator significativo é a temperatura (D). Através do gráfico fatorial (Figura 9) foi possível observar que o aumento da temperatura favorece o aumento da resolução entre a Impureza B de LOS e o Dímero de HCTZ.

Para a resposta R2, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes para essa resposta foram: Volume de injeção (E), tempo de isocrático inicial (F), fluxo (H), proporção de fase móvel A inicial (G) e o tempo de gradiente (H), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite avaliar que aumentando o volume de injeção, diminuindo o tempo de isocrático inicial, diminuindo o fluxo, aumentando a porcentagem de fase móvel A inicial e diminuindo o tempo de gradiente, aumenta-se o valor de sinal/ruído do pico referente a HCTZ.

Para a resposta R3, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que o fator significativo para essa resposta é o volume de injeção (E). O Gráfico Fatorial (Figura 9) permite observar que aumentando o volume de injeção, aumenta-se o valor de sinal/ruído do pico referente a LOS.

Para a resposta R4, observou-se através gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes foram: Volume de injeção (E) e a concentração de ácido fórmico na fase móvel A (B), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que diminuindo o volume de injeção e diminuindo a concentração de ácido fórmico na fase móvel A, aumenta-se a resolução entre a Impureza C de LOS e a Impureza D de LOS.

Para a resposta R5, observou-se através gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes para essa resposta foram: fluxo (H) e o tempo de gradiente (J), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite avaliar que aumentando o fluxo e o tempo de gradiente, aumenta-se a resolução entre a Impureza M de LOS e o segundo pico de interferente do diluente.

Para a resposta R6, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes foram: tempo de gradiente (J) e o fluxo (H), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que diminuindo o tempo de gradiente e o fluxo, aumenta-se a resolução entre a Impureza G de LOS e o primeiro pico de interferente do diluente.

Para a resposta R7, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes para essa resposta foram: tempo de isocrático inicial (F), concentração de ácido fórmico na fase móvel A (B), temperatura (D), proporção de fase móvel A inicial (G), e a proporção de fase móvel A final (K), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que diminuindo o tempo de isocrático inicial, diminuindo a concentração de ácido fórmico na fase móvel A, diminuindo a temperatura, aumentando a proporção de fase móvel A inicial, diminuindo a proporção de fase móvel A final e diminuindo o fluxo, aumenta-se o valor de pratos teóricos para HCTZ.

Para a resposta R8, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes foram: tempo de isocrático inicial (F) e o volume de injeção (E), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que aumentando o tempo de isocrático inicial e diminuindo o volume de injeção, aumenta-se o valor de pratos teóricos para LOS.

Para a resposta R9, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes para essa resposta foram: tempo de isocrático inicial (F), fluxo (H), concentração de ácido fórmico na fase móvel A (B) e a proporção de fase móvel A inicial (G), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que diminuindo o tempo de isocrático inicial, aumentando o fluxo, aumentando a concentração de ácido fórmico na fase móvel A e diminuindo a proporção de fase móvel A inicial, melhora a assimetria de pico para HCTZ.

Para a resposta R10, observou-se através dos gráficos normal (Figura 8) e de Pareto (Figura 44) que os fatores relevantes para essa resposta foram: volume de injeção (E), tampão (A), proporção de acetonitrila na fase móvel B (C), fluxo (H) e o tempo de gradiente (J), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite avaliar que diminuindo o volume de injeção, adicionando tampão formiato 10 mM, diminuindo a porcentagem de acetonitrila na fase móvel B, diminuindo o fluxo e o tempo de gradiente, aumenta-se o valor da assimetria de pico para LOS.

Para a resposta R11, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes foram: proporção de fase móvel A inicial (G), temperatura (D), volume de injeção (E), tempo de isocrático inicial (F), fluxo (H), tampão (A), proporção de acetonitrila na fase móvel B (C), e a concentração de ácido fórmico na fase móvel A, em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite avaliar que diminuindo a proporção de fase móvel A inicial, a temperatura, o volume de injeção, o tempo de isocrático inicial, o fluxo e a concentração de ácido fórmico na fase móvel A,

aumentando a proporção de acetonitrila na fase móvel B e adicionando tampão formiato 10mM, aumenta-se a resolução entre a HCTZ e a sua impureza de degradação ácida anterior mais próxima.

Para a resposta R12, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes para essa resposta foram: tempo de isocrático inicial (F), proporção de fase móvel A inicial (G), volume de injeção (E) e a concentração de Ácido Fórmico na fase móvel A (B), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que aumentando o tempo de isocrático inicial, a temperatura, a proporção de fase móvel A inicial, a concentração de Ácido Fórmico na fase móvel A e diminuindo o volume de injeção, aumenta-se a resolução entre a HCTZ e a sua impureza de degradação ácida posterior mais próxima.

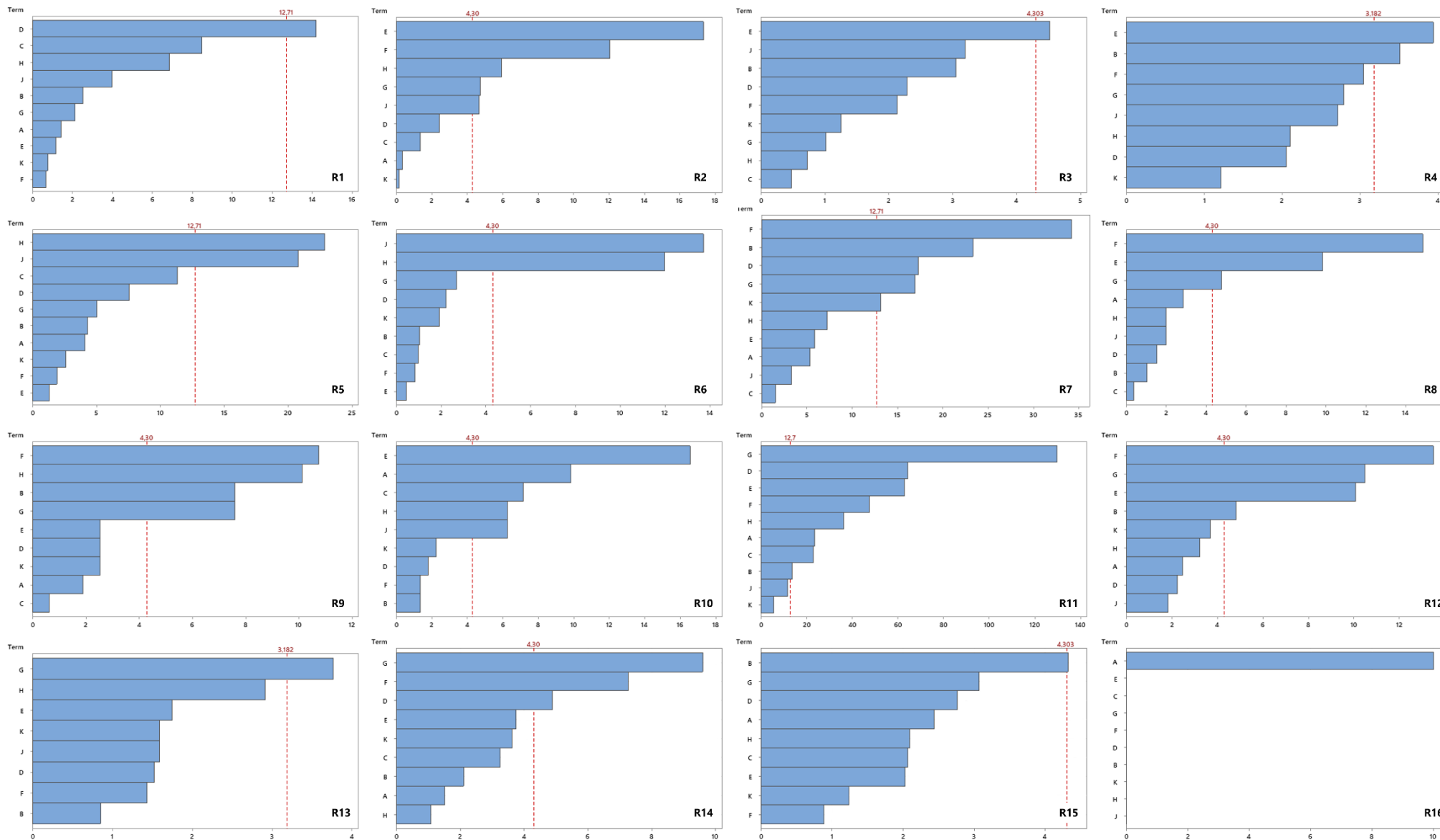
Para a resposta R13, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que o único fator relevante para essa resposta foi: a proporção de fase móvel A inicial (G). O gráfico fatorial (Figura 9) permite avaliar que diminuindo a porcentagem de fase móvel A inicial, aumenta-se a resolução entre a Losartana Potássica e a sua impureza de degradação ácida anterior mais próxima.

Para a resposta R14, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que os fatores relevantes para essa resposta foram: proporção de fase móvel A inicial (G), tempo de isocrático inicial (F) e a temperatura (D), em ordem decrescente de relevância. O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que aumentando a proporção de fase móvel A inicial, o tempo de isocrático inicial e diminuindo a temperatura, aumenta-se a resolução entre a HCTZ e a sua impureza de degradação oxidativa anterior mais próxima.

Para a resposta R15, observou-se através gráfico de Pareto (Figura 8) que o único fator relevante para essa resposta foi: a concentração de ácido fórmico na fase móvel A inicial (B). O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que aumentando a concentração de ácido fórmico na fase móvel A inicial, aumenta-se a resolução entre a LOS e a sua impureza de degradação oxidativa anterior mais próxima.

Para a resposta R16, observou-se através do gráfico de Pareto (Figura 8) que o único fator relevante para essa resposta foi: a presença ou não de tampão na fase móvel A (A). O gráfico fatorial (Figura 9) permite observar que sem o tampão formiato de amônio na fase móvel A, aumenta-se a estabilidade da linha de base.

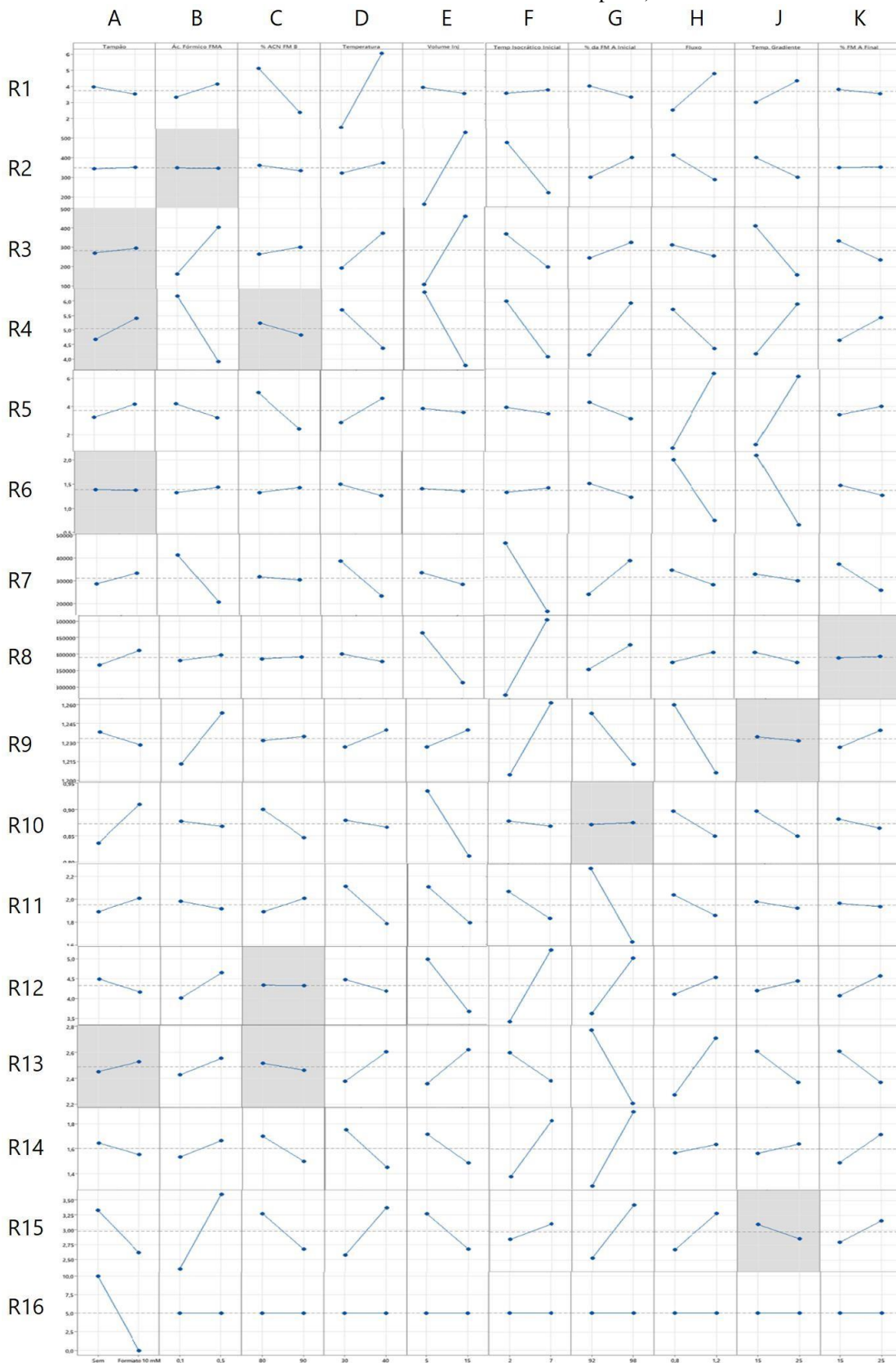
**Figura 8.** Gráfico de Pareto para as respostas R1 a R16 em função dos fatores A a H.



Legenda: A (tampão), B (concentração de ácido fórmico na fase móvel A), C (proporção de acetonitrila na fase móvel B), D (temperatura), E (volume de injeção), F (tempo de isocrático)

inicial), G (proporção de fase móvel A inicial), H (fluxo), J (tempo de gradiente) e K (proporção de fase móvel A final).

**Figura 9.** Gráfico fatorial para as respostas R1 a R16 em função dos fatores A a K (fatores em cinza não foram considerados no modelo da resposta).



### 6.1.2.3 Considerações finais

O parâmetro concentração do tampão da fase móvel (A) se mostrou relevante para três respostas (R10, R11 e R16), sendo este o fator mais relevante para estabilidade de linha de base. Quando não se utiliza o tampão formiato de amônio (10mM), melhora-se consideravelmente o ruído de linha de base, dessa forma optou-se por não utilizar tampão na metodologia. Apesar da presença do formiato de amônio apresentar melhoria em algumas respostas como assimetria do pico de LOS e resolução da impureza ácida anterior com a HCTZ, ainda assim, não foi o fator mais crítico para essas respostas.

A variável concentração de ácido fórmico na fase móvel A (B) mostrou ser relevante para cinco respostas (R4, R7, R9, R12 e R15), sendo que algumas dessas respostas são favorecidas com a concentração de 0,1% e para outras com a concentração de 0,5%. Dessa forma, optou-se por fixar a concentração em 0,3% (um valor intermediário, para que não prejudique nenhuma resposta na otimização, porém levando em consideração que a resposta mais crítica responde melhor com nível mais alto).

O fator concentração acetonitrila na fase móvel B (C) mostrou-se relevante para duas respostas avaliadas (R10 e R11). Porém, esse fator não foi significativamente crítico para essas respostas, sendo assim, optou-se por manter a concentração de 80% para prosseguir no estudo.

O parâmetro temperatura (D) mostrou-se bastante relevante para quatro respostas críticas avaliadas (R1, R7, R11 e R14). Quando se utiliza temperatura mais alta ocorre a melhora de R1, no entanto ocorre a piora das respostas R7, R11 e R14. Sendo assim, optou-se por considerar esse parâmetro na próxima etapa com os seguintes níveis: 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C.

O fator volume de injeção (E) mostrou ser importante para sete respostas (R2, R3, R4, R8, R10, R11 e R12). Quando se utiliza volumes de injeção mais altos melhora-se respostas como os valores de sinais ruído (R2 e R3), porém respostas como resolução entre impurezas muito próximas entre si (R4, R11 e R12) são melhoradas com volumes de injeção menores. Sendo assim, preferiu-se fixar esse parâmetro no valor médio (10 $\mu$ L) em relação aos que foram testados nessa etapa de triagem.

O parâmetro tempo de isocrático inicial (F) mostrou-se relevante para sete respostas avaliadas (R2, R7, R8, R9, R11, R12 e R14). Além disso, esse fator foi significativo para duas respostas críticas (R14 e R16) que respondem melhor no nível mais alto avaliado (7 minutos). As demais respostas serão otimizadas com outros fatores

na próxima etapa de otimização. Sendo assim, fixou-se 7 minutos para o tempo de isocrático inicial.

A variável proporção de fase móvel A inicial (G) além de ser crítica para oito respostas (R2, R7, R8, R9, R11, R12, R13 e R14), também mostrou ser a mais relevante dentro de todos os fatores para três respostas (R11, R13 e R14). Sendo assim esse fator foi considerado o parâmetro mais importante do estudo. Quando se utiliza alta proporção de fase móvel A, melhora os resultados de R14, porém ocorre a piora das respostas R11 e R13. Logo, optou-se por considerar esse parâmetro na próxima etapa com os seguintes níveis: 90%, 92%, 94%, 96% e 98%.

O parâmetro fluxo (H) foi relevante para seis respostas (R2, R5, R6, R9, R10 e R11), sendo que esse fator influenciou de forma oposta algumas dessas respostas, como o caso de R5 e R6. Sendo assim, optou-se por considerar esse parâmetro na próxima etapa com os seguintes níveis: 0,80 mL/min, 0,95 mL/min, 1,10 mL/min, 1,25 mL/min e 1,40 mL/min.

O tempo de gradiente (J) foi relevante para cinco respostas avaliadas (R2, R5, R6, R7 e R10), sendo que esse fator influenciou de forma oposta algumas dessas respostas, como o caso de R5 e R6. Sendo assim, optou-se por considerar esse parâmetro na próxima etapa com os seguintes níveis: 9 minutos, 13 minutos, 17 minutos, 21 minutos e 25 minutos.

O fator proporção de fase móvel A final (K) não foi relevante para as respostas avaliadas. Sendo assim, optou-se por fixá-lo em 15% para a próxima etapa do estudo.

Logo, os parâmetros que foram mantidos fixos na etapa seguinte e seus valores foram:

**Tabela 14.** Fatores fixados para seguir com a etapa de otimização

Fator	Valor	Unidade
Tampão (A)	Sem adição de sal formiato de amônio	NA
Concentração de ácido fórmico FM A (B)	0,3	%
Concentração de acetonitrila na FM B (C)	80	%
Volume de injeção (E)	10	μL
Tempo de isocrático inicial (F)	7	minutos
Porporção de FM A final (K)	15	%

FM: Fase móvel, NA: Não se aplica

Por outro lado, os parâmetros escolhidos para serem estudados na próxima etapa (etapa de otimização) e seus respectivos níveis foram:



**Tabela 15.** Fatores testados na etapa de otimização

Fator	Valor	Unidade
Temperatura (D)	35, 40, 45, 50 e 55	°C
Proporção de FM A inicial (G)	90, 92, 94, 96 e 98	%
Fluxo (H)	0,80, 0,95, 1,10, 1,25 e 1,40	mL/min
Tempo de gradiente	9, 13, 17, 21 e 25	minutos

FM: Fase móvel, NA: Não se aplica

## 6.2. Otimização

O objetivo do delineamento experimental de otimização foi o desenvolvimento de um método para Teor e Produtos de Degradação de LOS e HCTZ em comprimidos revestidos 50mg/12,5mg e 100mg/25mg, capaz de separar os ativos e suas impurezas com seletividade, no menor tempo de corrida possível.

### 6.2.1 Respostas avaliadas

**Tabela 16.** Respostas avaliadas no delineamento experimental

Ref	Resposta	Tipo de Amostra	Meta
R4	Resolução Impureza C – LOS e Impureza D - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativo	$\geq 2,0$
R5	Resolução Diluente 3 e Impureza M - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativo	$\geq 1,5$
R6	Resolução Diluente 2 e Impureza G - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativo	$\geq 0,5$
R14	Resolução impureza anterior e HCTZ	Amostra de degradação oxidativa	$\geq 1,5$
R17	Resolução Diluente 4 e Impureza M - LOS	Mistura de padrões de impureza e ativo	$\geq 1,5$
R18	Separação HCTZ e Diluente (Max Plot)	Amostra Controle	$\geq 3,0$

Ref. = Referência, HCTZ = Hidroclorotiazida e LOS = Losartana Potássica

As respostas R1 (Resolução Impureza B – LOS e Dímero HCTZ), R2 (Sinal Ruído de Hidroclorotiazida), R3 (Sinal Ruído Losartana), R7 (Pratos Teóricos de Hidroclorotiazida), R8 (Pratos Teóricos de Losartana), R9 (Assimetria de Hidroclorotiazida), R10 (Assimetria de Losartana), R11 (Resolução da impureza anterior ácida e Hidroclorotiazida), R12 (Resolução da impureza ácida posterior e Hidroclorotiazida), R13 (Resolução da impureza ácida anterior e Losartana) R15

(Resolução da impureza anterior oxidativa e Losartana), R16 (linha de base) da Triagem não foram avaliadas estatisticamente na otimização, pois em todos os experimentos realizados na etapa de triagem foram obtidos resultados adequados.

As respostas R4 (Resolução Impureza C – LOS e Impureza D – LOS), R5 (Resolução Diluente 3 e Impureza M – LOS), R6 (Resolução Diluente 2 e Impureza G – LOS), R14 (Resolução impureza anterior e HCTZ), R17 (Resolução Diluente 4 e Impureza M – LOS) e R18 (Separação HCTZ e Diluente (Max Plot)) foram consideradas respostas afetadas pelos fatores estudados na etapa de triagem e, por esse motivo, foram consideradas como respostas críticas a serem estudadas no delineamento de otimização. Além disso, houve a necessidade de se monitorar 2 respostas adicionais (não consideradas na etapa de triagem), sendo identificadas como R17 (resolução entre o pico de diluente 3 e a impureza M de LOS) e R18 (separação entre a HCTZ e o pico de diluente observado no cromatograma de Max Plot).

## 6.2.2 Modelo experimental adotado

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental composto central (CCD) com 4 fatores e 5 níveis para o método, que permite modelar uma superfície resposta complexa e avaliar os fenômenos de interações.

## 6.2.3 Criação de experimentos

**Tabela 17.** Variáveis avaliadas no delineamento experimental (CCD)

Ref.	Nome	Unidade	Inferior	Superior
A	Temperatura	°C	40	50
B	% FM A Inicial	%	92	96
C	Fluxo	mL/min	0,95	1,25
D	Tempo de gradiente	minutos	13	21

Ref. = Referência, FM = fase móvel

**Tabela 18.** Experimentos

Exp.	Variável	A	B	C	D
1		45	94	1,10	17
2		45	94	1,10	17
3		45	90	1,10	17
4		40	92	0,95	13
5		40	92	0,95	21
6		40	92	1,25	13
7		40	92	1,25	21
8		50	92	0,95	13
9		50	92	0,95	21
10		50	92	1,25	13
11		50	92	1,25	21
12		35	94	1,10	17
13		45	94	0,80	17
14		45	94	1,10	9
15		45	94	1,10	17
16		45	94	1,10	17
17		45	94	1,10	17
18		45	94	1,10	25
19		45	94	1,40	17
20		55	94	1,10	17
21		40	96	0,95	13
22		40	96	0,95	21
23		40	96	1,25	13
24		40	96	1,25	21
25		50	96	0,95	13
26		50	96	0,95	21
27		50	96	1,25	13
28		50	96	1,25	21
29		45	98	1,10	17
30		45	94	1,10	17
31		45	94	1,10	17

Exp: experimento

#### 6.2.4 Resultados e discussão

Após a execução dos experimentos delineados na Tabela 18, as respostas obtidas para cada experimento realizado foram plotadas no software Minitab 17 para posterior análise estatística, conforme os resultados obtidos descritos na Tabela 19.

**Tabela 19.** Resultados da otimização

<b>Resposta</b> <b>Exp</b>	<b>R4</b>	<b>R6</b>	<b>R5</b>	<b>R17</b>	<b>R14</b>	<b>R18</b>
1	3,53	0,10	4,44	4,68	1,45	4,5668
2	3,62	0,10	4,48	4,59	1,46	4,5500
3	1,91	0,10	5,03	4,00	*	6,0300
4	6,32	*	0,00	6,71	1,38	4,1579
5	3,28	0,10	4,88	4,29	1,37	4,1120
6	4,06	1,15	3,57	5,14	1,38	4,4860
7	0,00	0,10	8,41	0,00	1,37	4,6316
8	5,81	1,42	2,19	6,12	0,10	5,1059
9	2,62	0,10	6,82	2,13	0,10	5,1621
10	3,19	0,10	4,85	3,45	0,10	5,5098
11	0,00	0,10	9,78	0,00	0,10	5,5232
12	4,59	1,20	3,89	5,29	*	2,3124
13	6,81	1,55	2,02	6,44	1,59	2,2527
14	7,61	2,71	0,00	7,47	1,48	3,9237
15	3,96	0,10	5,36	3,42	1,47	3,9804
16	3,94	0,10	5,36	3,45	1,47	4,1113
17	3,92	0,10	5,35	3,38	1,47	4,2012
18	0,00	0,10	9,32	0,00	1,48	4,3828
19	1,50	0,10	8,07	0,00	1,44	4,5744
20	3,10	0,10	6,71	2,07	*	5,2873
21	7,91	*	0,00	8,78	2,40	0,0000
22	5,01	0,10	4,95	4,33	2,37	0,1174
23	5,76	1,32	3,18	5,55	2,22	1,9714
24	2,20	0,10	7,85	1,86	2,16	2,1246
25	7,53	1,56	1,55	7,15	1,78	2,4186
26	4,51	0,10	6,13	2,88	1,79	2,5574
27	5,25	*	4,21	4,32	1,67	3,7564
28	1,75	0,10	9,35	1,17	1,70	3,8066
29	5,46	0,10	4,58	4,42	*	0,9441
30	4,24	0,10	5,08	3,85	1,49	4,1563
31	4,24	0,10	5,13	3,80	1,48	4,2268

(\*) Valores desconsiderados para obter ajuste do modelo

#### 6.2.4.1 Análise de variância

A avaliação dos p-valores permite determinar se os coeficientes (fatores) devem ou não serem incluídos no modelo de regressão obtido para cada resposta monitorada na otimização. Quando se obtém um p-valor menor do que 0,05, o coeficiente foi considerado no modelo, já que o mesmo é significativamente diferente de 0 (zero) e, conseqüentemente, a resposta experimental foi influenciada pela variação do nível desse fator. Entretanto, para os fatores que obtiveram p-valores maior do que 0,05 para uma determinada resposta, este não foi incluído no modelo de regressão, uma vez que essa resposta não foi afetada pela variação do nível desse fator.

Alguns casos podem ser necessários manter termos com o p-valor maior do que 0,05, já que é possível ocorrer a interação entre os fatores e/ou o termo quadrático que possa ser relevante para definição da regressão.

Através dos coeficientes de determinação ( $r^2$  ajustado e  $r^2$  de predição) foi possível avaliar o ajuste do modelo de regressão múltipla. O  $r^2$  ajustado é o percentual da variância na resposta avaliada que é representada pelos fatores, ou seja, o quanto da resposta pode ser explicada pelos fatores considerados no ajuste do modelo de regressão. O  $r^2$  de predição indica o quanto o modelo de regressão pode prever respostas para novas observações e foi calculado pela retirada sistemática de cada observação avaliada no delineamento experimental, estimando a equação de regressão e determinando o quão bem o modelo prediz a observação removida.

Além disso, a comparação entre variabilidade devido à falta de ajuste do modelo de regressão e a variabilidade devido ao erro puro aleatório permitiu avaliar o ajuste do modelo de regressão. O modelo de regressão pode ser considerado mal ajustado quando o erro obtido pela falta de ajuste do modelo de regressão foi significativamente maior do que o erro puro aleatório (p-valor menor que 0,05). Porém, o modelo de regressão foi considerado bem ajustado quando o erro devido à falta de ajuste do modelo de regressão foi significativamente menor que o erro puro aleatório (p-valor maior que 0,05).

**Tabela 20.** Coeficientes de correlação ajustados ( $r^2_{\text{ajustado}}$ ) e de predição ( $r^2_{\text{predição}}$ ) para os modelos de regressão obtidos para as respostas R4, R6, R5, R17, R15 e R18.

Resposta	$r^2_{\text{ajustado}}$	$r^2_{\text{predição}}$
R4	98,73%	98,34%
R6	99,85%	99,61%
R5	98,99%	98,79%
R17	94,32%	92,90%
R14	99,93%	99,84%
R18	98,09%	96,00%

**Tabela 21.** Resumo dos resultados de ANOVA (p-valores) para as respostas avaliadas na otimização (R4, R6, R5, R17, R14 e R18) em função dos fatores de entrada (A, B, C, D), seus termos quadráticos e de interação.

Ref.	R4	R6	R5	R17	R14	R18
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B	0,000	0,003	0,004	0,002	0,000	0,000
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AA	-	0,000	-	-	0,000	0,001
BB	-	-	0,138	-	-	0,000
CC	0,048	0,000	-	-	0,005	0,000
DD	-	0,000	0,033	-	-	0,108
AB	-	-	-	-	0,000	0,000
AC	-	-	0,128	-	0,013	0,099
AD	-	0,000	-	-	0,043	-
BC	-	-	-	-	0,000	0,000
BD	-	0,001	-	-	-	-
CD	0,034	0,000	-	-	-	-

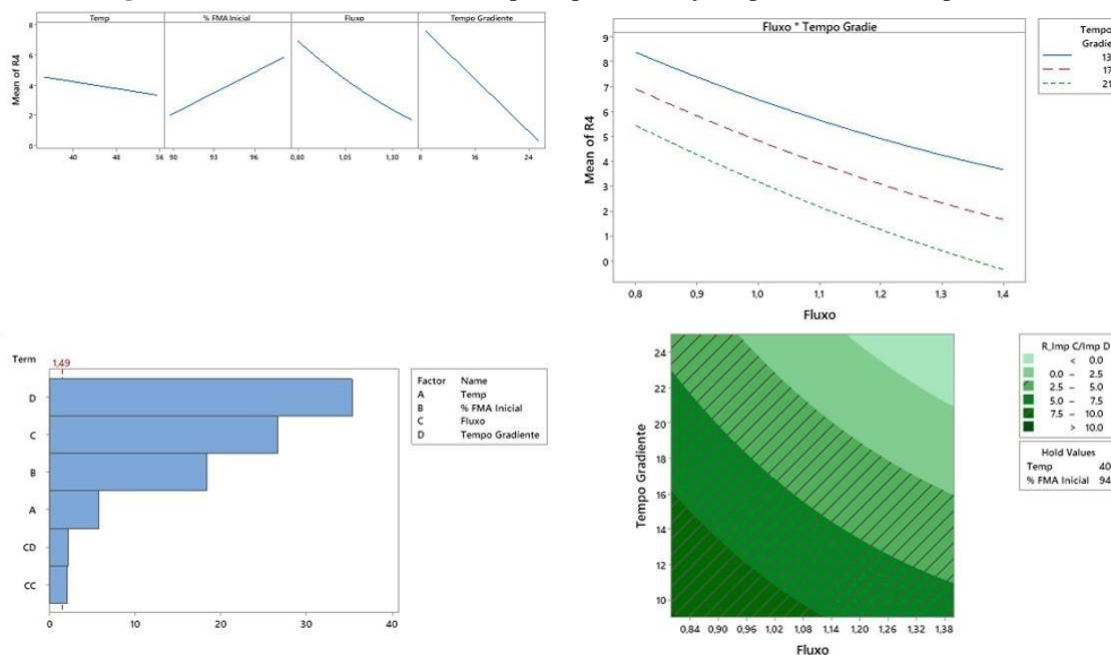
**Tabela 22.** Resumo dos resultados da análise de resíduos obtidas para os modelos de regressão das respostas R4, R6, R5, R17, R14 e R18.

Resposta	p-valor para falta de ajuste	Homocedasticidade	Independência
R4	0,392	Sim	Sim
R6	0,061	Sim	Sim
R5	0,067	Sim	Sim
R17	0,832	Sim	Sim
R14	0,758	Sim	Sim
R18	0,130	Sim	Sim

## 6.2.4.2 Análise gráfica

Como pode ser visto na Figura 10, a resposta R4 é influenciada de maneira significativa pela temperatura, proporção de fase móvel A inicial, fluxo e tempo de gradiente. A resolução entre as Impurezas C e D de Losartana Potássica melhora com a diminuição da temperatura, do fluxo e do tempo de gradiente; por outro lado o aumento da porcentagem de fase móvel A inicial melhora a resolução entre os picos. R4 também é afetada pela interação entre os fatores tempo de gradiente e fluxo, o que permite obter melhores respostas com o fluxo e tempo de gradiente simultaneamente em níveis mais baixos. Como pode ser visto no gráfico de contorno de R4, fixando-se os fatores: temperatura (40°C) e proporção de fase móvel A inicial (94%), permite-se trabalhar com a variação de gradiente e fluxo, resultando na região verde listrada, na qual a resposta é adequada.

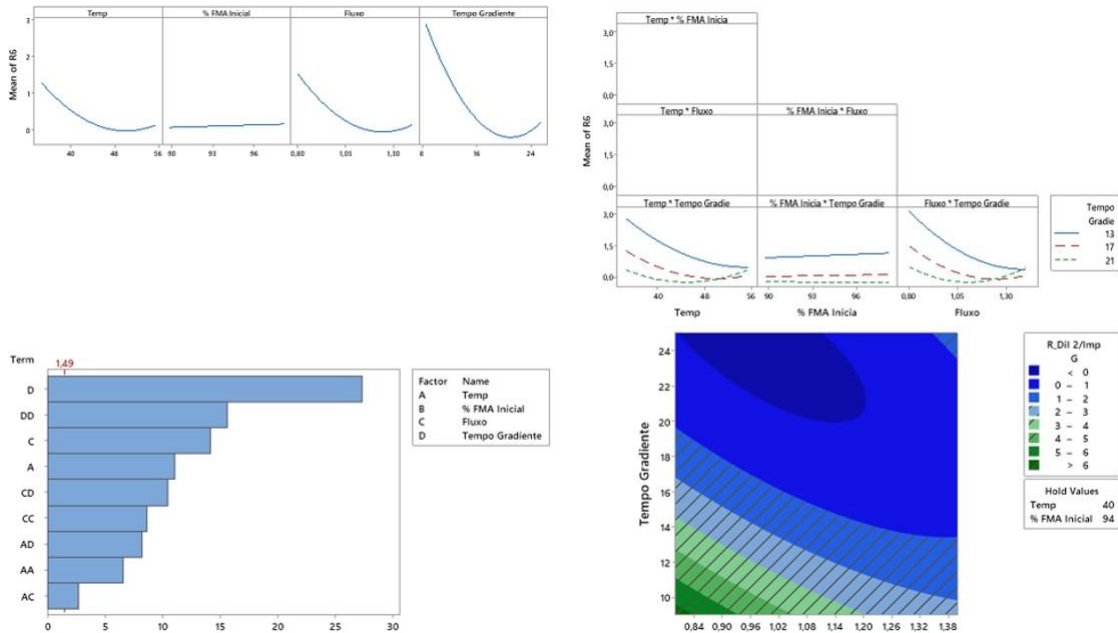
**Figura 10.** Gráfico fatorial de efeitos principais, interações, pareto e contorno para R4.



A resposta R6 corresponde a resolução entre o segundo pico de diluente e a impureza G de LOS. Como se pode observar na Figura 11, essa resposta diminui acentuadamente como o aumento da temperatura, do fluxo e do tempo de gradiente, porém, aumenta discretamente com o aumento da proporção de fase móvel A inicial. Ademais, a resposta é afetada pelas interações do tempo de gradiente com a temperatura,

com a proporção de fase móvel A inicial e com o fluxo. No gráfico de contorno, fixou-se os fatores temperatura (40°C) e proporção de fase móvel A inicial (94%), permitindo-se trabalhar com a variação de gradiente e fluxo, resultando nas regiões azul e verde listradas, nas quais a resposta é adequada.

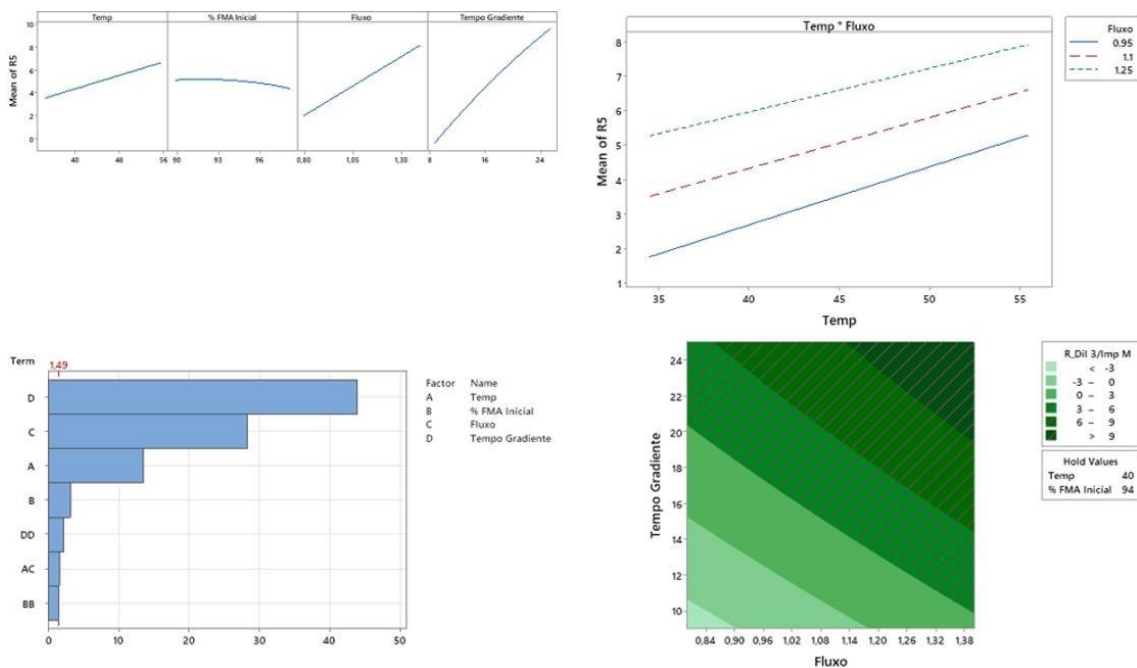
**Figura 11.** Gráfico fatorial de efeitos principais, interações, pareto e contorno para R6



A resposta R5 (resolução entre o terceiro pico do diluente e a impureza M de LOS) é influenciada significativamente pelos quatro fatores avaliados (Figura 12), sendo que a resposta é melhorada pelo aumento da temperatura, do fluxo e do tempo de gradiente. Em contrapartida, R5 responde melhor, forma discreta, com a diminuição da proporção de fase móvel A inicial. Além disso, essa resposta é afetada pela interação entre fluxo e temperatura, permitindo obter melhor resultado com a associação desses dois fatores em níveis mais altos. Como pode ser visto no gráfico de contorno, fixou-se os fatores temperatura (40°C) e proporção de fase móvel A inicial (94%), permitindo-se trabalhar com a variação de gradiente e fluxo, resultando na região verde listrada, na qual a resposta é adequada.

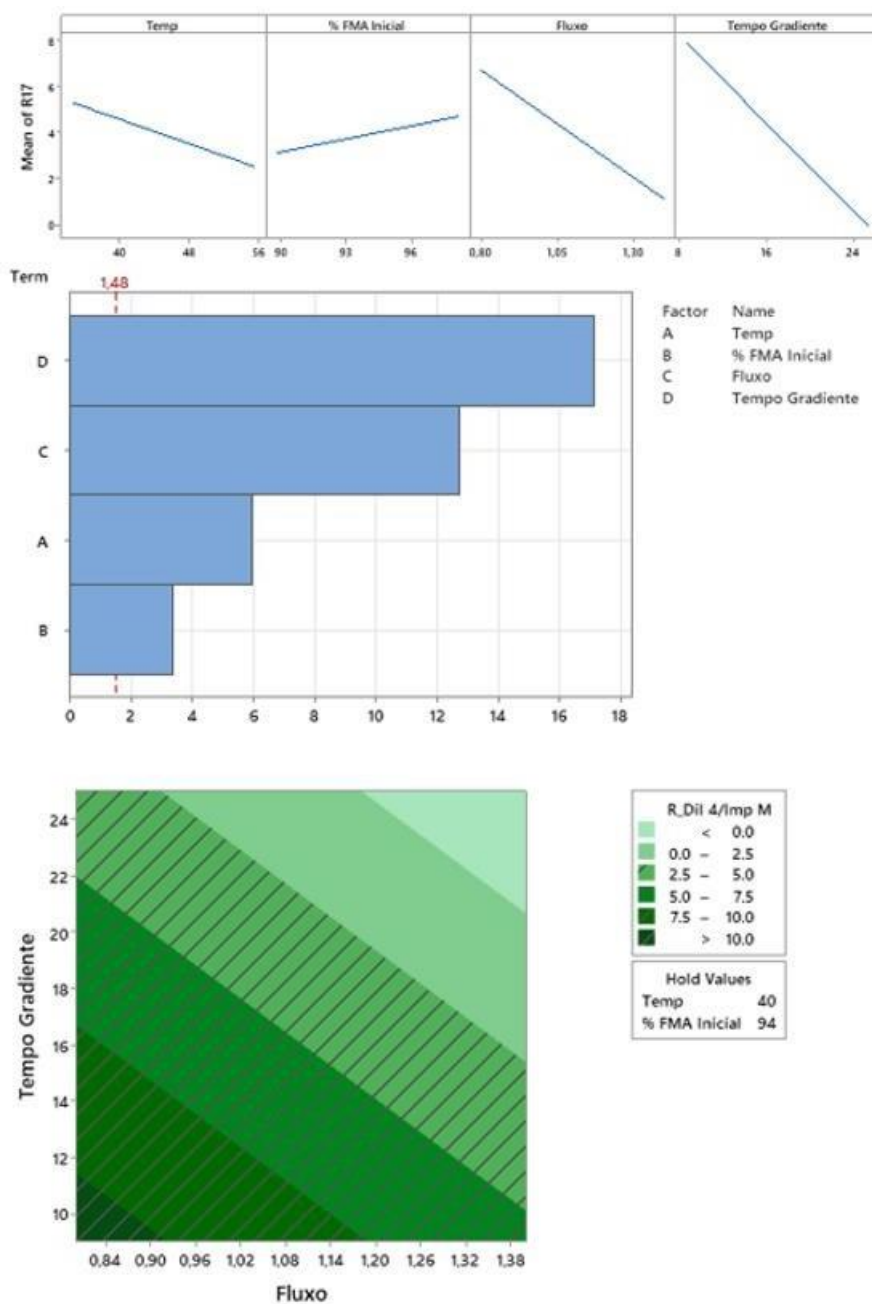


**Figura 12.** Gráfico fatorial de efeitos principais, interações, pareto e contorno para R5



R17 corresponde à resolução entre o quarto pico do diluente e da Impureza M de LOS e essa resposta é influenciada pelos quatro fatores avaliados, como pode ser observado na Figura 13. A resposta R17 melhora com o aumento da temperatura, do fluxo e do tempo de gradiente e piora com o aumento da porcentagem da fase móvel A inicial. Como pode ser visto no gráfico de contorno da Figura 28, fixou-se os fatores temperatura (40°C) e proporção de fase móvel A inicial (94%), permitindo-se trabalhar com a variação de gradiente e fluxo, resultando nas regiões verde listradas, nas quais a resposta está adequada.

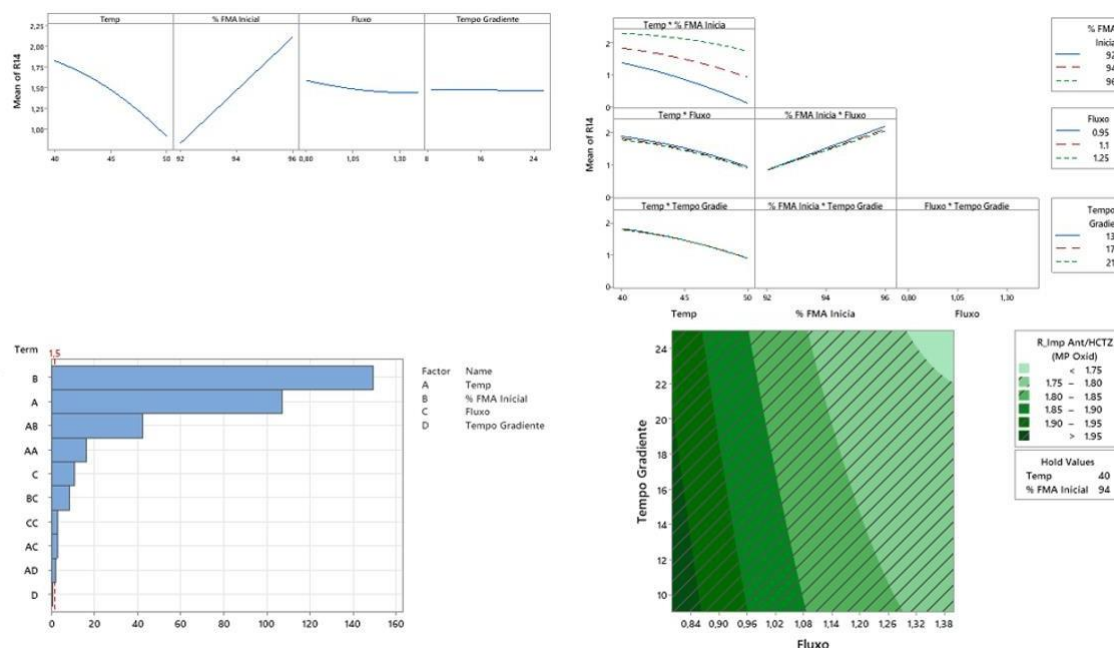
**Figura 13.** Gráfico fatorial de efeitos principais, pareto e contorno para R17



A resposta R14, que corresponde à resolução entre a impureza de degradação oxidativa anterior mais próxima e a HCTZ, sofre influência significativa dos quatro fatores avaliados e da interação entre eles (Figura 14). A temperatura e a proporção de fase móvel A inicial afetam essa resposta de forma bastante acentuada em comparação ao fluxo e o tempo de gradiente, que afetam a resposta de forma mais discreta. Além disso, na Figura 29 pode-se observar que existem interações da temperatura com porcentagem de fase móvel A inicial, com fluxo e com tempo de gradiente, e interações do fluxo com

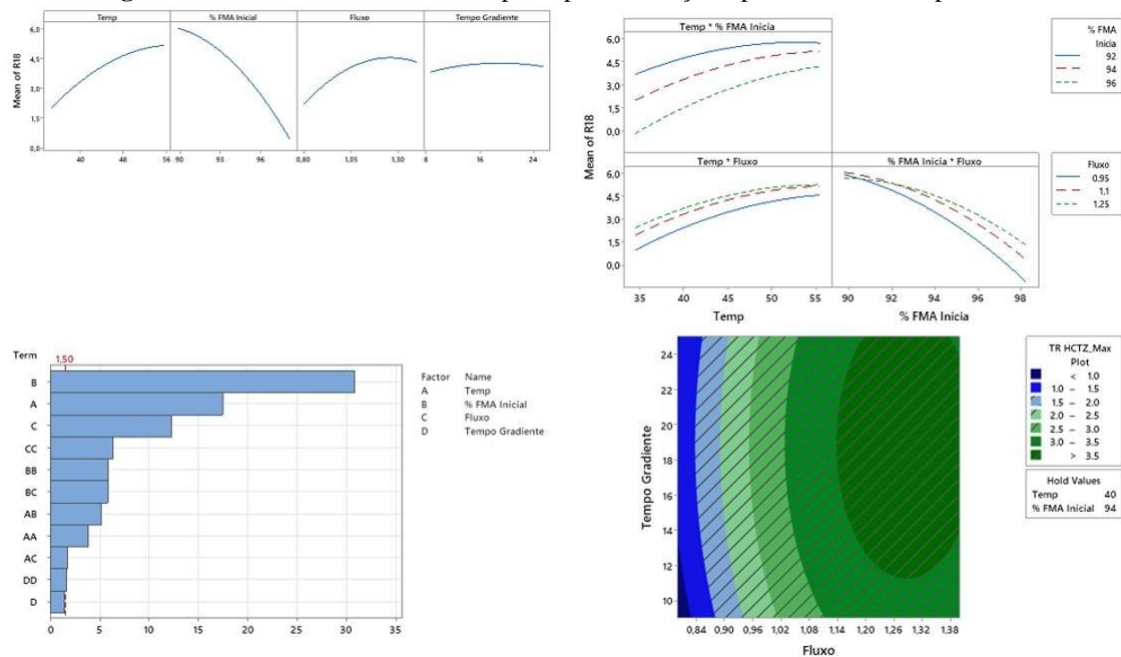
temperatura e com porcentagem de fase móvel A inicial. Como pode ser visto no gráfico de contorno, fixou-se os fatores temperatura (40°C) e proporção de fase móvel A inicial (94%), permitindo-se trabalhar com a variação de gradiente e fluxo, resultando na região verde listrada, na qual a resposta é adequada.

**Figura 14.** Gráfico fatorial de efeitos principais, interações, pareto e contorno para R14



A resposta R18 foi afetada significativamente pelos quatro fatores avaliados na otimização, além de apresentar interações entre três desses fatores (Figura 15). O aumento de temperatura, fluxo e tempo de gradiente aumentam a separação entre a HCTZ e o interferente do diluente. Por outro lado, a diminuição da proporção de fase móvel A inicial aumenta a resposta. Além disso, observa-se interação da temperatura com a porcentagem de fase móvel A inicial e com o fluxo, e interação do fluxo com a porcentagem de fase móvel A inicial. Como pode ser visto no gráfico de contorno da Figura 30, fixaram-se os fatores temperatura (40°C) e proporção de fase móvel A inicial (94%), permitindo-se trabalhar com a variação de gradiente e fluxo, resultando nas regiões azul e verde listradas, nas quais a resposta é adequada.

**Figura 15.** Gráfico fatorial de efeitos principais, interações, pareto e contorno para R18

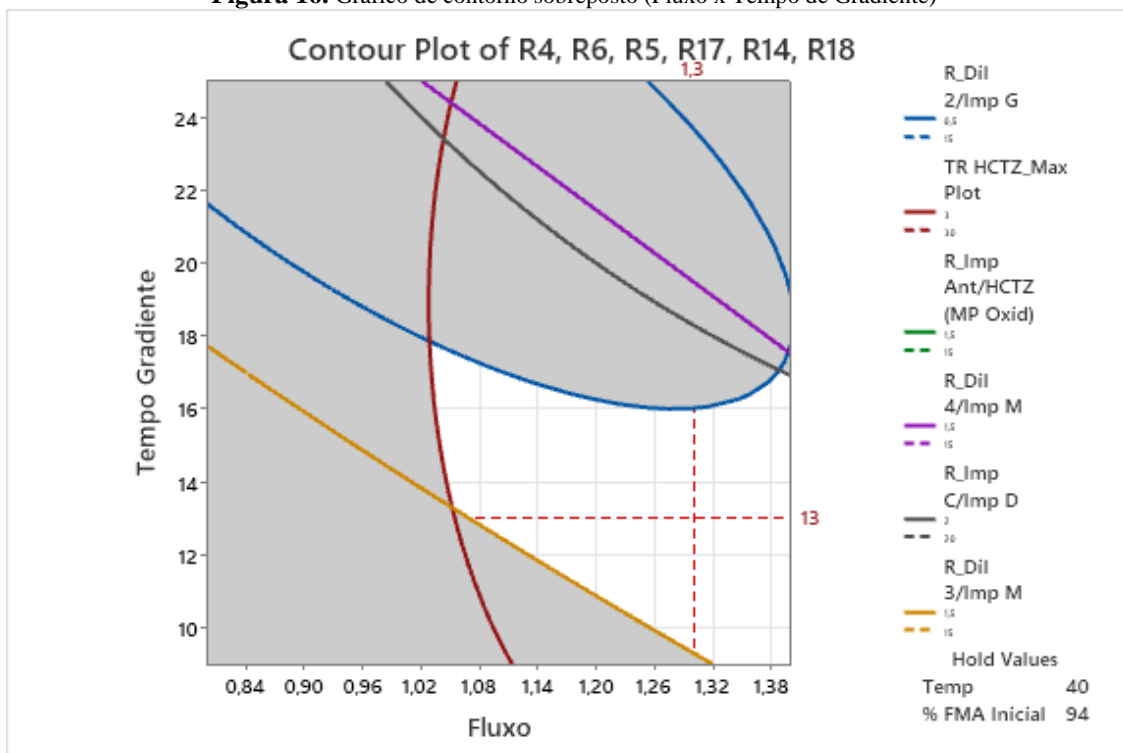


### 6.2.4.3 Definição do método analítico

As figuras mostradas anteriormente são os resultados de como os fatores influenciam individualmente a cada uma das respostas de interesse. Para definir o método analítico ideal, realizou-se a sobreposição dos gráficos de contorno de cada resposta, para assim obter a região em que todas elas são simultaneamente atendidas, conforme as metas definidas no item 6.2.1.

Na Figura 16, pode-se observar região de trabalho (área branca) dentro da qual é possível atingir, simultaneamente, os critérios mínimos de resolução entre impurezas C e D de LOS (R4), resolução entre segundo pico de diluente e impureza G de LOS (R6), resolução entre o terceiro pico de diluente e Impureza M de LOS (R5), resolução entre o quarto pico de diluente e impureza M de LOS (R17), resolução entre a impureza de degradação oxidativa anterior mais próxima de HCTZ (R14), separação entre o pico de interferente do diluente e a HCTZ (R18).

**Figura 16.** Gráfico de contorno sobreposto (Fluxo x Tempo de Gradiente)



Sendo assim, os valores otimizados escolhidos para o método analítico estão apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23.** Condições analíticas otimizadas definidas de forma a atender simultaneamente aos critérios mínimos para as respostas R4, R6, R5, R7, R14 e R18.

Fator	Valor	Unidade
Temperatura	40	°C
Proporção de fase móvel A inicial	94	%
Fluxo	1,3	mL/minuto
Tempo de gradiente	13	minutos

FM: Fase móvel, NA: Não se aplica

## 7. Método Analítico Otimizado

Com base nos delineamentos experimentais realizados, assim como na avaliação dos modelos de regressão obtidos para cada resposta avaliadas, pode-se chegar no método analítico otimizado, conforme descrito abaixo:

**Soluções:****Fase Móvel A:** Ácido Fórmico 0,3%

Pipetar 3,0 mL de Ácido Fórmico em um béquer de 2 L contendo 1 L de água purificada e homogeneizar.

**Fase Móvel B:** Acetonitrila: Metanol (80:20)**Diluyente:** Água: Acetonitrila (70:30)**Solução Padrão:**

Pesar, exatamente, cerca de 12,5 mg de Hidroclorotiazida padrão de referência e cerca de 50 mg de Losartana Potássica padrão de referência, transferir para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar 30 mL diluyente e deixar em banho de ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. (Concentração teórica: 250,0 µg/mL de Hidroclorotiazida e 1000,0 µg/mL de Losartana Potássica)

**Solução Padrão Produto de Degradação:**

Pipetar 1 mL da solução padrão para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com diluyente, homogeneizar e filtrar através de membrana 0,45µm para vial de HPLC (Concentração teórica: 2,5 µg/mL de Hidroclorotiazida e 10,0 µg/mL de Losartana Potássica).

**Solução de System Suitability:**

Pipetar 3 mL da solução padrão para um vial de headspace, adicionar de 1 mL de Ácido Clorídrico 1N, lacrar e deixar em estufa a 105°C por 45 minutos. Após esse período, aguardar atingir a temperatura ambiente, adicionar 1 mL de Hidróxido de Sódio 1N. Transferir o conteúdo do vial de headspace para um balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com diluyente, homogeneizar e filtrar através de membrana 0,45µm para vial de HPLC.

**Solução Amostra Estoque:**

Pesar, exatamente, cerca de 154,5 mg de amostra (equivalente a 12,5 mg de Hidroclorotiazida e 50 mg de Losartana Potássica), transferir para um balão volumétrico

de 50 mL, adicionar 30 mL diluente e deixar em banho de ultrassom por 10 minutos. Completar o volume com diluente e homogeneizar.

**Condições Cromatográficas:**

Equipamento: HPLC

Coluna: XBridge C18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm)

Temperatura da coluna: 40°C

Temperatura do rack de vials: 15°C

Detector: UV 275 nm

Fluxo: 1,3 mL/minuto

Volume de injeção para produtos de degradação: 10 µL

Volume de injeção para Teor: 1,5 µL

Tipo de eluição: Gradiente

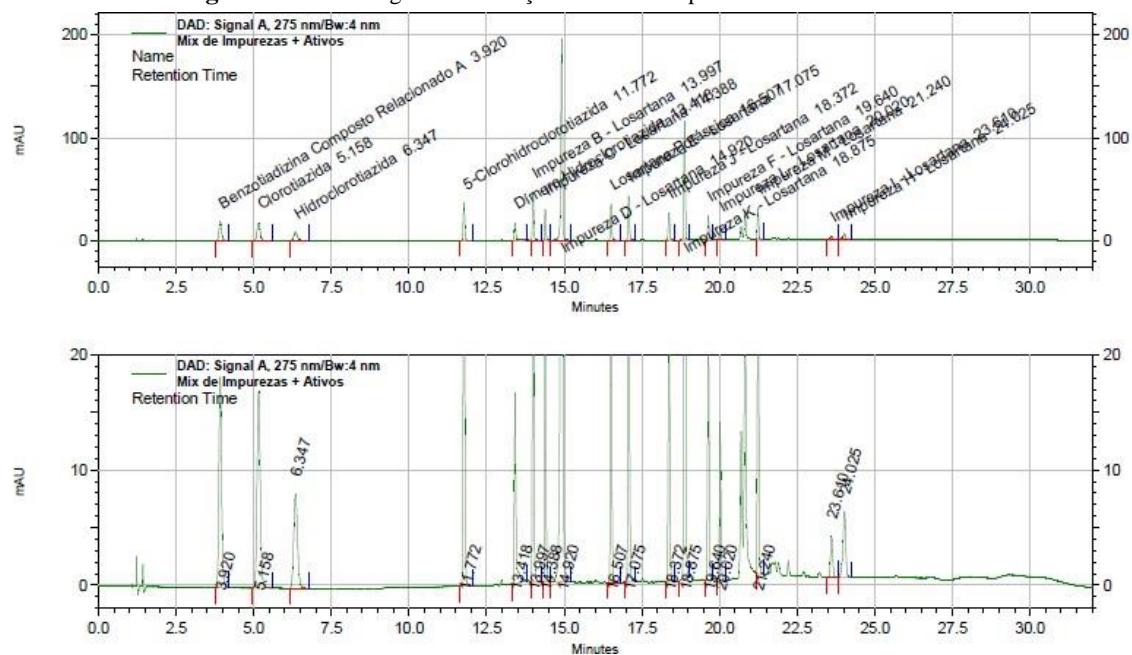
Tempo de retenção aproximado de Hidroclorotiazida: 5,3 minutos

Tempo de retenção aproximado de Losartana Potássica: 16,0 minutos

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase móvel A</b>	<b>Fase móvel B</b>
0,00	94	6
7,00	94	6
20,00	15	85
25,00	15	85
27,00	94	6
32,00	94	6

Cromatogramas obtidos com o método analítico otimizado para a solução de mix de impurezas mais HCTZ e LOS, a solução de HCTZ após degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 10 dias) e a solução amostra para a determinação de teor de HCTZ e LOS estão apresentados na Figura 17, Figura 18 e Figura 19, respectivamente.

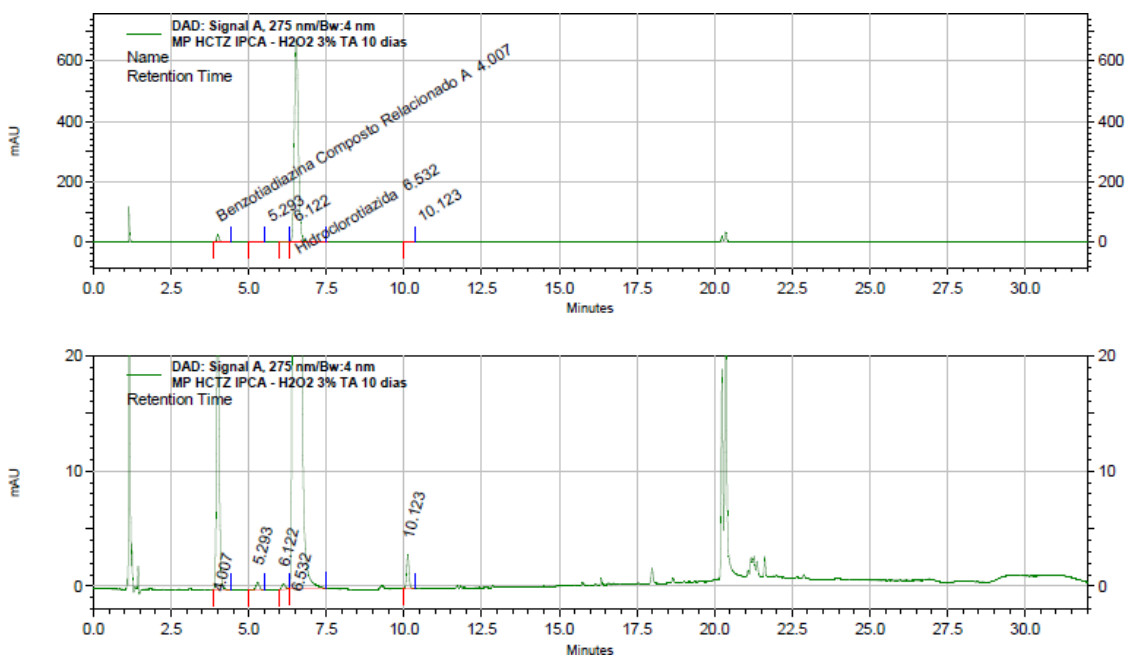
**Figura 17.** Cromatograma da solução de mix de impurezas mais HCTZ e LOS



Peak Number	Name	RT	Area	Asymmetry	Theoretical Plates (USP)	R (USP)
1	Benzotiadizina Composto Relacionado A	3.920	14562138	1.14	10072	0.00
2	Clorotiazida	5.158	16691851	1.12	11385	7.08
3	Hidroclorotiazida	6.347	9422379	1.11	12451	5.65
4	5-Clorohidroclorotiazida	11.772	17077699	1.09	266022	34.03
5	Dimero Hidroclorotiazida	13.418	8186873	1.87	403006	18.73
6	Impureza B - Losartana	13.997	17467030	1.18	600078	7.38
7	Impureza C - Losartana	14.388	10327819	1.31	747864	5.64
8	Impureza D - Losartana	14.920	97468220	0.89	413366	6.67
9	Losartana Potássica	16.507	14177443	1.15	715176	18.57
10	Impureza E - Losartana	17.075	18013560	1.13	700290	7.12
11	Impureza J - Losartana	18.372	11168233	1.13	804559	15.86
12	Impureza K - Losartana	18.875	48313949	1.10	853227	6.15
13	Impureza F - Losartana	19.640	9846734	1.11	914933	9.34
14	Impureza L - Losartana	20.020	5560663	1.13	1025578	4.71
15	Impureza M - Losartana	21.240	12155734	1.14	1162983	15.46
16	Impureza I - Losartana	23.610	2352795	1.07	532111	22.76
17	Impureza H - Losartana	24.025	4683196	0.87	391289	2.93

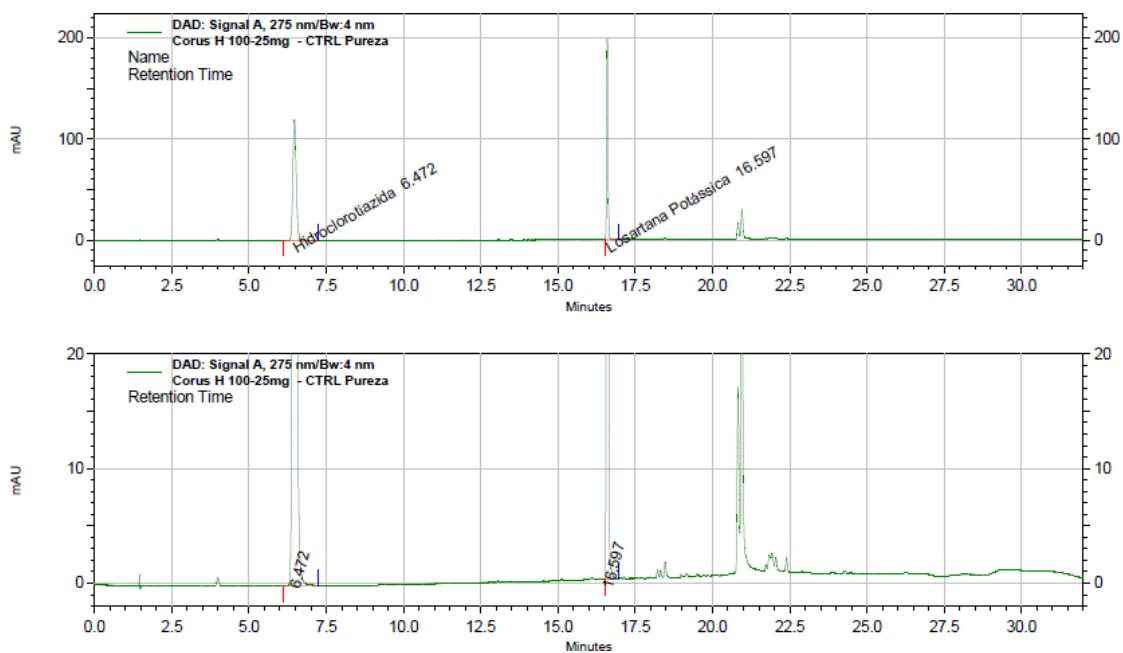


**Figura 18.** Cromatograma da HCTZ após degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 10 dias)



Peak Number	Name	RT	Area	Asymmetry	Theoretical Plates (USP)	R (USP)
1	Benzotiadiazina Composto Relacionado A	4.007	19673171	1.14	9742	0.00
2		5.293	672007	1.01	10946	7.05
3		6.122	509710	1.10	12846	3.96
4	Hidroclorotiazida	6.532	807337084	1.14	12154	1.81
5		10.123	2116252	1.08	79627	18.88

**Figura 19.** Cromatograma amostra para a determinação de teor de HCTZ e LOS

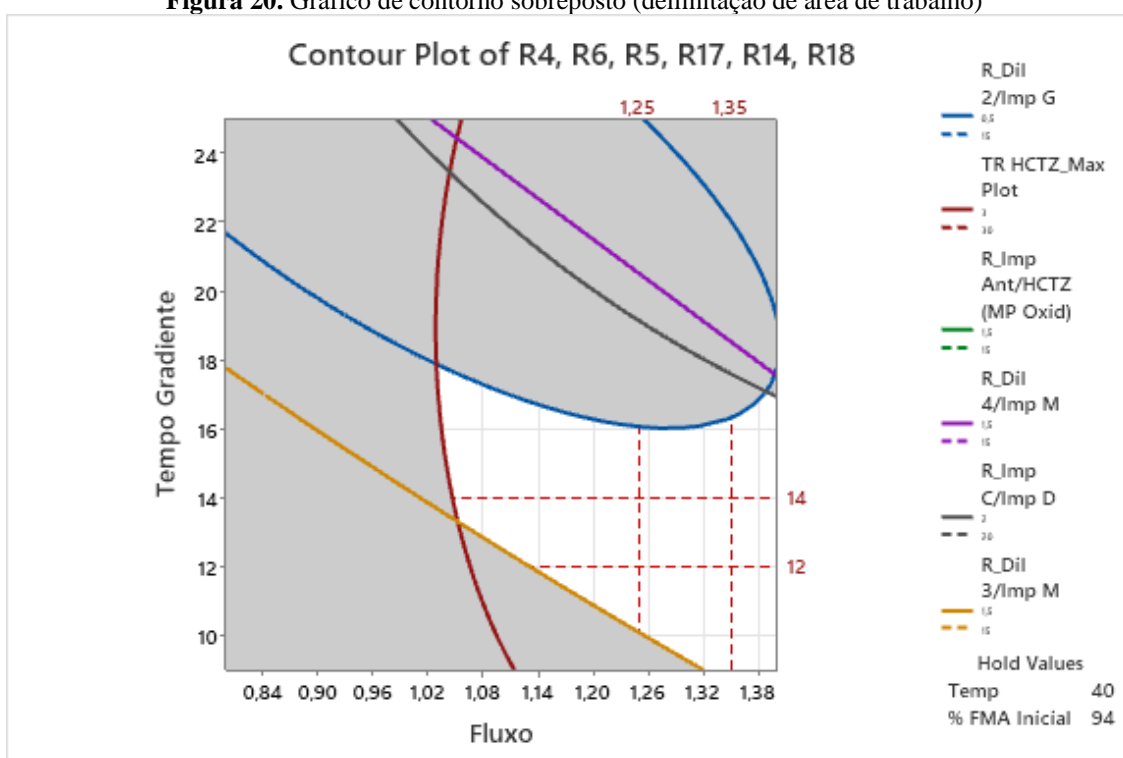


Peak Number	Name	RT	Area	Asymmetry	Theoretical Plates (USP)	R (USP)
1	Hidroclorotiazida	6.472	122548015	1.14	16540	0.00
2	Losartana Potássica	16.597	79729915	1.11	721135	72.46

## 8. Robustez cromatográfica e definição dos parâmetros de adequabilidade (*system suitability*)

Com base nos experimentos de otimização descrito no item 6.2, foi avaliada a região de trabalho (Figura 16). Para estudo da robustez do método analítico, definiu-se uma região ao redor do ponto central para os testes, porém ainda dentro da região de operação do método (área branca) demonstrada na Figura 20. A área determinada pela linha tracejada em vermelho é a região de controle para a determinação da robustez do método analítico.

**Figura 20.** Gráfico de contorno sobreposto (delimitação de área de trabalho)



Além dos fatores testados na etapa de otimização do método analítico, foram analisados outros possíveis parâmetros comumente avaliados na robustez cromatográfica. Os parâmetros avaliados estão dispostos na Tabela 24.

**Tabela 24.** Parâmetros avaliados na robustez cromatográfica do método analítico

Parâmetro	Inferior	Superior
Tempo de Gradiente	12	14
Tempo de Isocrático Inicial	6	8
Temperatura da coluna (°C)	39	41
Fluxo da Fase Móvel (mL/min)	1,25	1,35
Tempo de Exposição - System Suitability	30	60
Concentração de ácido fórmico (%)	2,5	3,5
Coluna	1	2
Equipamento	1	2

### 8.1 Criação dos experimentos

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental por Plackett-Burman com 8 fatores em 2 níveis, conforme a Tabela 25.

**Tabela 25.** Delineamento experimental para o método analítico

Exp./Variável	Gradiente	Isocrático Inicial	Temperatura	Fluxo	System	% Ác Fórmico	Coluna	Equipamento
1	14	6	41	1,35	30	0,35	1	1
2	12	8	41	1,25	60	0,25	1	1
3	12	6	39	1,25	30	0,25	1	1
4	12	8	41	1,35	30	0,35	2	1
5	14	8	39	1,35	60	0,25	2	1
6	14	6	39	1,25	60	0,35	2	1
7	14	8	39	1,35	30	0,25	1	2
8	12	6	39	1,35	60	0,35	1	2
9	14	8	41	1,25	60	0,35	1	2
10	12	8	39	1,25	30	0,35	2	2
11	12	6	41	1,35	60	0,25	2	2
12	14	6	41	1,25	30	0,25	2	2

**Legenda:** Exp.: Ordem do experimento, Gradiente: tempo de gradiente (min), Isocrático Inicial: tempo na condição de isocrático inicial (min), Temperatura: temperatura da coluna (°C), Fluxo: fluxo da fase móvel (mL/min), System: tempo de exposição a 105°C da solução de System Suitability (min), % Ác. Fórmico: concentração de Ácido Fórmico na fase móvel (%), Coluna: coluna cromatográfica Equipamento: equipamento HPLC.

## 8.2 Resultados e discussão

### 8.2.1 Avaliação da Robustez Cromatográfica

A avaliação da robustez cromatográfica verifica se variações nos parâmetros do método analítico interferem na quantificação do fármaco. A recuperação da amostra foi avaliada frente a uma amostra controle preparada conforme o método em estudo (item 7). Os resultados de recuperação de teor de HCTZ e LOS no produto acabado e em placebo contaminado, considerando as diferentes condições analíticas avaliadas no estudo de robustez, estão apresentadas na Tabela 26 e Tabela 27, respectivamente.

**Tabela 26.** Resultados de recuperação de teor de HCTZ e LOS no produto acabado

Experimento	Recuperação	
	HCTZ (%)	LOS (%)
Controle	100,0	100,0
1	100,9	101,5
2	101,3	101,7
3	101,1	101,7
4	98,6	100,1
5	98,4	99,7
6	98,2	99,2
7	100,1	101,6
8	100,1	101,6
9	99,9	101,6
10	100,2	100,9
11	99,6	101,0
12	99,8	101,0
<b>Mínimo</b>	<b>98,2%</b>	<b>99,2%</b>
<b>Máximo</b>	<b>101,3%</b>	<b>101,7%</b>

**Tabela 27.** Resultados de recuperação de teor de HCTZ e LOS no placebo contaminado

Experimento	Recuperação	Recuperação
	HCTZ (%)	LOS (%)
Controle	100,0	100,0
1	100,8	101,8
2	100,1	100,7
3	100,1	99,6
4	100,3	103,0
5	100,0	100,2
6	99,8	101,4
7	101,5	102,6
8	101,2	102,2
9	100,6	101,0
10	102,7	102,0
11	100,5	103,0
12	102,5	103,3
<b>Mínimo</b>	<b>99,8%</b>	<b>99,6%</b>
<b>Máximo</b>	<b>102,7%</b>	<b>103,3%</b>

Em todos os experimentos realizados, as recuperações encontradas estiveram dentro do especificado pela tabela da AOAC em relação a amostra controle, sendo de 98 a 102% para o método de Teor (Tabela 26) e de 95 a 105% para o método de Produtos de Degradação (Tabela 27) (25). Sendo assim, pode-se afirmar que o método é robusto dentro da região controlada nesse delineamento.

A definição do *system suitability* do método analítico foi realizada através da injeção de uma solução de *System Suitability* e uma solução de padrão dos ativos, sendo avaliadas as respostas: resolução, fator de capacidade, pratos teóricos, tempo de retenção e assimetria do pico. As respostas foram avaliadas estatisticamente pelo software Minitab, sendo desconsiderados os parâmetros de *system suitability* com variação menor ou igual a 5% e/ou que atingiram as condições desejáveis para a análise. Em seguida foi realizada a predição com intervalo de confiança de 95% para cada resposta utilizando a combinação de variáveis nos níveis em que geram resultados mais críticos. Também foram determinados os fatores principais que mais afetam cada resposta para controle e melhoria do método. O resumo dos resultados para a definição dos critérios de *system suitability* estão apresentados na Tabela 28.

**Tabela 28.** Resultados resolução, fator de capacidade, pratos teóricos, tempo de retenção e assimetria do pico considerados para a definição dos critérios de *system suitability*.

Experimento	K	Res	RT	RT	PT	PT	ASS	ASS
	BENZO	HCTZ_BENZO	HCTZ	LOS	HCTZ	LOS	HCTZ	LOS
1	2,58	10,80	5,122	15,333	9490	570388	1,139	1,050
2	2,60	10,93	5,640	16,820	9477	764661	1,137	1,039
3	2,74	11,41	5,938	14,847	10148	591393	1,150	1,061
4	2,68	12,16	5,288	16,515	12005	898093	1,095	1,063
5	2,88	12,87	5,693	17,430	12662	859440	1,081	1,083
6	2,76	12,59	5,952	15,598	12853	665035	1,111	1,083
7	3,13	13,06	6,232	17,527	10646	809560	1,136	1,035
8	2,98	12,90	5,932	14,462	10731	643453	1,107	1,012
9	2,78	12,29	5,973	17,553	10548	760312	1,137	1,046
10	3,13	13,28	6,670	16,695	11390	780148	1,164	1,163
11	3,06	12,73	6,025	14,502	10615	610306	1,174	1,171
12	3,34	12,81	6,410	15,612	11038	589835	1,180	1,165
<b>Mínimo</b>	2,58	10,80	5,122	14,462	9477	570388	1,081	1,012
<b>Máximo</b>	3,34	13,28	6,670	17,553	12853	898093	1,180	1,171
<b>DPR (%)</b>	8	7	7	7	10	16	3	5

**Legenda:** DPR(%): Desvio padrão relativo, K: Fator de capacidade, Res: Resolução, RT: Tempo de Retenção, PT: Pratos Teóricos, ASS: Assimetria do pico, BENZO: Benzotiadiazina Composto Relacionado A, HCTZ: Hidroclorotiazida e LOS: Losartana Potássica.

**Tabela 29.** Resultados obtidos da ANOVA (p-valores) de cada resposta avaliada na definição dos critérios de *system suitability*.

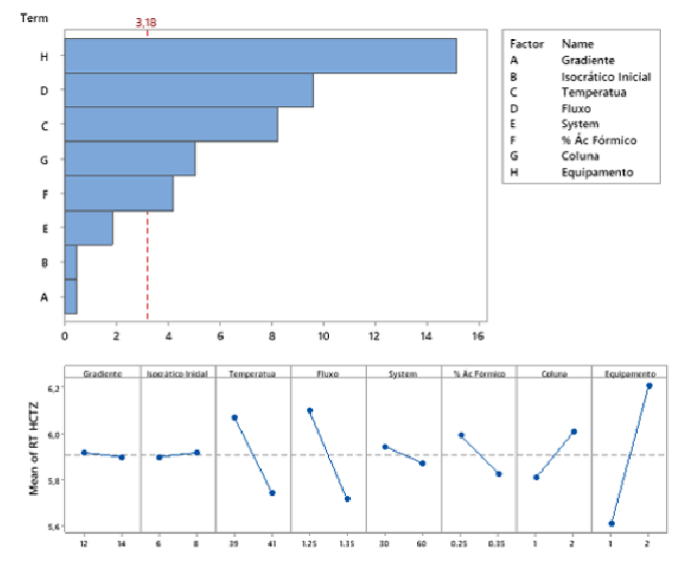
Fator	K	*Res	RT	RT	PT	PT	*ASS	*ASS
	BENZO	HCTZ_BENZO	HCTZ	LOS	HCTZ	LOS	HCTZ	LOS
Tempo de Gradiente	0,405	-	0,673	0,000	0,287	0,847	-	-
Tempo de Isocrático	0,435	-	0,657	0,000	0,465	0,005	-	-
Temperatura da coluna	0,139	-	0,004	0,238	0,099	0,400	-	-
Fluxo da Fase Móvel	0,899	-	0,002	0,003	0,775	0,228	-	-
Tempo de Exposição	0,159	-	0,159	0,360	0,401	0,715	-	-
% de ácido fórmico	0,062	-	0,025	0,031	0,354	0,602	-	-
Coluna	0,037	-	0,015	0,301	0,023	0,197	-	-
Equipamento	0,005	-	0,001	0,296	0,507	0,400	-	-

\*Parâmetros desconsiderados pois apresentaram variação menor ou igual a 5% e/ou atingiram as condições desejáveis para a análise.

### 8.2.1.1 Tempo de retenção para HCTZ

Na Figura 21 são apresentados os gráficos de Pareto e fatorial de efeitos principais para o tempo de retenção de HCTZ em função dos fatores de entrada (A a H).

**Figura 21.** Gráfico de Pareto e fatorial de efeitos principais para Tempo de Retenção de HCTZ



A predição para a resposta de Tempo de Retenção de HCTZ foi realizada com o resultado mais crítico (inferior e superior). Dessa forma, os experimentos 01 (inferior) e 10 (superior) foram os escolhidos para essa avaliação (ver Tabela 25 e Tabela 28). Considerando-se as predições obtidas pelo modelo de regressão, os critérios de *system suitability* para o tempo de retenção de HCTZ foram definidos entre 4,8 e 6,8 minutos, conforme demonstrado na Figura 22.

**Figura 22.** Resultados da predição para Tempo de Retenção de HCTZ (inferior e superior)

Settings				Settings			
Variable	Setting	Variable	Setting	Variable	Setting	Variable	Setting
Gradiente	14	Gradiente	12	Gradiente	12	Gradiente	12
Isocrático Inicial	6	Isocrático Inicial	8	Isocrático Inicial	8	Isocrático Inicial	8
Temperatura	41	Temperatura	39	Temperatura	39	Temperatura	39
Fluxo	1.35	Fluxo	1.25	Fluxo	1.25	Fluxo	1.25
System	30	System	30	System	30	System	30
% Ác Fórmico	0.35	% Ác Fórmico	0.35	% Ác Fórmico	0.35	% Ác Fórmico	0.35
Coluna	1	Coluna	2	Coluna	2	Coluna	2
Equipamento	1	Equipamento	2	Equipamento	2	Equipamento	2

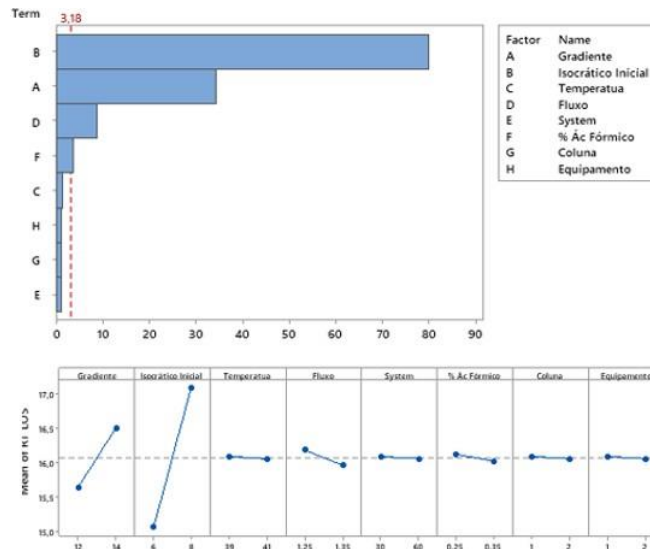
  

Prediction				Prediction			
Fit	SE Fit	95% Lower Confidence Bound	95% Lower Prediction Bound	Fit	SE Fit	95% Upper Confidence Bound	95% Upper Prediction Bound
5.08592	0.0595502	4.94577	4.87184	6.63392	0.0595502	6.77406	6.84799

### 8.2.1.2 Tempo de retenção para LOS

Na Figura 23 são apresentados os gráficos de Pareto e fatorial de efeitos principais para o tempo de retenção de LOS em função dos fatores de entrada (A a H).

**Figura 23.** Gráfico de Pareto e fatorial de efeitos principais para Tempo de Retenção de LOS



A predição para a resposta de Tempo de Retenção da LOS foi realizada com o resultado mais crítico (inferior e superior). Dessa forma, os experimentos 08 (inferior) e 09 (superior) foram os escolhidos para essa avaliação (ver Tabela 25 e Tabela 28). Considerando-se as predições obtidas pelo modelo de regressão, os critérios de *system suitability* para o tempo de retenção do LOS foram definidos entre 14,3 e 17,7 minutos, conforme demonstrado na Figura 24.

**Figura 24.** Resultados da predição para Tempo de Retenção de LOS (inferior e superior)

Settings				Settings			
Variable	Setting	Variable	Setting	Variable	Setting	Variable	Setting
Gradiente	12	Gradiente	14	Gradiente	14	Gradiente	14
Isocrático Inicial	6	Isocrático Inicial	8	Isocrático Inicial	8	Isocrático Inicial	8
Temperatua	39	Temperatua	41	Temperatua	41	Temperatua	41
Fluxo	1.35	Fluxo	1.25	Fluxo	1.25	Fluxo	1.25
System	60	System	60	System	60	System	60
% Ác Fórmico	0.35	% Ác Fórmico	0.35	% Ác Fórmico	0.35	% Ác Fórmico	0.35
Coluna	1	Coluna	1	Coluna	1	Coluna	1
Equipamento	2	Equipamento	2	Equipamento	2	Equipamento	2

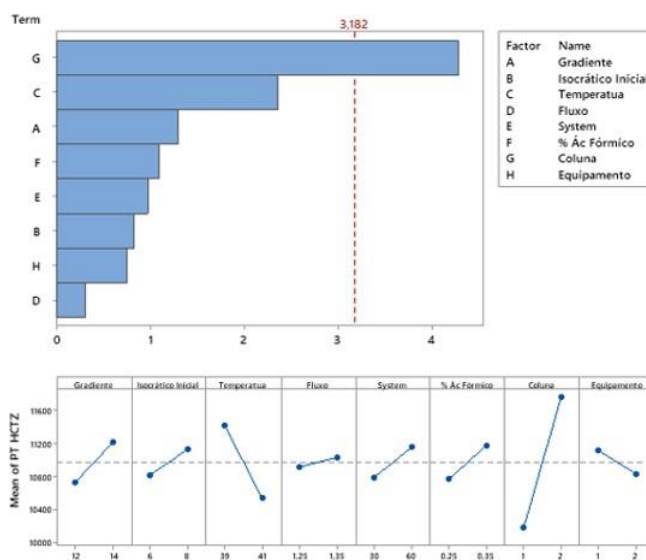
Prediction				Prediction			
Fit	SE Fit	95% Lower Confidence Bound	95% Lower Prediction Bound	Fit	SE Fit	95% Upper Confidence Bound	95% Upper Prediction Bound
14.468	0.0380548	14.3784	14.3312	17.5563	0.0380548	17.6459	17.6931



### 8.2.1.3 Pratos teóricos para HCTZ

Na Figura 25 são apresentados os gráficos de Pareto e fatorial de efeitos principais para pratos teóricos de HCTZ em função dos fatores de entrada (A a H).

**Figura 25.** Gráfico de Pareto e de efeitos principais para pratos teóricos de HCTZ



A predição para a resposta de pratos teóricos de HCTZ foi realizada com o resultado mais crítico (inferior). Dessa forma, o experimento 02 foi o escolhido para essa avaliação (ver Tabela 25 e Tabela 28). Considerando-se as predições obtidas pelo modelo de regressão, o critério de *system suitability* para pratos teóricos de HCTZ foi definido como no mínimo 7700, conforme demonstrado na Figura 26.

**Figura 26.** Resultados da predição para pratos teóricos de HCTZ

#### Settings

Variable	Setting
Gradiente	12
Isocrático Inicial	8
Temperatua	41
Fluxo	1.25
System	60
% Ác Fórmico	0.25
Coluna	1
Equipamento	1

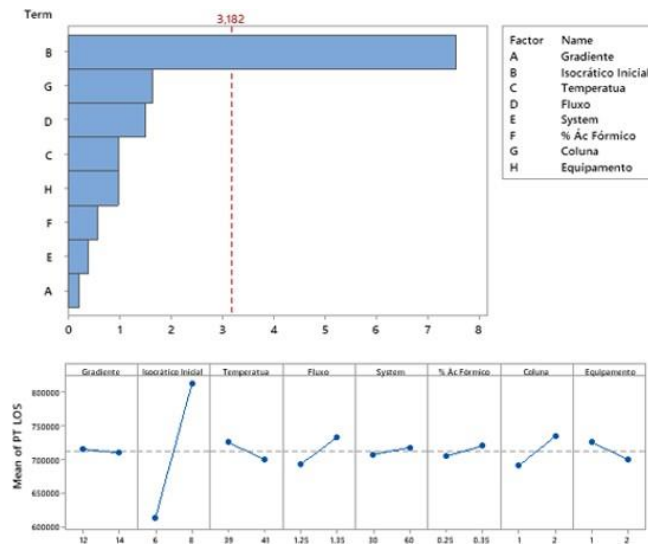
#### Prediction

Fit	SE Fit	95% Lower Confidence Bound	95% Lower Prediction Bound
9709.58	555.057	8403.33	7714.25

### 8.2.1.4 Pratos teóricos para LOS

Na Figura 27 são apresentados os gráficos de Pareto e fatorial de efeitos principais para pratos teóricos de LOS em função dos fatores de entrada (A a H).

**Figura 27.** Gráfico de Pareto para pratos teóricos de LOS



A predição para a resposta de Pratos Teóricos de LOS foi realizada com o resultado mais crítico (inferior). Dessa forma, o experimento 01 foi o escolhido para essa avaliação (ver Tabela 25 e Tabela 28). Considerando-se as predições obtidas pelo modelo de regressão, o critério de *system suitability* para pratos teóricos de LOS foi definido como no mínimo 466000, conforme demonstrado na Figura 28.

**Figura 28.** Resultados da predição para pratos teóricos de LOS

#### Settings

Variable	Setting
Gradiente	14
Isocrático Inicial	6
Temperatura	41
Fluxo	1.35
System	30
% Ác Fórmico	0.35
Coluna	1
Equipamento	1

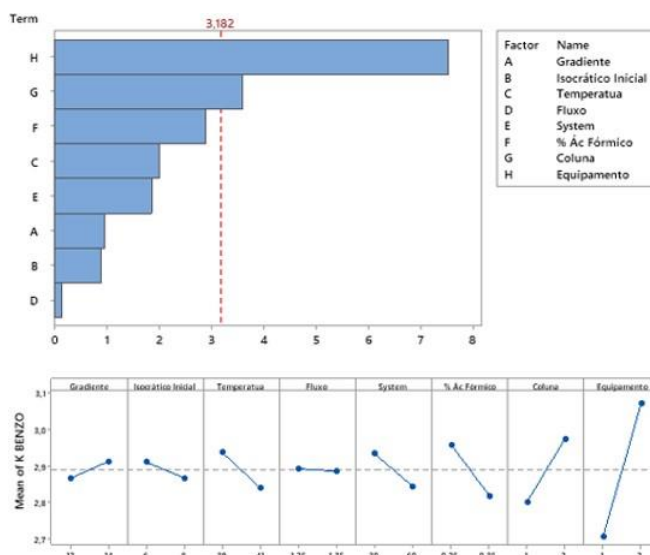
#### Prediction

Fit	SE Fit	95% Lower Confidence Bound	95% Lower Prediction Bound
609376	39743.8	515844	466504

### 8.2.1.5 Fator de capacidade da Benzotidiazina Composto Relacionado A (BZTD CR A)

Na Figura 29 são apresentados os gráficos de Pareto e fatorial de efeitos principais para Fator de capacidade da Benzotidiazina Composto Relacionado A (BZTD CR A) em função dos fatores de entrada (A a H).

**Figura 29.** Gráfico de Pareto para o fator de capacidade de BZTD CR A



A predição para a resposta de Fator de Capacidade de BZTD CR A foi realizada com o resultado mais crítico (inferior). Dessa forma, o experimento 01 foi o escolhido para essa avaliação (ver Tabela 25 e Tabela 28). Considerando-se as predições obtidas pelo modelo de regressão, o critério de *system suitability* para a resposta de Fator de Capacidade de BZTD CR A foi definido como no mínimo 2,3, conforme demonstrado na Figura 30.

**Figura 30.** Resultados da predição do fator de capacidade de BZTD CR A

#### Settings

Variable	Setting
Gradiente	14
Isocrático Inicial	6
Temperatura	41
Fluxo	1.35
System	30
% Ác Fórmico	0.35
Coluna	1
Equipamento	1

#### Prediction

Fit	SE Fit	95% Lower Confidence Bound	95% Lower Prediction Bound
2.58833	0.0723994	2.41795	2.32807

### 8.2.1.6 Assimetria de pico para HCTZ

A resposta assimetria do pico de HCTZ não foi considerada como parâmetro de *system suitability*, pois variou menos do que 5% nos experimentos realizados, mantendo-se entre 1,081 e 1,180, valores considerados adequados para o método analítico.

### 8.2.1.7 Assimetria de pico para LOS

A resposta assimetria do pico de LOS não foi considerada como parâmetro de *system suitability*, pois variou igual a 5% nos experimentos realizados, mantendo-se entre 1,012 e 1,062, valores considerados adequados para o método analítico.

### 8.2.1.8 Resolução entre o pico de HCTZ e BZTD CR A

A resposta resolução entre os picos de HCTZ e BZTD CR A não foi considerada como parâmetro de *system suitability*, pois apesar de apresentar variação maior do que 5% nos experimentos realizados, mantendo-se entre 10,8 e 13,3, valores muito acima do limite mínimo (1,5) necessário e considerados adequados para o método analítico.

## 8.3 Definição de *System Suitability*, controle e melhoria contínua

Através das predições propostas foram definidos os critérios de *system suitability* para o método analítico, conforme apresentados na Tabela 30.

**Tabela 30.** Definição de *system suitability* para o método analítico

Amostra	Resposta	Intervalo avaliado	Predição	System Final
Solução Padrão	K' BZTD CR A	Inferior	2,328	$\geq 2,3$
	Pratos teóricos – HCTZ	Inferior	7714	$\geq 7700$
	Pratos teóricos – LOS	Inferior	466504	$\geq 466000$
	Tempo de retenção – HCTZ	Inferior	4,871	$\geq 4,8$
		Superior	6,848	$\leq 6,8$
	Tempo de retenção - LOS	Inferior	14,331	$\geq 14,3$
	Superior	17,693	$\leq 17,7$	

**Legenda:** K': Fator de Capacidade, BZTD CR A: Benzotiadiazina Composto Relacionado A, HCTZ: Hidroclorotiazida e LOS: Losartana Potássica.

Com os resultados de cada resposta avaliados estatisticamente foi possível identificar quais os principais fatores que influenciam na adequação do método. Sendo assim, foram estabelecidas as possíveis causas de não atendimento ao *system suitability* e possíveis resoluções.

**Tabela 31.** Controle e melhoria para o método do método

<b>Critério não atendido</b>	<b>Fatores</b>	<b>Possível causa</b>	<b>Resolução</b>
K' BZTD CR A	Coluna	Perda de eficiência	Regeneração da coluna ou substituição
Pratos teóricos – HCTZ	Coluna	Perda de eficiência	Regeneração da coluna ou substituição
Pratos teóricos – LOS	Tempo de Isocrático Inicial	Gradiente inicial incorreto	Verificação dos parâmetros do método
	Fluxo	Fluxo incorreto	Verificação dos parâmetros do método
	Temperatura	Temperatura incorreta	Verificação dos parâmetros do método
	Tempo de retenção - HCTZ		Regeneração da coluna
	Coluna	Perda de eficiência	ou substituição
	% Ácido Fórmico	Preparo da FM A incorreto	Repreparar a FM A
Tempo de retenção - LOS	Tempo de Isocrático Inicial	Gradiente inicial incorreto	Verificação dos parâmetros do método
	Gradiente	Tempo de gradiente incorreto	Verificação dos parâmetros do método
	Fluxo	Fluxo incorreto	Verificação dos parâmetros do método
	% Ácido Fórmico	Preparo da FM A incorreto	Repreparar a FM A

**Legenda:** K': Fator de Capacidade, BZTD: Benzotidiazina Composto Relacionado A, HCTZ: Hidroclorotiazida e LOS: Losartana Potássica.

## **9. Validação analítica**

Segundo as disposições gerais previstas pela RDC 166 de 2017 (ANVISA), a validação analítica deve demonstrar a capacidade do método analítico em produzir resultados confiáveis e adequado à finalidade a que se destina mediante à critérios e objetivos definidos (26).

## 9.1 Procedimento

Os métodos analíticos otimizados, tanto para teor como para produtos de degradação, foram submetidos aos testes necessários para comprovação da sua confiabilidade e adequação necessária. Os critérios mínimos a serem atendidos foram retirados da legislação vigente da ANVISA para validação de métodos analíticos (RDC 166 de 2017).

- 1) Seletividade: tem como objetivo demonstrar a capacidade do método cromatográfico identificar e quantificar os analitos de interesse inequivocadamente, na presença de componentes contidos na amostra como impurezas, diluente e outros componentes da matriz. Esse critério será demonstrado no estudo de degradação forçada apresentado no item 10.
- 2) Linearidade: tem como objetivo comprovar a capacidade de se obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra, sendo que essa relação linear deve ser avaliada em toda a faixa preestabelecida para o método analítico proposto. Para a avaliação da linearidade foi analisada uma curva de calibração na faixa de concentração de 80% a 120% da concentração nominal do método de teor, e do limite de quantificação de 0,1% até 1,2% da concentração nominal para o método de produtos de degradação, permitindo traçar uma equação de reta de  $y$  (resposta analítica) em função de  $x$  (concentração do analito), estimada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser maior do que 0,990.
- 3) Precisão: permite avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras repetidas preparadas conforme o procedimento analítico. Nesse estudo foi apresentado avaliados os resultados de repetibilidade (amostras preparadas e analisadas sob as mesmas condições de operação, analista e instrumentação em uma única corrida analítica) e da precisão intermediária (amostras preparadas por um segundo analista, em dia diferente da repetibilidade conforme o procedimento analítico). Para a avaliação e atendimento do critério mínimo foi avaliado os resultados de desvio padrão relativo da repetibilidade e

precisão intermediária e foi realizado o teste F entre os resultados obtidos na repetibilidade e precisão intermediária para comprovar a similaridade entre esses dois grupos de dados.

- 4) Exatidão: tem por objetivo avaliar a capacidade do método analítico fornecer resultados com um grau de concordância com o valor aceito como verdadeiro. Para isso, foi realizado a contaminação do placebo com padrão de referência com concentração conhecida de cada um dos analitos e assim, foi possível comparar a resposta para concentração obtida experimentalmente com o valor teórico dessa concentração.
- 5) Robustez: realizado para comprovar a capacidade do método em resistir a pequenas variações das condições analíticas, fornecendo resultados confiáveis. Foi avaliado ao final da etapa de desenvolvimento e otimização do método analítico, conforme descrito no item 8.

## 9.2 Resultados e discussão

### 9.2.1 Teor

O resumo dos resultados de validação do método de teor de HCTZ e LOS está apresentados na Tabela 32.

**Tabela 32.** Resultados da validação do método de teor de HCTZ e LOS.

Teste	Critérios de aceitação	Resultados para	
		HCTZ	LOS
Linearidade	Coefficiente de correlação $\geq 0,990$	0,999	0,994
Precisão	$F < 5,05$	4,31	2,27
- Repetibilidade	$DPR \leq 1,3\%$	0,3%	0,4%
- Precisão Intermediária	$DPR \leq 2\%$	0,5%	0,6%
Exatidão	Entre 98% e 102%	Mínimo: 100,6% Máximo: 101,2% Média: 101%	Mínimo: 99,6% Máximo: 101,2% Média: 100%
Incerteza	Incerteza $\leq 1,25\%*$	1,1%*	0,6%*

\*Incerteza padrão relativa.



Através dos resultados obtidos nos testes apresentados na Tabela 32, pode-se concluir que o método foi linear na faixa de 80 a 120% da concentração nominal dos ativos (48,0 a 72,0 µg/mL para HCTZ e 192,0 a 288,0 µg/mL para LOS). Além disso, o método analítico foi preciso, apresentando desvio padrão relativo inferior a 1,3% em condições de repetibilidade e inferior a 2% em condições de precisão intermediária. Com os resultados de recuperação obtidos, pode-se avaliar que o método foi exato, apresentando recuperação dos ativos dentro da faixa de 98 a 102%. Ademais, a incerteza padrão, avaliada empregando-se abordagem *top-down*, foi de 1,1% e 0,6% para a quantificação de HCTZ e LOS, respectivamente, sendo ambas inferiores a incerteza alvo (incerteza padrão máxima admissível de 1,25%).

## 9.2.2 Produtos de degradação

O resumo dos resultados de validação do método de produtos de degradação de HCTZ e LOS está apresentados na Tabela 33.

**Tabela 33.** Resultados da validação do método de produtos de degradação de HCTZ e LOS.

Teste	Critérios de aceitação	Resultados para	
		HCTZ	LOS
Limite de quantificação	Sinal ruído > 10	96	186
Linearidade	Coefficiente de correlação $\geq 0,990$	1,000	0,9998
Precisão	F < 5,05	4,09	3,98
- Repetibilidade	DPR $\leq 3,7\%$	1,7%	2,0%
- Precisão Intermediária	DPR $\leq 5\%$	2,0%	4,6%
Exatidão	Entre 98% e 102%	Mínimo: 95,4%	Mínimo: 100,8%
		Máximo: 98,5%	Máximo: 104,7%
		Média: 97%	Média: 102%
Incerteza	Incerteza $\leq 0,125\%*$	0,072%*	0,10%*

\*Incerteza padrão absoluta (estimada próxima ao limite de 2,0%).

Através dos resultados obtidos nos testes apresentados na Tabela 33 pode-se concluir que o método foi linear na faixa de 0,1% a 2,0% da concentração nominal (0,25 a 5,0 µg/mL para HCTZ e 1,00 a 20,0 µg/mL para LOS), apresentou sinal ruído maior do 10 no limite de quantificação necessário para os ativos. Além disso, o método analítico

foi preciso, apresentando desvio padrão relativo inferior a 3,7% em condições de repetibilidade e inferior a 5% em condições de precisão intermediária. Com resultados de recuperação obtidos, pode-se avaliar que o método foi exato, apresentando recuperação do ativo dentro da faixa de 95 a 105%. Ademais, a incerteza padrão, avaliada empregando-se abordagem *top-down*, foi de 0,072% e 0,10% para a quantificação dos produtos de degradação de HCTZ e de LOS, respectivamente, sendo ambas inferiores a incerteza alvo (incerteza padrão máxima admissível de 0,125%).

## 10. Degradação forçada

A degradação forçada foi realizada com o principal objetivo de demonstrar que o método analítico desenvolvido é indicativo de estabilidade, uma vez que esse estudo permite fazer a avaliação da queda do teor de ambos os ativos, verificar a formação de potenciais produtos de degradação e relacionar essas condições através do balanço de massas. Além disso, o estudo de degradação forçada fornece dados necessários para assegurar que a seletividade da metodologia analítica é adequada, bem como informações acerca das possíveis rotas de degradação do produto em questão.

Na Tabela 34 estão indicadas as condições de estresse que as amostras de produto e dos ativos isolados foram submetidas (27).

**Tabela 34.** Condições de estresse das amostras estudadas

Tipo de estresse	Agente degradante	Concentração do agente degradante	Tempo de exposição	Condição de temperatura	Uso de co-solvente
Hidrólise ácida	HCl	1,0M	10 dias	TA	Acetonitrila
Hidrólise alcalina	NaOH	0,4M	10 dias	TA	Acetonitrila
Oxidação	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3%	10 dias	TA	Metanol
Degradação por íons metálicos	Fe <sub>3</sub> SO <sub>4</sub>	0,05M	1 dia	TA	Acetonitrila
Térmica seca	70°C ± 5°C	NA	16 dias	70°C	NA
Térmica úmida	70°C ± 5°C 90% ± 5%UR	NA	16 dias	70°C	NA
Fotólise	Branca: 2 ciclos (2 x 1200 klux/h) UV: 2 ciclos (2 x 200 Watt.hora/m <sup>2</sup> )	NA	13 dias	TA	NA

TA: temperatura ambiente, NA: não se aplica, UR: umidade relativa

Os perfis de degradação de HCTZ isolada, LOS isolada, HCTZ no produto e LOS no produto estão apresentados na Tabela 35, Tabela 36, Tabela 37 e Tabela 38, respectivamente.

**Tabela 35.** Perfil de degradação potencial de HCTZ isolada

Impurezas	Condições de Estresse									
	Controle	Ácido	Alcalino	Oxidativo	Íons Metálicos	Térmica Seca	Térmica Úmida	Fotólise		
BZTD CR A	0,34%	3,88%	1,04%	4,27%	-	0,14%	0,36%	0,34%		
Clorotiazida	-	-	-	-	-	-	-	-		
5-Clorohidro	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dímero HCTZ	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza individual <sup>(1)</sup>	0,00%	0,00%	0,00%	0,25%	0,99%	0,00%	0,00%	0,32%		
Impureza Total	0,34%	0,00%	1,04%	4,66%	2,12%	0,14%	0,36%	0,71%		

<sup>(1)</sup> Maior impureza desconhecida encontrada.

**Tabela 36.** Perfil de degradação potencial de LOS isolada

Impurezas	Condições de Estresse									
	Controle	Ácido	Alcalino	Oxidativo	Íons Metálicos	Térmica Seca	Térmica Úmida	Fotólise		
Impureza B - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza C - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza D - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza E - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza F - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza H - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza I - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza J - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza K - LOS	0,17%	0,20%	0,19%	0,59%	1,07%	0,19%	0,19%	0,62%		
Impureza L - LOS	-	0,50%	-	-	-	-	0,17%	-		
Impureza M - LOS	-	0,33%	-	-	-	-	0,18%	-		
Impureza individual <sup>(1)</sup>	0,07%	0,00%	0,00%	0,21%	0,68%	0,00%	0,00%	0,37%		
Impureza Total	0,33%	1,03%	0,19%	1,61%	5,44%	0,19%	0,54%	1,45%		

<sup>(1)</sup> Maior impureza desconhecida encontrada.

**Tabela 37.** Perfil de degradação potencial do produto para HCTZ

Impurezas	Condições de Estresse									
	Controle	Ácido	Alcalino	Oxidativo	Íons Metálicos	Térmica Seca	Térmica Úmida	Fotólise		
BZTD CR A	0,62%	4,21%	1,31%	5,20%	0,18%	2,18%	6,29%	0,57%		
Clorotiazida	-	-	-	-	-	-	-	-		
5-Clorohidro	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dímero HCTZ	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza individual <sup>(1)</sup>	0,00%	0,06%	1,73%	0,12%	0,62%	0,09%	0,60%	0,20%		
Impureza Total	0,62%	4,27%	4,35%	5,45%	1,29%	2,39%	7,48%	1,20%		

<sup>(1)</sup> Maior impureza desconhecida encontrada.

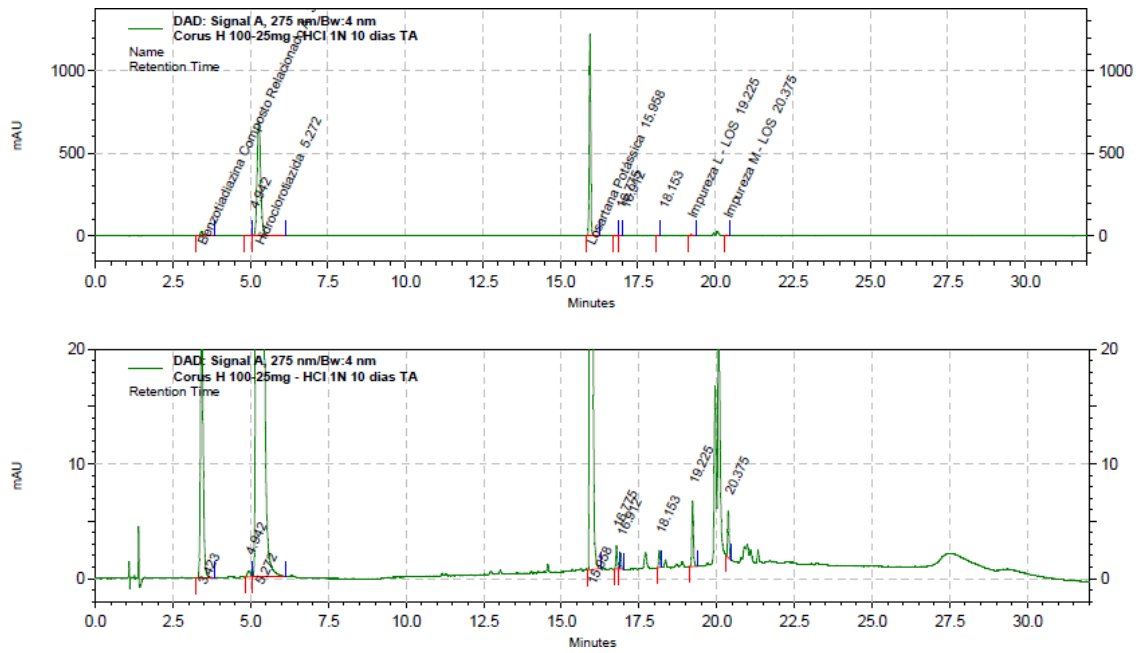
**Tabela 38.** Perfil de degradação potencial do produto para LOS

Impurezas	Condições de Estresse									
	Controle	Ácido	Alcalino	Oxidativo	Íons Metálicos	Térmica Seca	Térmica Úmida	Fotólise		
Impureza B - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza C - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza D - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza E - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza F - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza H - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza I - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza J - LOS	-	-	-	-	-	-	-	-		
Impureza K - LOS	-	0,12%	0,44%	0,44%	0,88%	0,22%	0,27%	1,00%		
Impureza L - LOS	-	0,47%	-	-	-	0,51%	0,16%	-		
Impureza M - LOS	-	0,31%	-	-	-	0,53%	0,15%	-		
Impureza individual <sup>(1)</sup>	0,05%	0,16%	0,24%	0,22%	0,54%	0,18%	0,32%	1,97%		
Impureza Total	0,10%	1,16%	1,21%	1,96%	4,73%	1,55%	1,03%	4,27%		

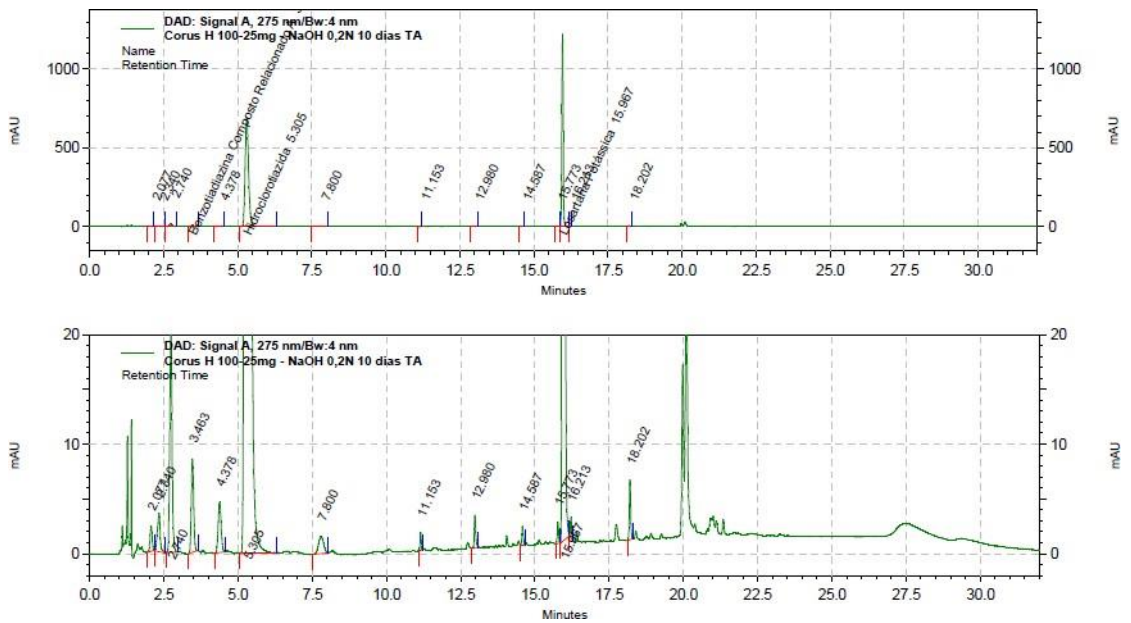
<sup>(1)</sup> Maior impureza desconhecida encontrada.

Cromatogramas obtidos para amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) submetida à hidrólise ácida, hidrólise básica, hidrólise oxidativa, degradação térmica seca, degradação térmica úmida, fotólise e oxidação por íons metálicos estão apresentados na Figura 31, Figura 32, Figura 33, Figura 34, Figura 35, Figura 36 e Figura 37, respectivamente.

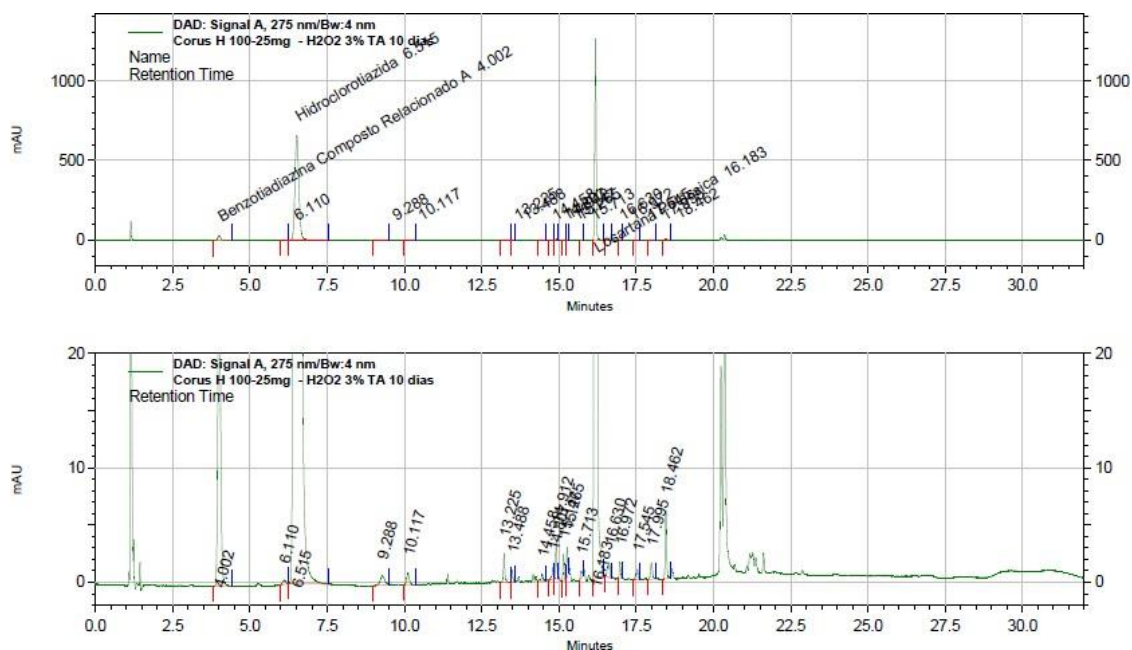
**Figura 31.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em hidrólise ácida.



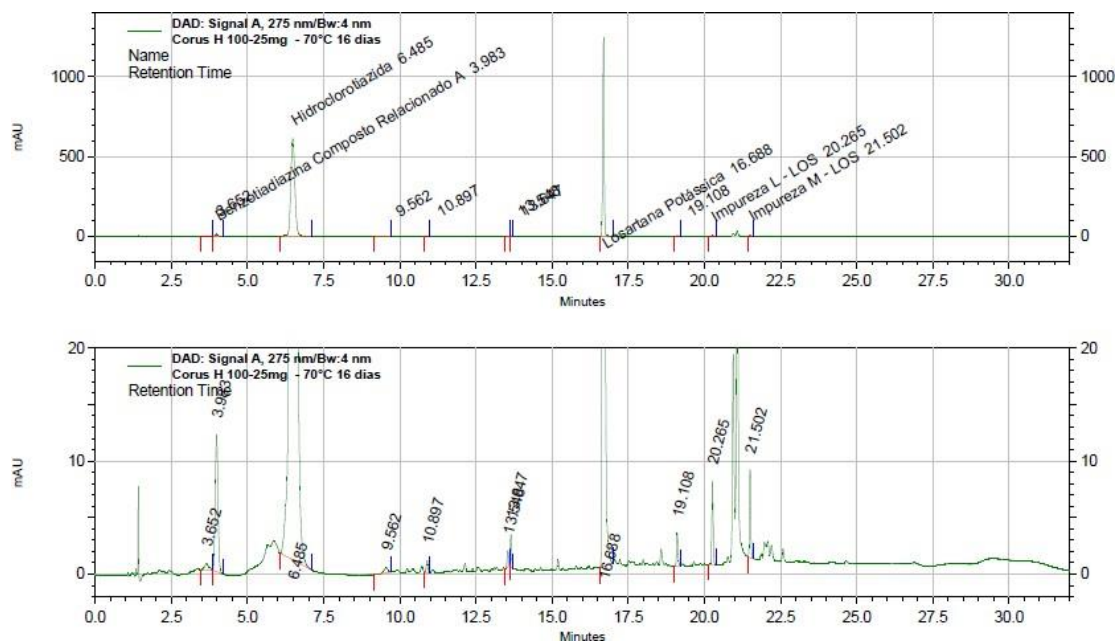
**Figura 32.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em hidrólise básica.



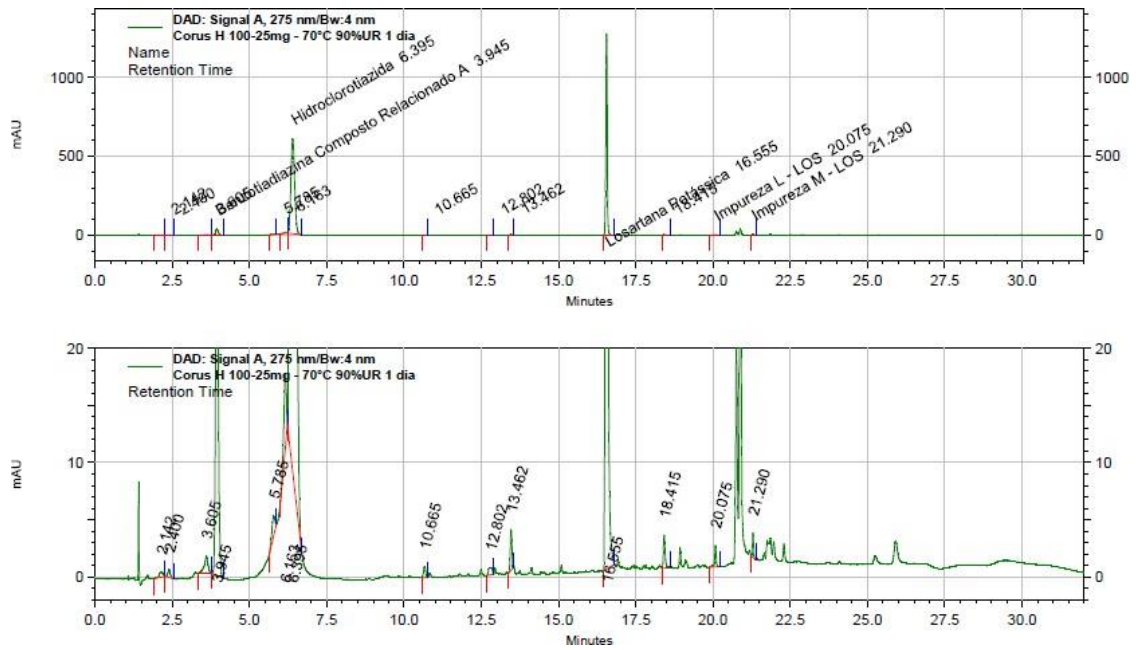
**Figura 33.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em hidrólise oxidativa.



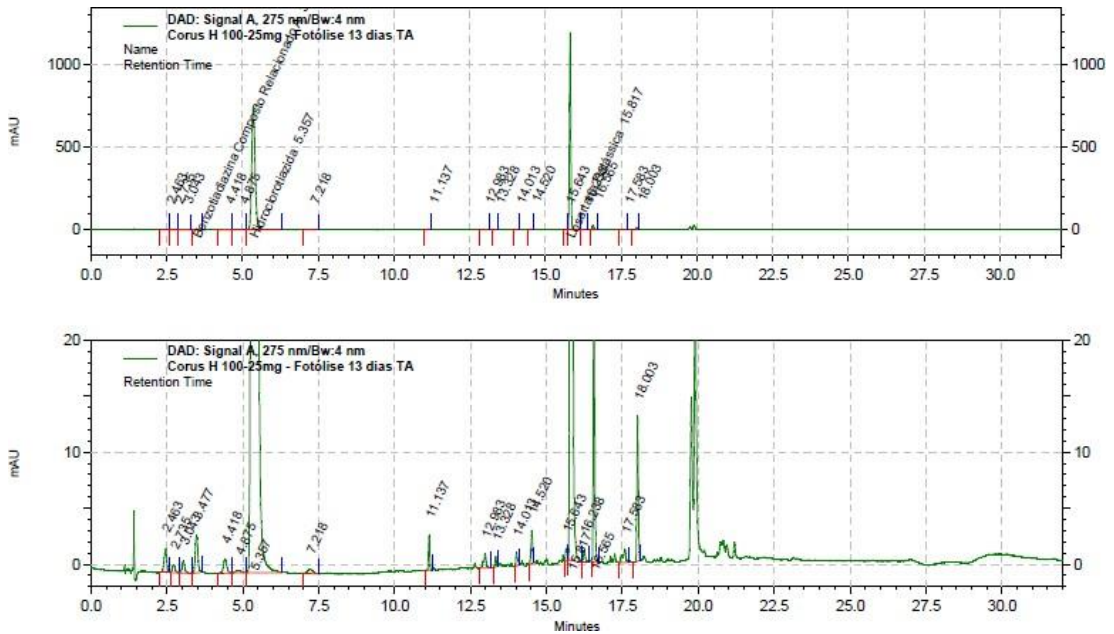
**Figura 34.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em térmica seca.



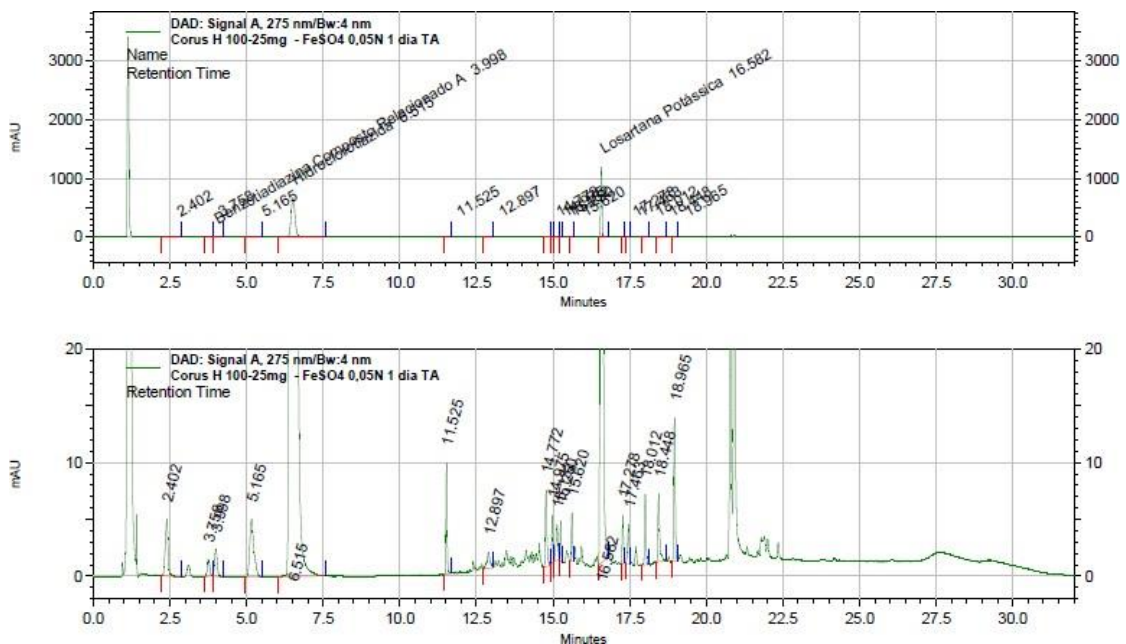
**Figura 35.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em térmica úmida.



**Figura 36.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em fotólise.

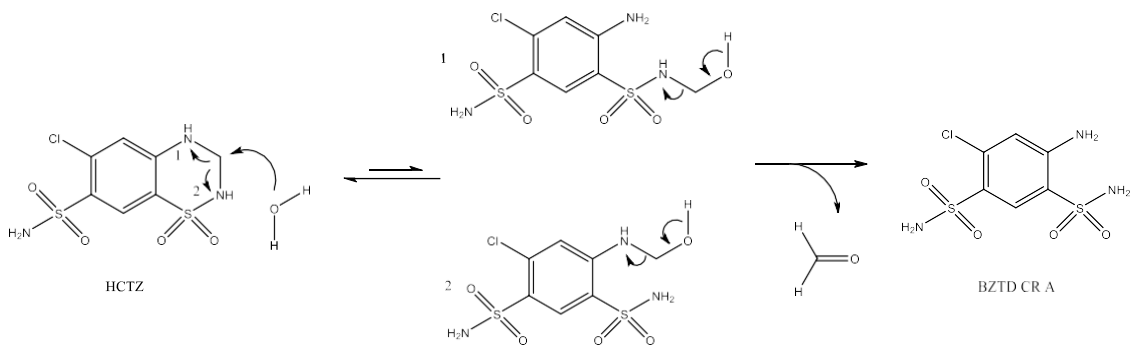


**Figura 37.** Cromatograma da amostra de produto acabado (HCTZ +LOS comprimidos) em oxidação por íons metálicos.



Como é possível observar nas tabelas e nos cromatogramas apresentados anteriormente, a HCTZ apresentou a formação majoritária da impureza BZTD CR A em todas as condições de estresse em que as amostras foram expostas nesse estudo, tanto a matéria-prima isolada como no produto acabado. Sendo assim, podemos considerar que esse produto de degradação é o mais importante para a HCTZ. O mecanismo para a formação da BZTD CR A à partir da HCTZ foi proposto por Min Li com base no mecanismo análogo ao da degradação hidrolítica de compostos tiazídicos, como descrito na Figura 38.

**Figura 38.** Proposta do mecanismo de degradação da HCTZ em BZTD CR A (28).

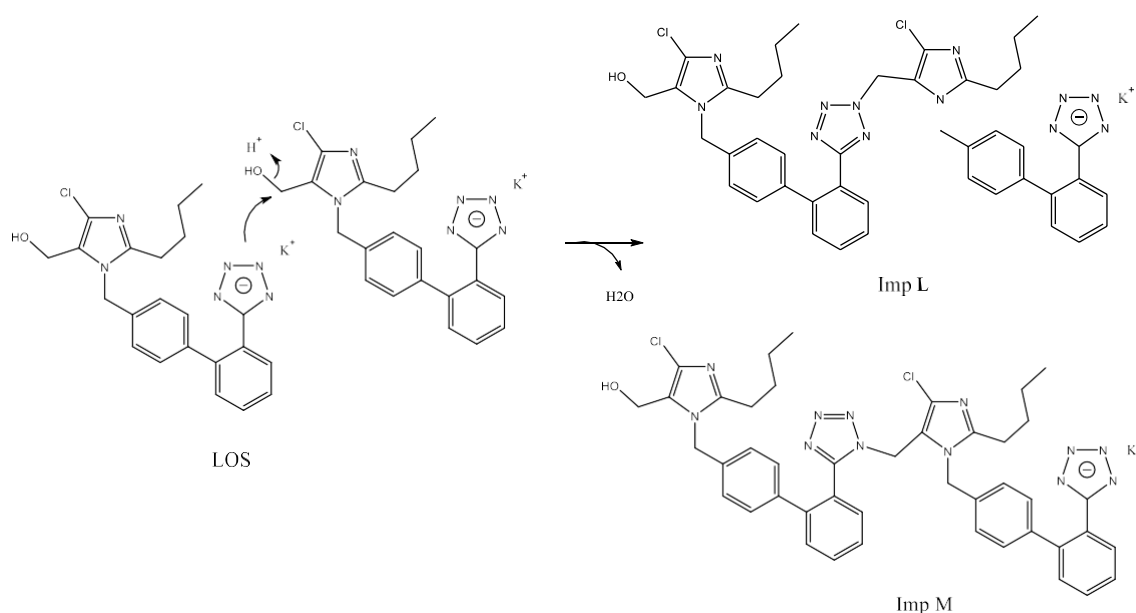




No caso da LOS, pode-se observar a formação de impurezas conhecidas e desconhecidas, presentes tanto na matéria-prima isolada como no produto acabado, sendo a impureza K de LOS presente em praticamente todas as condições de degradação avaliadas e as impurezas L e M de LOS nas condições de hidrólise ácida e na exposição das amostras à temperatura elevada na presença ou não de umidade.

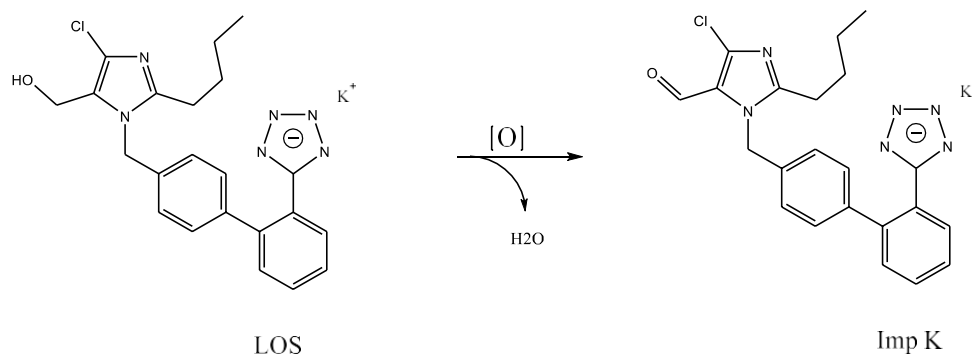
A formação das impurezas L e M de LOS se dá através da dimerização da própria molécula de LOS. Esse mecanismo ocorre devido a presença da carga negativa no anel tetrazólico que atua como um nucleófilo, sendo que a carga desse anel pode estar localizada em qualquer um dos cinco átomos que formam essa estrutura. Como resultado, o anel tetrazólico pode atacar o carbono ligado a hidroxila ligado ao anel imidazólico de uma segunda molécula de LOS, via substituição nucleofílica, resultando na formação de dois possíveis dímeros e a eliminação de uma molécula de água (Figura 39), o que pode ser facilitado em condições onde o meio reacional seja ácido (28)(29)(30).

**Figura 39.** Proposta do mecanismo de degradação da LOS em impurezas L e M (28).



Já a formação da impureza K de LOS pode ser explicada a partir da reação de oxidação de álcool primário que ocorre na presença de oxigênio do meio reacional com um dos hidrogênios do carbono ligado à hidroxila ( $-OH$ ), o que resulta na formação do respectivo aldeído e na eliminação de uma molécula de água (Figura 40).

**Figura 40.** Proposta do mecanismo de degradação da LOS em impureza K.



O balanço de massa foi calculado através da soma da porcentagem dos ativos encontradas na análise de teor mais a porcentagem de todas as impurezas encontradas para cada um dos ativos presentes na formulação, conforme indicado na Equação 1.

Equação 1: 
$$\text{Balanço de Massa} = \% \text{ Teor} + \% \text{ Impurezas Totais}$$

Para a comparação e avaliação das amostras degradadas foi realizado uma normalização do resultado com o balanço de massas da amostra controle, levando em consideração a lei de conservação de massas na qual a amostra controle representa a etapa “antes da degradação” e a amostra degrada como “após a degradação”, chamado de balanço de massa normalizado (BMN), conforme apresentado na Equação 2.

Equação 2: 
$$BMN = \frac{(\% \text{ Teor}_{\text{degradação}} + \% \text{ Impurezas Totais}_{\text{degradação}})}{(\% \text{ Teor}_{\text{Controle}} + \% \text{ Impurezas Totais}_{\text{Controle}})} \times 100$$

Considerou-se como critério de aceitação para o balanço de massa normalizado os valores obtidos entre 95 e 105% em relação a amostra. Adicionalmente, considerou-seos valores de incerteza do teor de HCTZ e LOS e dos produtos de degradação de HCTZ e LOS, para efeito da avaliação do balanço de massa.

**Tabela 39.** Tabela dos resultados de Balanço de Massa para HCTZ no produto acabado.

<b>Amostra</b>	<b>% de Teor</b>	<b>% Total de Impurezas</b>	<b>% Balanço de Massas</b>	<b>% Balanço de Massas Normalizado</b>
Controle	94,3 ± 2,1	0,62 ± 0,20	94,9 ± 2,1	100,0 ± 3,1
Ácida	92,2 ± 2,0	4,27 ± 0,20	96,4 ± 2,0	101,6 ± 3,1
Alcalina	88,5 ± 1,9	4,35 ± 0,20	92,8 ± 2,0	97,8 ± 3,0
Oxidativa	87,7 ± 1,9	5,45 ± 0,20	93,2 ± 1,9	98,1 ± 3,0
Íons Metálicos	90,6 ± 2,0	1,29 ± 0,20	91,9 ± 2,0	96,8 ± 3,0
Térmica seca	88,1 ± 1,9	2,39 ± 0,20	90,5 ± 1,9	95,3 ± 2,9
Térmica úmida	82,8 ± 1,8	7,48 ± 0,20	90,3 ± 1,8	95,1 ± 2,8
Fotólise	94,4 ± 2,1	1,20 ± 0,20	95,6 ± 2,1	100,7 ± 3,1

**Tabela 40.** Tabela dos resultados de Balanço de Massa para LOS no produto acabado.

<b>Amostra</b>	<b>% de Teor</b>	<b>% Total de Impurezas</b>	<b>% Balanço de Massas</b>	<b>% Balanço de Massas Normalizado</b>
Controle	94,9 ± 1,1	0,10 ± 0,20	95,0 ± 1,2	100,0 ± 1,7
Ácida	95,4 ± 1,1	1,16 ± 0,40	96,6 ± 1,2	101,6 ± 1,8
Alcalina	94,0 ± 1,1	1,21 ± 0,28	95,2 ± 1,2	100,2 ± 1,7
Oxidativa	91,3 ± 1,1	1,96 ± 0,28	93,3 ± 1,1	98,2 ± 1,7
Íons Metálicos	90,7 ± 1,1	4,73 ± 0,28	95,4 ± 1,1	100,5 ± 1,7
Térmica seca	94,0 ± 1,1	1,55 ± 0,40	95,6 ± 1,2	100,6 ± 1,8
Térmica úmida	95,9 ± 1,1	1,03 ± 0,40	96,9 ± 1,2	102,1 ± 1,8
Fotólise	92,4 ± 1,1	4,27 ± 0,28	96,7 ± 1,1	101,8 ± 1,7

Como é possível observar nos valores apresentados para o BMN de HCTZ e LOS no produto acabado (conforme apresentado na Tabela 39 e Tabela 40, respectivamente), os resultados obtidos atingiram em todas as condições de degradação a recuperação de massas adequada. Considerando-se os valores de balanço de massas e suas respectivas incertezas, concluímos que não houve diferença metrológica entre os valores de balanço de massas das amostras submetidas à degradação (ácida, alcalina, oxidativa, íons metálicos, térmica seca, térmica úmida e fotólise) e aquele obtido na amostra controle. Dessa forma, podemos comprovar que o método analítico apresenta alto grau de confiabilidade na obtenção dos resultados, comprovando que o método é indicativo de estabilidade.

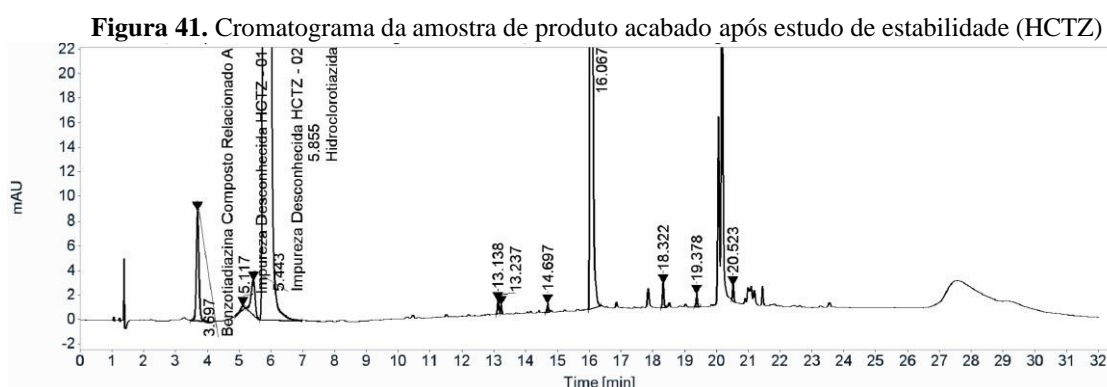
## 11. Identificação das impurezas por LC-MS/MS

Para prever o comportamento do produto em questão nas suas reais condições de exposição aos agentes ambientais (luz, umidade e temperatura) ao longo da sua vida de prateleira, foi realizado um estudo de estabilidade. Dessa forma, o produto foi submetido à câmara de estabilidade nas condições de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$  U.R. (umidade relativa) ao longo do período de 6 meses, sendo dessa forma possível observar as principais impurezas formadas durante o prazo de validade estabelecido.

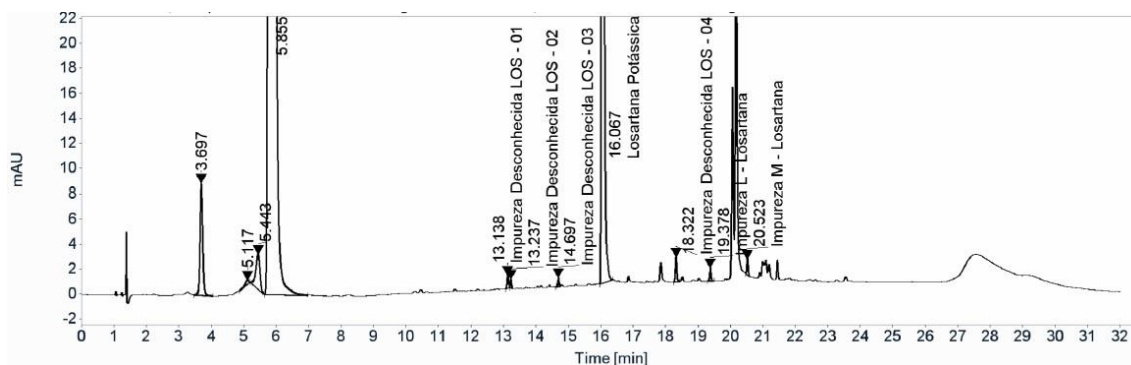
Em seguida, as impurezas, conhecidas ou desconhecidas, foram identificadas pela técnica de espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida, comprovando a possibilidade de se utilizar o método analítico desenvolvido para a elucidação estrutural sem a necessidade de se utilizar um método ortogonal.

### 11.1 Impurezas formadas na estabilidade

Cromatogramas obtidos para amostra de produto acabado submetida à estudo de estabilidade relativos à determinação de HCTZ e LOS estão apresentados na Figura 41 e Figura 42, respectivamente.



**Figura 42.** Cromatograma da amostra de produto acabado após estudo de estabilidade (LOS)



Como pode-se observar na Tabela 41, as impurezas de HCTZ formadas no estudo de estabilidade acima de 0,1% foram a BZTD CR A e uma impureza desconhecida de TRR 0,93.

**Tabela 41.** Tabela dos resultados de impurezas encontradas para HCTZ

Impureza	Concentração (%)
BZTD CR A	1,56
Desconhecida TRR 0,87	0,05
Desconhecida TRR 0,93	0,40
Clorotiazida	-
5-Clorohidro	-
Dímero HCTZ	-
Total de impurezas	2,01

**Observação:** as impurezas abaixo de 0,1% serão desconsideradas por estarem abaixo do limite de notificação como pressuposto pela RDC 53 de Dezembro de 2015 (27).

Como pode-se observar na Tabela 42, a única impureza de LOS formada no estudo de estabilidade acima de 0,1% foi a impureza K.

**Tabela 42.** Tabela dos resultados de impurezas encontradas para LOS

<b>Impureza</b>	<b>Concentração (%)</b>
Impureza B - LOS	-
Impureza C - LOS	-
Impureza D - LOS	-
Impureza E - LOS	-
Impureza F - LOS	-
Impureza H - LOS	-
Impureza I - LOS	-
Impureza J - LOS	-
Impureza K - LOS	0,14
Impureza L - LOS	0,08
Impureza M - LOS	0,09
Impureza Total	0,31

**Observação:** as impurezas abaixo de 0,1% serão desconsideradas por estarem abaixo do limite de notificação como pressuposto pela RDC 53 de Dezembro de 2015 (27).

### **11.1 Identificação das impurezas conhecidas (BZTD CR A e Impureza K de LOS)**

Para poder obter o espectro de massas dos picos referentes a essas impurezas conhecidas, foram utilizados os seguintes parâmetros no equipamento Agilent 6545 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS:

**Ionização:** Dual AJS ESI modo negativo

**Gas Temp:** 350°C

**Drying Gas:** 10L/min

**Nebulizer:** 55 psig

**Sheath Gas Temp:** 325°C

**Sheath Gas Flow:** 9L/min

**VCap:** 3500

**Nozzle Voltage:** 0

**Fragmentor:** 150

**Skimmer:** 65

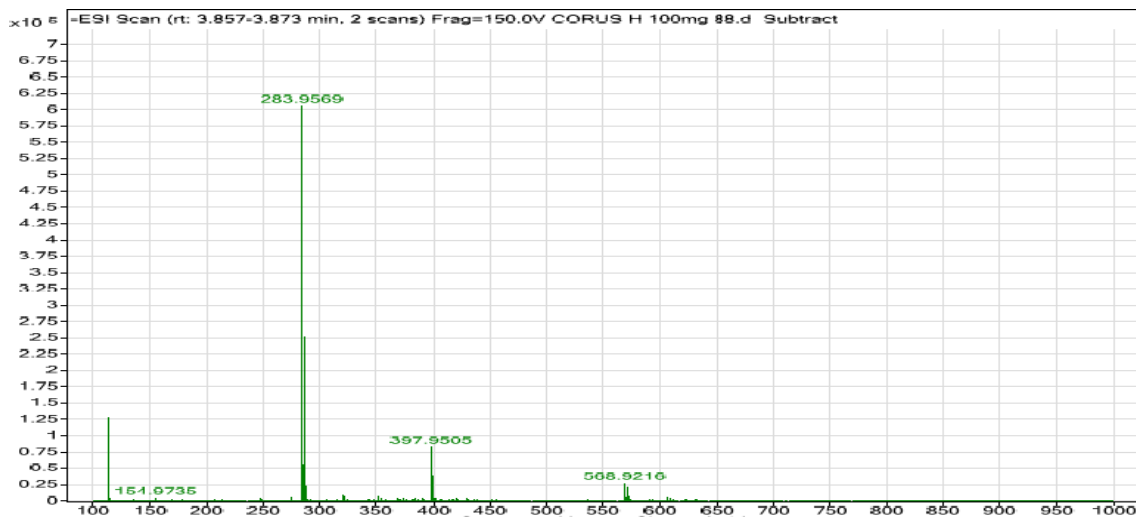
**OCT 1 RF Vpp:** 750

**Mass Range (experimento de íons totais – MS):** 100 - 1000

**Acquisition Rate:** 1 spec/seg

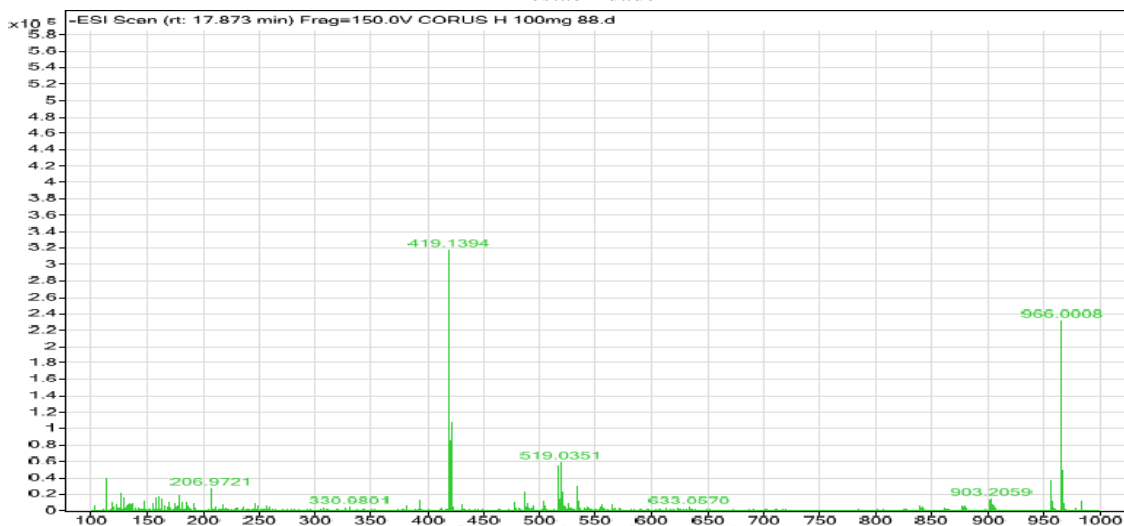
Sendo assim, foi possível obter os seguintes espectros *full scan* para a BZTD CR A e Impureza K de LOS

**Figura 43.** Espectro de massas *full scan* correspondente a impureza BZTD CR A, na amostra de estabilidade



O espectro de massas *full scan* mostra o íon  $m/z$  283,9569, correspondente à forma desprotonada da impureza  $[M-H]^-$ , conforme Figura 43.

**Figura 44.** Espectro de massas *full scan* correspondente a impureza K de LOS, na amostra de estabilidade



O espectro de massas *full scan* mostra o íon  $m/z$  419,1394, correspondente à forma desprotonada da impureza  $[M-H]^-$ , conforme Figura 44.

Na Tabela 43, estão os resultados obtidos pelo software MassHunter Workstation (B.06.01, Agilent). O *score* (%) é a capacidade de prever a porcentagem de acerto com que a fórmula molecular é obtida a partir da comparação com a massa exata do composto,

calculada a partir de sua fórmula molecular. Valores de scores acima de 80% podem ser considerados adequados para a molécula avaliada.

O erro de massa (ppm) indica a pureza da molécula avaliada, visto que erros de massa abaixo de 5.00 ppm são considerados válidos na identificação de substâncias. Abaixo, na Tabela 43, estão reportados os respectivos valores de *score* e erro de massa para da BZTD CR A e da impureza Losartana K e as amostras de estabilidade acelerada.

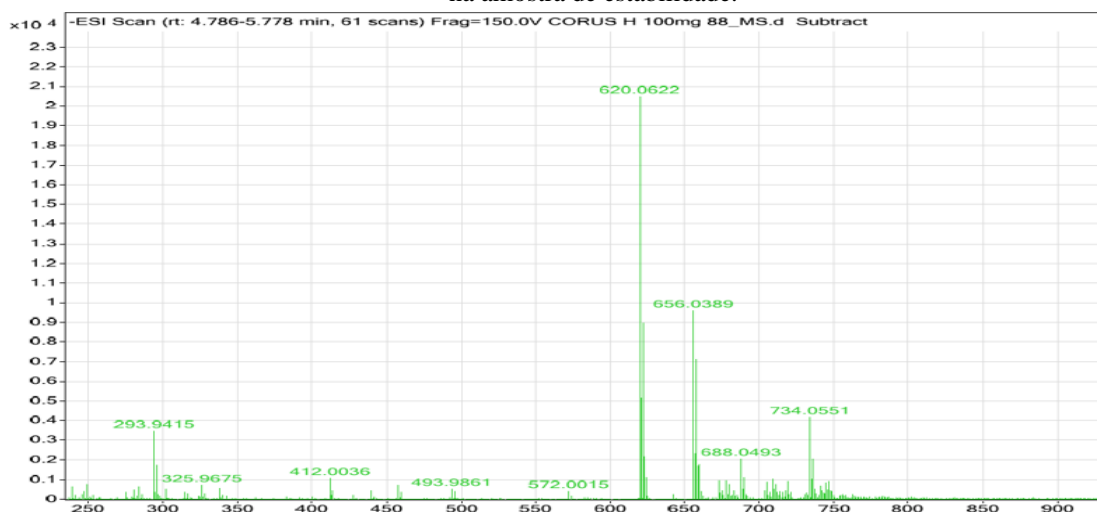
**Tabela 43.** Resultados obtidos pelo software *MassHunter Agilent* para identificação

Composto	Fórmula Molecular	Espécie	<i>m/z</i>	Erro (ppm)	Score (%)
BZTD CR A	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	283.9569	0.60	99.57
Impureza K de LOS	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>6</sub> O	[M-H] <sup>-</sup>	419.1394	-0.15	99.03

## 11.2 Identificação da impureza desconhecida de HCTZ

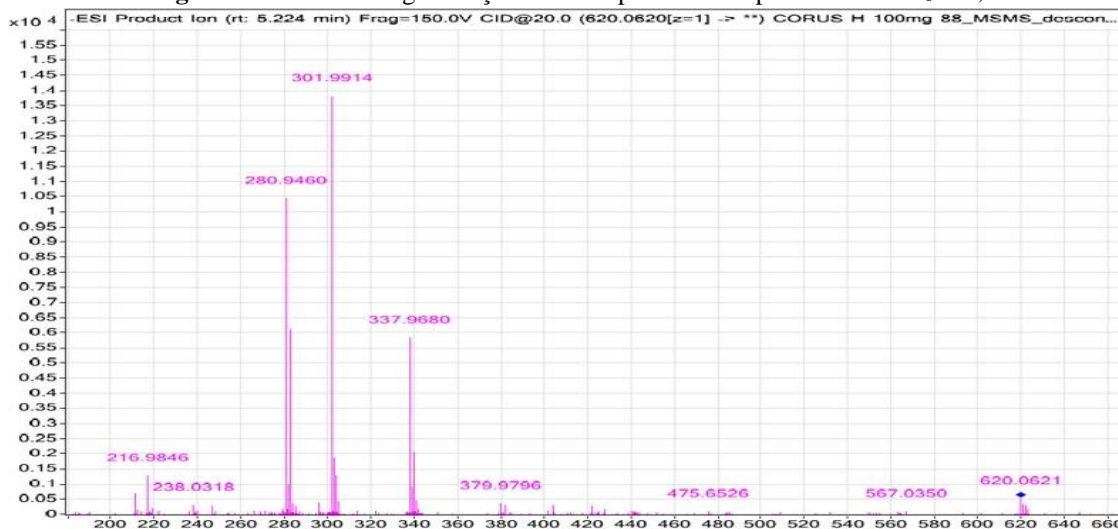
Para a identificação da impureza desconhecida de HCTZ com o TRR de 0,93 apresentado no cromatograma da amostra de estabilidade (Figura 42) utilizou-se o mesmo equipamento e parâmetros descritos no item 11.1. Porém, para elucidar a estrutura dessa molécula houve a necessidade da sua fragmentação para obter-se as informações dos grupos estruturais presentes. Sendo assim, o íon precursor de *m/z* 620,0622 (Figura 45) foi fragmentado com energia de colisão de 20V (Figura 46).

**Figura 45.** Espectro de massas *full scan* correspondente impureza desconhecida de HCTZ TRR 0,93, na amostra de estabilidade.





**Figura 46.** Perfil de fragmentação obtido a partir do íon precursor de  $m/z$  620,0622

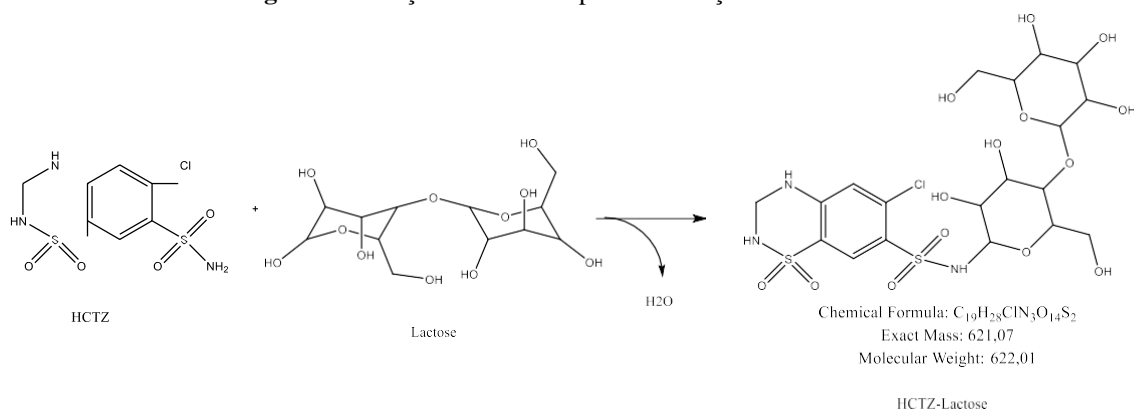


Os excipientes presentes na formulação, em ordem decrescente de proporção contidos no produto, são lactose monohidratada, dióxido de silício, celulose microcristalina, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol, dióxido de titânio, óxido de ferro e amido. Logo, observa-se que a lactose é um excipiente em grande concentração no medicamento.

Harmon, P. A., *et al.*, anteriormente, observou traços da reação que pode ocorrer entre a lactose e o grupo amina ( $-NH_2$ ) contido na molécula da HCTZ, principalmente quando essas duas substâncias sólidas são aquecidas à  $60^\circ C$ , em condições de umidade elevada. Essa reação entre o agrupamento amina e um grupo carbonil é bastante conhecida e chamada de reação de Maillard. Essa reação é conhecida pela indústria de processos alimentícios como reação de escurecimento, uma vez que leva a formação de pigmentos escuros em alimentos que são aquecidos em elevadas temperaturas (31).

Sabendo que a reação de Maillard é mais favorável em aminas primárias em comparação a aminas secundárias, pode-se propor a seguinte reação para a formação da impureza HCTZ-Lactose (32)(33).

**Figura 47.** Reação de Maillard para a formação da HCTZ-Lactose.



Com base nas informações apresentadas, pode-se atribuir ao íon com  $m/z$  620,0622 obtido no espectro da amostra de estabilidade para o pico de impureza desconhecida de HCTZ, corresponde à HCTZ-Lactose com a perda de um Hidrogênio da molécula, resultando no íon  $[M-H]^-$ . Somando-se a essa evidência para a confirmação da estrutura da molécula, os fragmentos gerados a partir do íon  $[M-H]^-$  resultaram nos mesmos fragmentos obtidos por Harmon, P. A., *et al.*, para fragmentação da molécula de HCTZ-Lactose em seu estudo. Além disso o erro de massa em ppm obtido nesse estudo apresentou-se menor do que 1ppm e o *score* foi de 98,3% (Tabela 44), o que confirma a razão isotópica obtida experimentalmente com a razão isotópica teórica. Dessa forma, pode-se confirmar que a impureza desconhecida de TRR 0,93 de HCTZ se trata da HCTZ-Lactose.

**Tabela 44.** Resultados obtidos pelo software *MassHunter Agilent* para identificação da HCTZ-Lactose

Composto	Fórmula Molecular	Espécie	$m/z$	Erro (ppm)	Score (%)
HCTZ-Lactose	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub>	$[M-H]^-$	620.0622	0.97	98.33

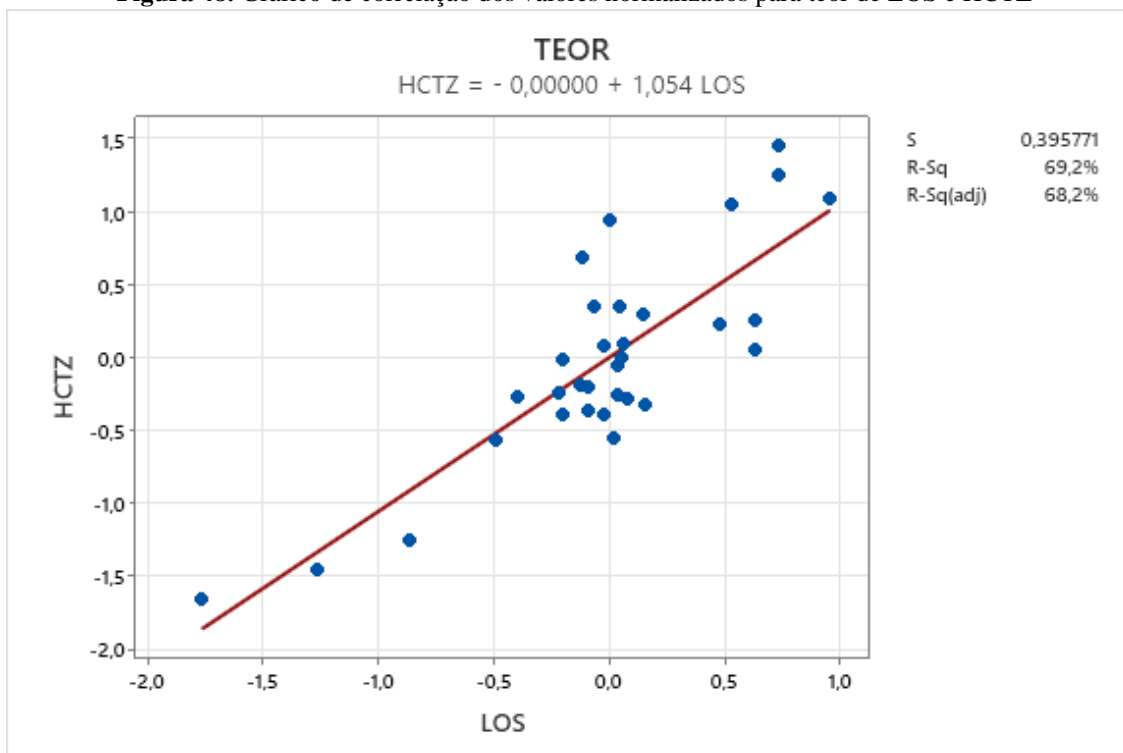
## **12. Correlação metrológica entre os componentes da matriz e o impacto nas tomadas de decisões**

Como HCTZ e LOS são quantificadas através do mesmo procedimento analítico, ou seja, compartilham as mesmas etapas de análise do produto, uma vez que esses dois ativos estão inseridos no mesmo comprimido. Logo o preparo da amostra, a corrida analítica e a medição desses componentes estarão correlacionadas. Sendo assim, a proximidade dos valores obtidos experimentalmente para o doseamento de HCTZ e LOS com os limites superior e inferior permitidos pela legislação, a incerteza de medição e a correlação entre eles afetam o risco nas tomadas de decisões para a conformidade do produto.

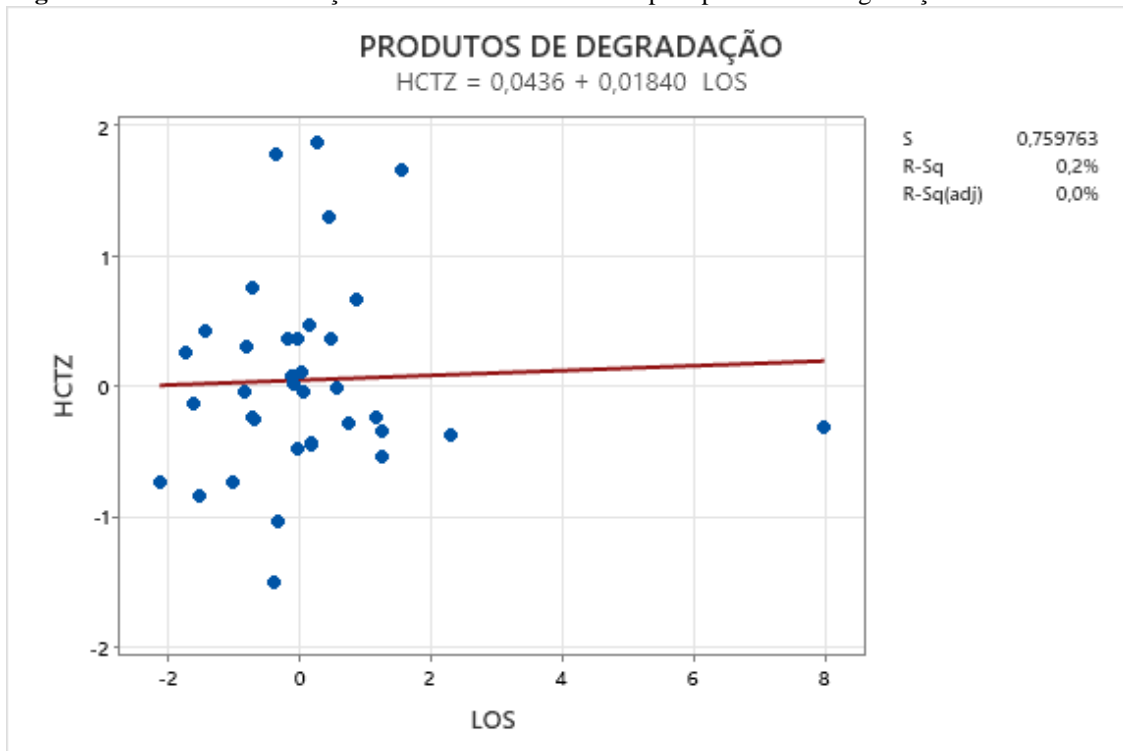
Esse risco pode ser dividido entre: o risco do consumidor, do qual ocorre a probabilidade de se aceitar lotes fora dos limites de tolerância pressuposto pela legislação, o que pode comprometer a qualidade, eficácia e segurança do medicamento para o consumidor final. Já no risco do produtor, ocorre a probabilidade de se rejeitar lotes que poderiam ser aceitos dentro dos critérios mínimos permitidos. Ao se rejeitar um lote bom aumenta-se o custo de produção e perdas para o fabricante do medicamento. Além disso, pode-se atribuir como sendo o risco global aquele associado a qualquer lote produzido que será mensurado pela metodologia analítica e o risco específico sendo aquele associado a tomada de decisão falsa para um lote em particular (34)(35).

Para realizar uma melhor avaliação do risco na tomada de decisão para a conformidade do produto em questão, utilizou-se as incertezas calculadas para cada um dos componentes da matriz indicadas nos itens 9.2.1 (Teor) e 9.2.2 (Produtos de Degradação) juntamente com o coeficiente de correlação obtido a partir dos resultados normalizados pela média da validação analítica (precisão e exatidão) e da robustez do método, todos apresentados nas figuras 48 (teor) e 49 (produtos de degradação), além dos limites estabelecidos para as especificações do produto.

**Figura 48.** Gráfico de correlação dos valores normalizados para teor de LOS e HCTZ



**Figura 49.** Gráfico de correlação dos valores normalizados para produtos de degradação de LOS e HCTZ



Conforme os gráficos apresentados e os respectivos valores para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), pode-se encontrar o coeficiente de correlação ( $R$ ) através da raiz

quadrada de  $R^2$ , logo, o coeficiente de correlação para teor é de 0,832 e o coeficiente de correlação para produtos de degradação é de 0,044.

Estimar o risco particular e global dentro da rotina de um laboratório tende a ser uma atividade bastante trabalhosa e conseqüentemente demorada, sendo assim, o uso de zonas de aceitação e rejeição torna-se uma alternativa bastante atrativa para implementar dentro de um laboratório de controle de qualidade. Quando o resultado obtido para um lote estiver dentro da zona de aceitação, pode-se considerar que o lote está dentro da especificação e aceito, porém o contrário acontece quando o resultado de um lote estiver dentro da zona de rejeição. Essas zonas são definidas pela soma ou subtração de uma banda de guarda dos limites da especificação (35).

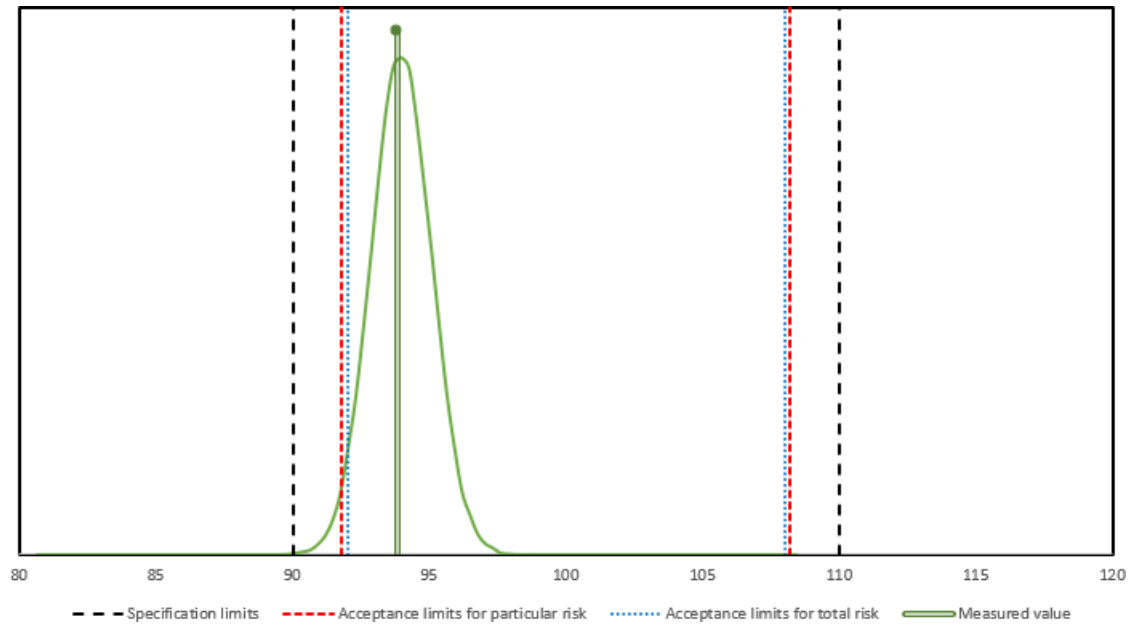
Por realizar a avaliação de mais de um parâmetro no mesmo produto, a utilização da banda de guarda multivariada é a mais indicada nesse caso. Esse tipo de estimativa é uma forma simples de garantir a redução do risco total (menor do que 5% para o risco de tomada decisões falsas), pois leva em consideração a incerteza padrão da metodologia multiplicada por um fator de cobertura multivariado ( $k'$ , determinado pelo método de simulação de Monte Carlo) associado ao coeficiente de correlação entre os parâmetros em questão (teor de LOS e HCTZ) (35).

Como pode ser observado na Tabela 45 e ilustrado nas Figuras 50 e 51, as bandas de guardas foram obtidas através da subtração da  $g'$  (banda de guarda multivariada) ao limite superior da especificação do produto e da soma da  $g'$  ao limite inferior da especificação do produto. Com isso torna-se ainda mais restrito os critérios de aceitação para as liberações de lotes na rotina do laboratório, tornando o risco particular e global menor do que 5%.

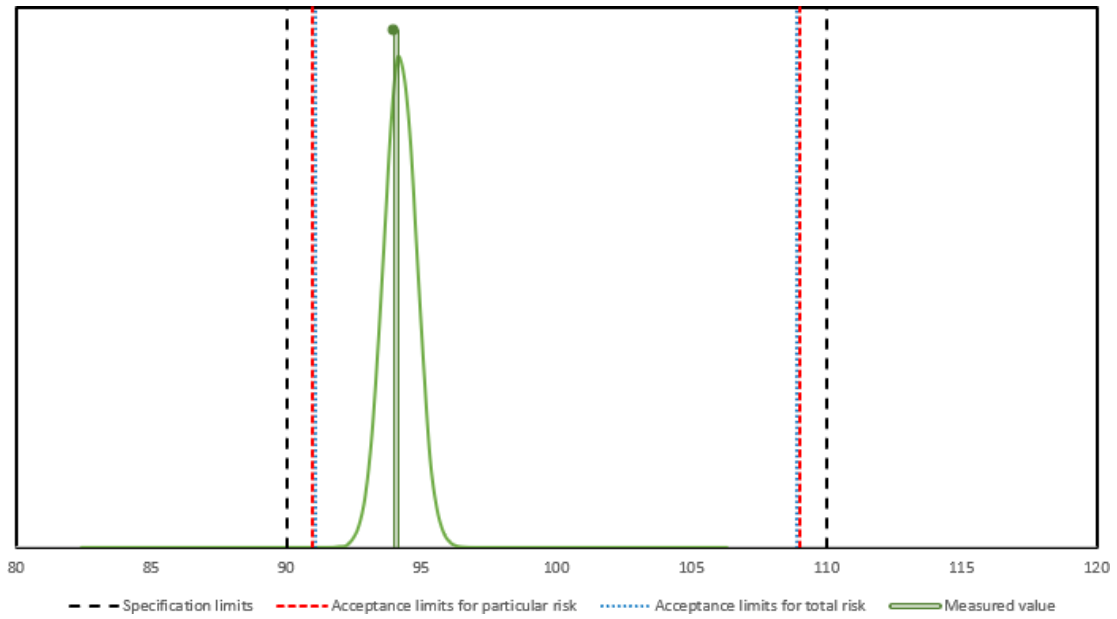
**Tabela 45.** Resultados obtidos, incerteza da metodologia, especificação do produto, limites de aceitação univariado e multivariado.

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado do lote (%)</b>	<b>Incerteza (%)</b>	<b>Especificação (%)</b>	<b>Limites de aceitação (risco particular) (%)</b>	<b>Limites de aceitação (risco total) (%)</b>
Teor de HCTZ	93,8	1,1	90,0 – 110,0	91,8 – 108,2	92,0 – 108,0
Teor de LOS	94,1	0,6	90,0 – 110,0	91,0 – 109,0	91,1 – 108,9

**Figura 50.** Histograma do valor obtido do lote para o teor de HCTZ



**Figura 51.** Histograma do valor obtido do lote para o teor de LOS



### 13. Conclusão

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que:

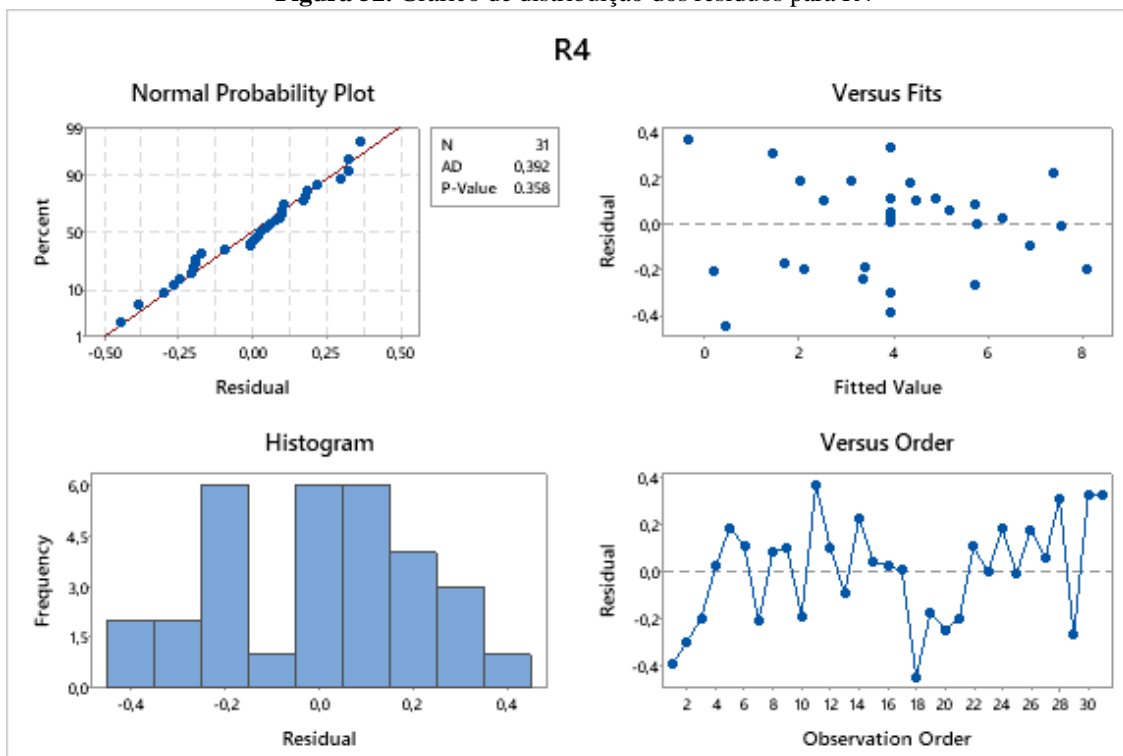
- a) A etapa de triagem, que utilizou o delineamento experimental do tipo Plackett-Burman, com 11 fatores e 2 níveis, permitiu selecionar os principais fatores da metodologia analítica, ou seja, aqueles que mais impactaram nas respostas avaliadas durante o estudo, que foram a temperatura da coluna, a proporção de fase móvel aquosa inicial, o fluxo e o tempo de gradiente.
- b) Já a etapa de otimização do método, que empregou o delineamento de compósito central (CCD), permitiu a elaboração de modelos matemáticos para definir a região de operação da metodologia (MODR), sendo a condição ideal definida: temperatura de 40°C, 94% de proporção de fase móvel aquosa inicial, fluxo de 1,3 mL/minuto e tempo de gradiente de 13 minutos.
- c) A etapa de robustez cromatográfica provou que a metodologia é robusta dentro da região de controle do método, uma vez que atendeu os critérios mínimos estabelecidos em todas as variações do método avaliadas e permitiu estabelecer o *System Suitability*, o que possibilita implementar o controle e melhoria contínua à metodologia analítica.
- d) O método pode ser considerado validado uma vez que atende os critérios mínimos estabelecidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de quantificação e robustez.
- e) O estudo de degradação forçada indicou que o produto pode sofrer degradação em todas as condições de estresse avaliadas (hidrólise ácida e básica, degradação térmica sem e com umidade, fotólise, oxidação por peróxido e íons metálicos) e prevê que os principais produtos de degradação da molécula de HCTZ é a impureza conhecida como BZTD CRA e a impureza desconhecida HCTZ-Lactose. Para a molécula de LOS os principais produtos de degradação formados são as impurezas conhecidas como L, M e K. Além disso, o estudo de degradação forçada comprovou que o método é indicativo de estabilidade, pois apresentou os resultados de balanço de massas satisfatórios em todas as condições de estresse.

- f) Todas as principais impurezas de HCTZ e LOS foram identificadas utilizando LC-MS/MS com a aplicação da metodologia desenvolvida, comprovando que é possível aplica-la tanto em detectores de DAD como de espectrometria de massas.
- g) Com base nos resultados da incerteza da metodologia analítica, fator de correlação entre o teor de HCTZ e LOS e a especificação do produto, pode-se dizer que o lote avaliado no estudo encontra-se dentro da banda de guarda multivariada de aceitação, indicando que apresenta um baixo risco total para o consumidor.

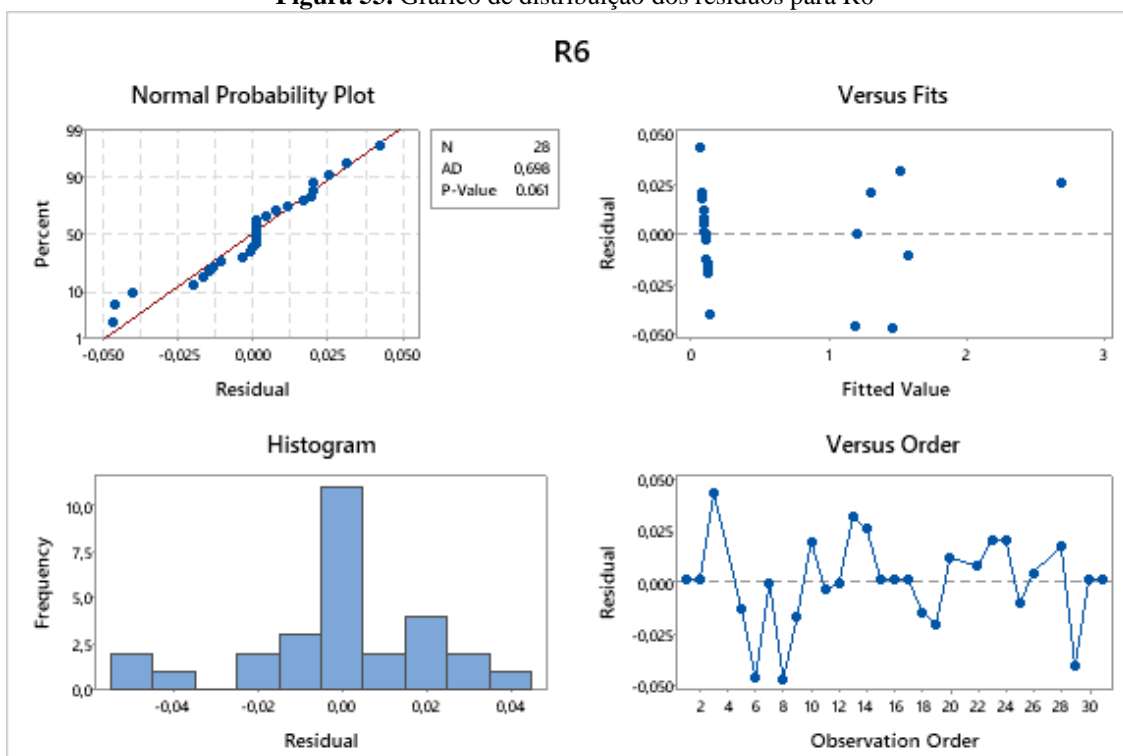


## ANEXO

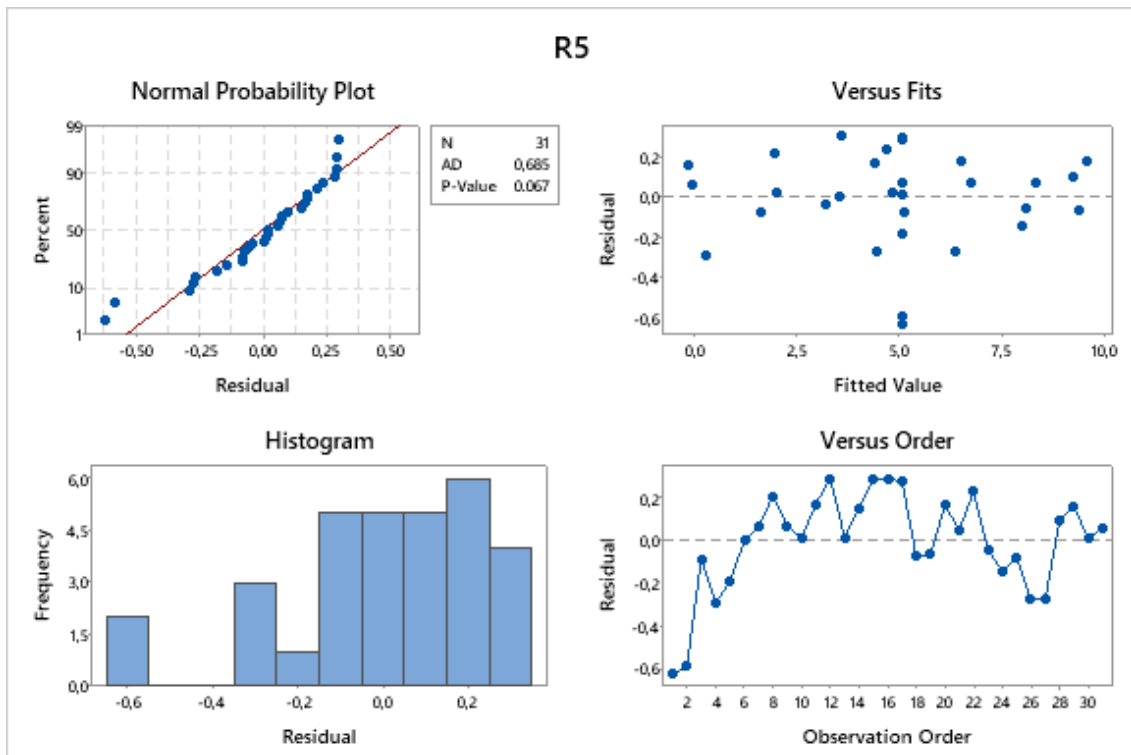
**Figura 52.** Gráfico de distribuição dos resíduos para R4



**Figura 53.** Gráfico de distribuição dos resíduos para R6



**Figura 54.** Gráfico de distribuição dos resíduos para R5



**Figura 55.** Gráfico de distribuição dos resíduos para R17

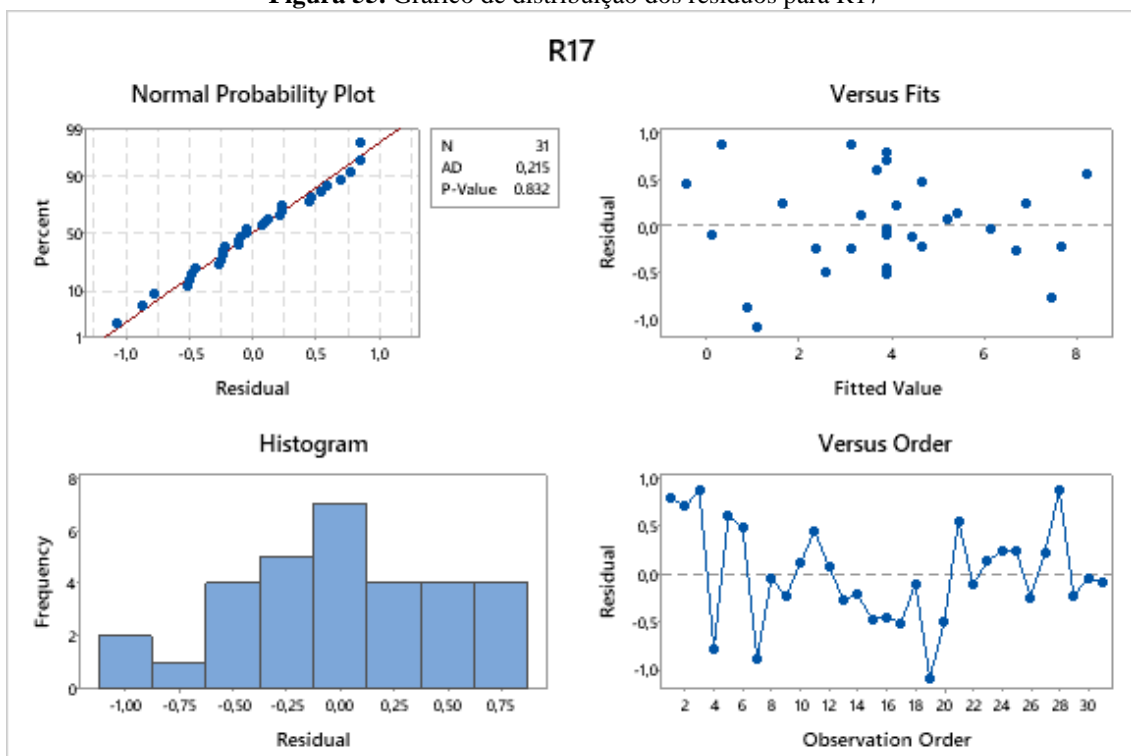


Figura 56. Gráfico de distribuição dos resíduos para R14

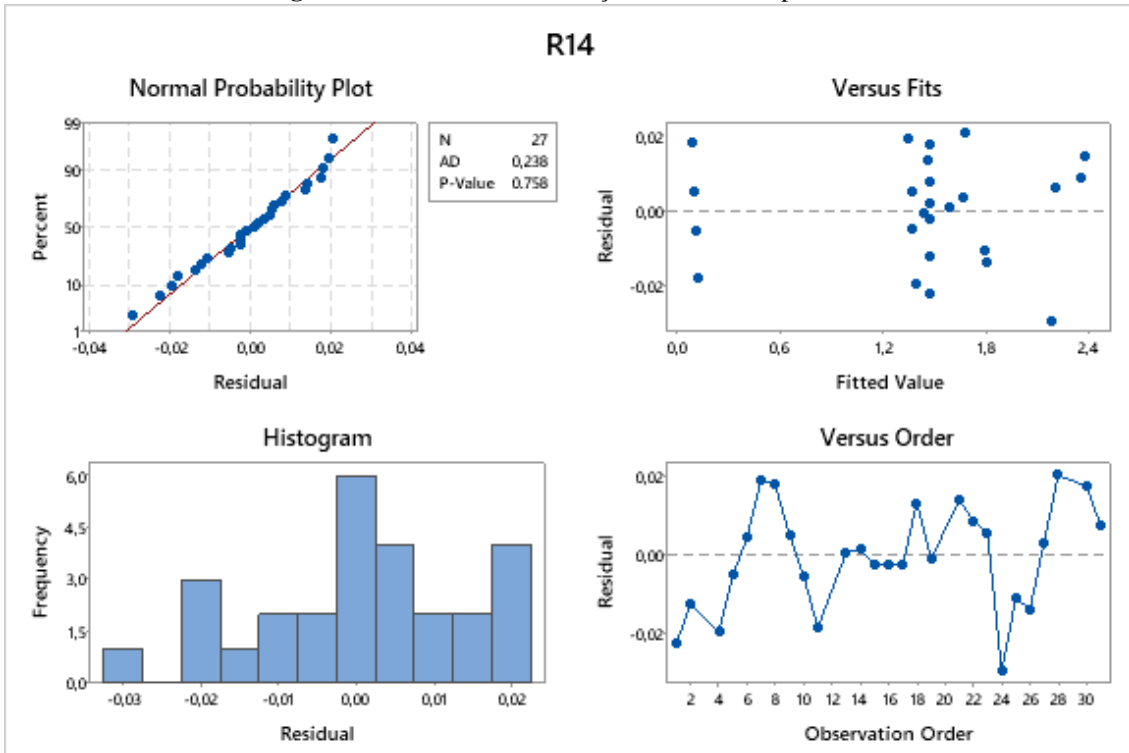
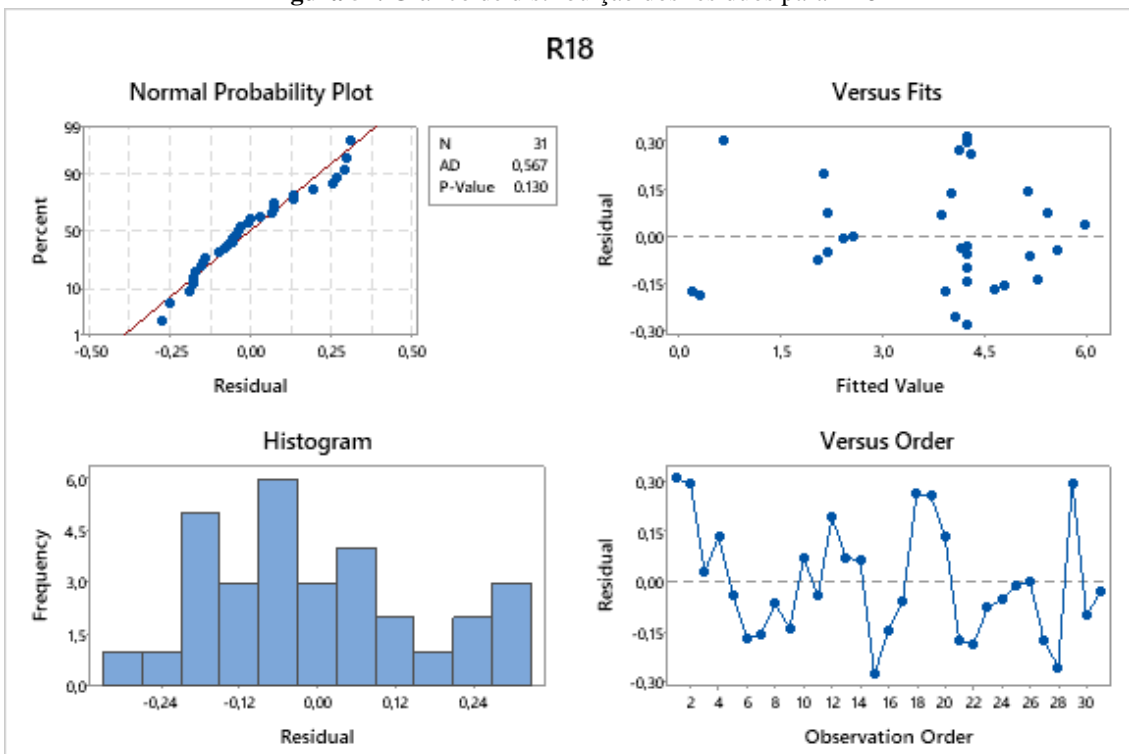


Figura 57. Gráfico de distribuição dos resíduos para R18



## 14. Referências

1. García Aponte OF, Vallejo Díaz BM, Mora Huertas CE. La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. *Estud Gerenciales*. janeiro de 2015;31(134):68–78.
2. Peraman R, Bhadraya K, Padmanabha Reddy Y. Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. *Int J Anal Chem*. 2015;2015:1–9.
3. Moreira C dos S, Lourenço FR. 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*. maio de 2020;154:104610.
4. Beg S, Hasnain MS, Rahman M, Swain S. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications. Em: *Pharmaceutical Quality by Design* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 2 de março de 2022]. p. 1–17. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128157992000010>
5. Beg S, Haneef J, Rahman M, Peraman R, Taleuzzaman M, Almalki WH. Introduction to analytical quality by design. Em: *Handbook of Analytical Quality by Design* [Internet]. Elsevier; 2021 [citado 2 de março de 2022]. p. 1–14. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128203323000091>
6. Orlandini S, Pinzauti S, Furlanetto S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal Bioanal Chem*. janeiro de 2013;405(2–3):443–50.
7. Sangshetti JN, Deshpande M, Zaheer Z, Shinde DB, Arote R. Quality by design approach: Regulatory need. *Arab J Chem*. maio de 2017;10:S3412–25.
8. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira C dos S, Saviano AM, Lourenço FR. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Braz J Pharm Sci* [Internet]. 8 de novembro de 2018 [citado 19 de março de 2022];54(spe). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502018000700405&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502018000700405&lng=en&tlng=en)

9. Bhutani H, Kurmi M, Singh S, Beg S, Singh B. Quality by Design (QbD) in Analytical Sciences: An Overview. :6.
10. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 15 de setembro de 2008;76(5):965–77.
11. Vera Candiotti L, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. junho de 2014;124:123–38.
12. N. Politis S, Colombo P, Colombo G, M. Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm*. 3 de junho de 2017;43(6):889–901.
13. Heyden YV, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;31.
16. Principios de Farmacologia (A base fisiopatológica da farmacoterapia) 2ªEd David E. Golan.
17. Matindale – The Complete Drug Reference, 2009, 36nd Ed. Pharmaceutical Press, USA.
18. SANDOZ NOVARTIS COMPANY. **Losartana Potássica + Hidroclorotiazida**. 2018. Disponível em: <https://www.sandoz.com.br/sites/www.sandoz.com.br/files/PF-Losatana%20BHCT.pdf>. Acesso em: 31 out. 2020.
19. ICH Q1A R2 de 01 de agosto de 2003
20. RDC 318 de 06 de novembro de 2019 (Anvisa)
21. Chemicalize – Instant Cheminformatics Solutions. *Chemicalize*. [online] <https://chemicalize.com/welcome>.
22. Waters. BEH-Ethylene Bridged Hybrid Tecnology. [online] [https://www.waters.com/waters/en\\_US/BEH-\(Ethylene-Bridged-Hybrid\)-technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-(Ethylene-Bridged-Hybrid)-technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_US).

23. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.
24. Suporte Minitab. [Online] <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/response-surface/analyze-response-surface-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/effects-plots/#:~:text=A%20gr%C3%A1fico%20de%20Pareto%20mostra,quais%20efeitos%20s%C3%A3o%20estatisticamente%20significativos>.
25. AOAC Official Methods of Analysis: “Guidelines for standard method performance requirements”.
26. RDC N°166, julho de 2017 – “Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências”.
27. RDC N°53, dezembro de 2015 – “Estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares”
28. LI, Min. **Organic Chemistry of Drug Degradation**. Ringoes, New Jersey: Royal Society Of Chemistry, 2012.
29. K. E. McCarthy, Q. Wang, E. W. Tsai, R. E. Gilbert, D. P. Ip and M. A. Brooks, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 17, 671.
30. Z. Zhao, Q. Wang, E. Tsai, X. Qin and D. Ip, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 20, 129
31. HARMON, P. A., *et al.* *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Proton Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Trace Level Condensation Products*

Formed Between Lactose and the Amine-Containing Diuretic Hydrochlorothiazide.  
Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 89, N7, 2000.

32. Ellis GP. 1959. The Maillard reaction. *Adv CarbohydrChem* 14:63–134.
33. Hodge JE. 1965. The Amadori rearrangement. *Adv Carbohydr Chem* 10:169–205
34. Lourenço FR, Bettencourt da Silva RJN. Risk of false conformity decisions of multicomponent items controlled by correlated measurement results due to the sharing of analytical steps. *Talanta*. maio de 2019;196:174–81.
35. da Silva CM, Lourenço FR. Definition of multivariate acceptance limits (guard-bands) applied to pharmaceutical equivalence assessment. *J Pharm Biomed Anal*. janeiro de 2023;222:115080.