

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL**

CLAUDIA REGINA PAZINI

**ADEQUABILIDADE DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DE ACICLOVIR 50 MG G⁻¹
CREME DERMATOLÓGICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Toledo
2019

CLAUDIA REGINA PAZINI

**ADEQUABILIDADE DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DE ACICLOVIR 50 MG G⁻¹
CREME DERMATOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Pós Graduação - Especialização em Análise instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, cumprimento parcial aos requisitos necessários a obtenção de título de Especialista em Análise Instrumental.

Orientador (a): Caroline Mariana de Aguiar

Toledo
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

ADEQUABILIDADE DE MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DE ACICLOVIR 50 MG G⁻¹ CREME DERMATOLÓGICO

CLAUDIA REGINA PAZINI

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização (TCCE) apresentado em 07 de junho de 2019 às 14:00 horas como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADA.

Prof^a. Caroline Aguiar
Orientadora

Profa. Dr^a Viviane
Lobo
Membro da banca

Profa. Guilherme Felipe
Lenz
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Diretoria de pesquisa e pós-graduação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *Campus* Toledo.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2.1 OBJETIVO GERAL.....	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2.3 JUSTIFICATIVA.....	2
3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	3
3.1 ACICLOVIR	3
3.1.1 Grupos funcionais suscetíveis a degradação	4
3.2 VALIDAÇÃO/ADEQUABILIDADE DE MÉTODOS	7
3.2.1 Parâmetros experimentais de validação/adequabilidade.....	8
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	10
4.1 MATERIAL	13
4.1.1 Amostras.....	13
4.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SRQ).....	13
4.2 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO.....	14
4.2.1 Técnica.....	14
4.2.2 Preparo das soluções	14
4.3 Seletividade	17
4.3.1 Preparo das soluções padrão.....	18
4.3.2 Preparo das soluções estoque seletividade.....	18
4.3.4 Procedimento experimental	23
4.4 LINEARIDADE	23
4.4.1 Preparo das soluções	24
4.4.2 Procedimento Experimental.....	25
4.5 PRECISÃO	26
4.5.1 Preparo das amostras.....	26
4.5.2 Procedimento Experimental.....	26
4.5.3 Critérios de aceitação	26
4.6 EXATIDÃO.....	27
4.6.1 Preparo das soluções	27
4.6.2 Procedimento Experimental.....	28
4.6.3 Critérios de aceitação	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 SELETIVIDADE	29

5.1.1. Análise de pureza de pico.....	29
5.1.4 Discussões dos resultados obtidos com as amostras submetidas a degradação ácida, alcalina, oxidativa e por íons metálicos.....	42
5.1.5 Amostras de degradação fotolítica e térmica.....	43
5.1.6 Discussões dos resultados obtidos com as amostras submetidas a estresse fotolítico e térmico	45
5.2 LINEARIDADE	46
5.3 PRECISÃO	49
5.3.1 Repetibilidade	49
5.3.2 Intermediária	50
5.4 EXATIDÃO.....	51
6. CONCLUSÃO	53
7 Referências Bibliográficas	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras utilizadas nos testes de Adequabilidade.....	23
Tabela 2 - Materiais e equipamentos utilizados na adequabilidade.....	23
Tabela 3 - Padrões utilizados para a adequabilidade do método.....	24
Tabela 4 - Preparo das Soluções utilizadas para a análise de Doseamento de Aciclovir.....	25
Tabela 5 - Gradiente Fase Móvel.....	25
Tabela 6 - Condições e tempo de degradação forçada.....	28
Tabela 7 - Preparo das soluções estoque teste e controle.....	29
Tabela 8 - Preparo das soluções seletividade para submetidas a Estresse Químico.....	30
Tabela 9 - Condições de exposição estressantes para pré tratamento das amostra para testes de seletividade submetidas a estresse físico.....	31
Tabela 10 - Preparo das soluções seletividade submetidas a Estresse Físico após pré tratamento.....	32
Tabela 11- Diluições da linearidade.....	34
Tabela 12 - Especificação para Repetibilidade e Precisão Intermediária.....	37
Tabela 13 - Condições de estresse e tempo de exposição evidência de heterogeneidade espectral.....	40
Tabela 14 - Resultados da avaliação de pureza de pico de Aciclovir, no Padrão e PA (purity angle/ purity threshold).....	45
Tabela 15 - Resultados da avaliação de pureza de pico de Aciclovir, no PA e IFA (purity angle/ purity threshold).....	45
Tabela 16 - Resultados da avaliação de pureza de pico de Aciclovir, no IFA (purity angle/ purity threshold).....	46
Tabela 17 - Resultados das soluções em estresse ácido, básico, oxidativo e por íon metálico.....	53
Tabela 18 - Resultados das soluções em estresse fotolítico.....	56
Tabela 19 - Resultados das soluções em estresse Térmico.....	56

Tabela 20 – Resultados de teste ANOVA para Aciclovir.....	57
Tabela 21 – Dados dos coeficientes de regressão segundo teste ANOVA para Aciclovir.....	58
Tabela 22 – Resultados da Estatística de regressão.....	58
Tabela 23 – Resultados de variância - Teste de Cochran para Aciclovir.....	60
Tabela 24 – Resultados da Precisão 1º dia.....	60
Tabela 25 – Resultados da Precisão 2º dia.....	61
Tabela 26 – Resultados da Precisão Intermediária.....	61
Tabela 27 - Resultados obtidos a partir dos testes de Exatidão para três níveis os três níveis.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do mecanismo de ação do Aciclovir. Fonte: STULZER, 2008.....	12
Figura 2 - Estrutura Aciclovir. Fonte: PubChem, 2010.....	13
Figura 3 - Grupos funcionais de Aciclovir.....	14
Figura 4 - Formas protonadas da purina. Fonte: Joule e Mills, 2010.....	14
Figura 5 - Basicidade de purinas substituídas. Fonte: Adaptado de Joule e Mills, 2010.....	14
Figura 6 - Reação de adição e substituição em álcoois. Fonte: BRUICE, 2014.....	16
Figura 7 - Componentes básicos de CLAE. Fonte: GE Healthcare, 2019.....	20
Figura 8 - Cromatograma da Solução Padrão de Aciclovir.....	45
Figura 9 - Espectro de absorção na região UV-VIS para Aciclovir, na solução padrão.....	46
Figura 10 - Purity Plot da Solução Padrão.....	46
Figura 11 - Cromatograma Solução Padrão de Aciclovir – Avaliado no MaxPlot com 10 µL de injeção.....	47
Figura 12 - Parâmetros de Purity.....	48
Figura 13 - Cromatograma da solução padrão no MAX Plot onde foi definido o intervalo de ruído.....	48
Figura 14 - Noise Spectrum Padrão.....	49
Figura 15 - Cromatograma da solução amostra no MAX Plot onde foi definido o intervalo de ruído.....	49
Figura 16 - Noise Spectrum Amostra.....	50
Figura 17 - Cromatogramas das Soluções Controle – Químicos (Ácido, básico, oxidativo e íons metálicos)/Físicos-Fotolítico: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B;	

(C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Branco; (H) Placebo.....	52
Figura 18 – Cromatogramas das Soluções Controle – Físicos-Térmico: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802.....	53
Figura 19 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação ácida (HCl 1,0 M) durante 02 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.....	54
Figura 20 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação alcalina (NaOH 1,0 M) durante 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.....	55
Figura 21 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação por peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂ 3%) durante 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.....	57
Figura 22 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação em íons metálicos (FeCl ₃) durante 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.....	58
Figura 23 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação fotolítica (2 ciclos): (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.....	60
Figura 24 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação térmica durante o período de 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.....	61
Figura 25 - Curva de calibração de Aciclovir.....	63

Figura 26 – Gráfico de Resíduos para Aciclovir.....	63
---	----

PAZINI, Claudia Regina. Adequabilidade de método analítico para identificação e doseamento de Aciclovir 50 mg g⁻¹ Creme Dermatológico. 72p. 2019. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.

RESUMO

O propósito deste trabalho foi especificar as diretrizes para a adequabilidade da metodologia analítica de Aciclovir creme, para a análise de doseamento, garantindo através de estudos experimentais, que o método atende os parâmetros analíticos estabelecidos, assegurando assim a confiabilidade dos resultados quando reproduzidos. A metodologia utilizada na adequabilidade foi a preconizada pela Farmacopeia Britânica, foram testados os teores de Insumos Farmacêuticos Ativos - IFAs e Produto Acabado. A partir desta análise foram testados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão. Todos os parâmetros foram analisados com êxito, sendo o método em questão adequado para dosear Aciclovir em Aciclovir - creme dermatológico de 50 mg g⁻¹ produzidos com matéria prima de três diferentes fabricantes. A adequabilidade do método foi comprovada, pois o mesmo se mostrou seletivo, separando de forma adequada todos os picos secundários formados nos estresses aplicados. O pico de Aciclovir apresentou homogeneidade espectral nas condições aplicadas e a metodologia apresentou-se linear e exata entre a faixa de 80 µg/mL a 120 µg/mL (80 a 120% em relação a concentração de trabalho de Aciclovir) e precisa na faixa de trabalho de 100 µg/mL.

Palavras chaves: Adequabilidade de método, doseamento, Aciclovir, seletividade, precisão, exatidão, linearidade.

PAZINI, Claudia Regina. Suitability of analytical methods for identification and acyclovir dosing Dermatological Cream 50 mg g⁻¹. 72p. 2019. Federal Technological University of Paraná.

ABSTRACT

The propose of this paper was to specify the guidelines for the suitability of the analytical methodology of acyclovir cream, for the dosage analyses, ensuring through the experimental studies, that the method meets the established analytical parameters, thus securing the reliability of the results when reproduced. The methodology used in the suitability was advocated by the British Pharmacopoeia. The contents of Active Pharmaceuticals and Finished Product were tested. From this analysis were tested the parameters of selectivity, linearity, precision and accuracy. All the parameters were successfully analyzed and the method in question was suitable for dosing acyclovir in acyclovir dermatological cream 50 mg g⁻¹ produced from the raw materials of the manufactures. The suitability of the method was proven, because it showed selective, separating adequately all secondary peaks formed in the applied stress. The acyclovir peak showed spectral homogeneity in the applied conditions and the methodology was linear and accurate between the range of 80 to 120 ug/ml (80 to 120% in relation to the working concentration of acyclovir) and accurate in the range of 100 ug/ml.

Key words: Suitability method, dosing, acyclovir, selectivity, precision, accuracy, linearity.

1. INTRODUÇÃO

Para que a indústria farmacêutica se mantenha competitiva e ofereça produtos seguros, eficazes e com garantia de qualidade ao consumidor final é imprescindível que uma série de setores trabalhe em sinergia, seguindo o que preconiza as legislações pertinentes como a RDC nº 17/2010 e a RDC nº 166/2017.

Adequabilidade de métodos compendiais trata-se de uma verificação por meio de comprovação, de que um método farmacopeico seja reproduzido nas condições operacionais do laboratório. No parágrafo único do artigo 209 da RDC nº 17/2010, métodos analíticos compendiais não necessitam de validação, no entanto é necessário um estudo com evidências documentadas antes de sua efetiva implementação.

Os testes de adequabilidade seguiram o que exige a RDC nº 166/2017. Foi verificado por meio da comprovação, que o método é capaz de separar, identificar e quantificar o ativo (Aciclovir) na presença de suas potenciais impurezas e produtos de degradação (seletividade) e que o método é preciso e exato na faixa de quantificação (precisão e exatidão).

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo de adequabilidade para a análise de Teor do método de Aciclovir Creme 50 mg g⁻¹, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) seguindo a Farmacopeia Britânica e especificar as diretrizes para a adequabilidade da metodologia analítica em questão, garantindo através de estudos experimentais a confiabilidade dos resultados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a adequabilidade do método de Teor para Aciclovir 50 mg g⁻¹ Creme Dermatológico, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), aplicando o método analítico descrito na Farmacopeia Britânica 2018.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprovar que o método é capaz de separar, identificar e quantificar o ativo Aciclovir, na presença de suas potenciais impurezas e produtos de degradação (seletividade);
- Comprovar que o método é preciso e exato na sua faixa de quantificação;
- Comprovar que o método é robusto a pequenas variações que podem ocorrer na rotina laboratorial.

2.3 JUSTIFICATIVA

Atualmente a análise de teor do medicamento acima descrito é feita por UV-VIS. Em comparação com métodos por CLAE, análises por UV-VIS são menos sensíveis e precisas, sendo necessária uma melhoria a adequabilidade deste método para a Farmacopeia Britânica.

3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

3.1 ACICLOVIR

O princípio ativo do fármaco aciclovir atua como um agente antiviral muito ativo contra o vírus da Herpes simplex (HSV), tipos I e II, e o vírus da *Varicela Zoster*, ele atua bloqueando os mecanismos de replicação do vírus, conforme Figura 1. O trifosfato de Aciclovir age como inibidor e substrato para a DNA-polimerase específica do herpes, impedindo a síntese do DNA viral, sem afetar os processos celulares normais (Brasil, 2015; Santos & Carneiro, 2016).

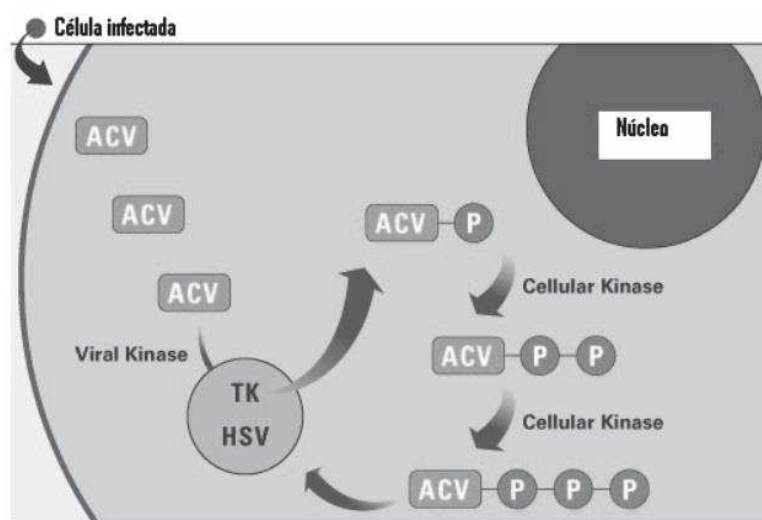


Figura 1 - Representação do mecanismo de ação do Aciclovir. Fonte: STULZER, 2008.

O Aciclovir possui fórmula molecular $C_8H_{11}N_5O_3$, com massa molar de $225,208 \text{ g mol}^{-1}$ e denominado pela União Internacional de Química Pura (IUPAC) como: (2-amino 1,9 -dihidro-9-[(2- hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona). A estrutura química do Aciclovir está representada na Figura 2.

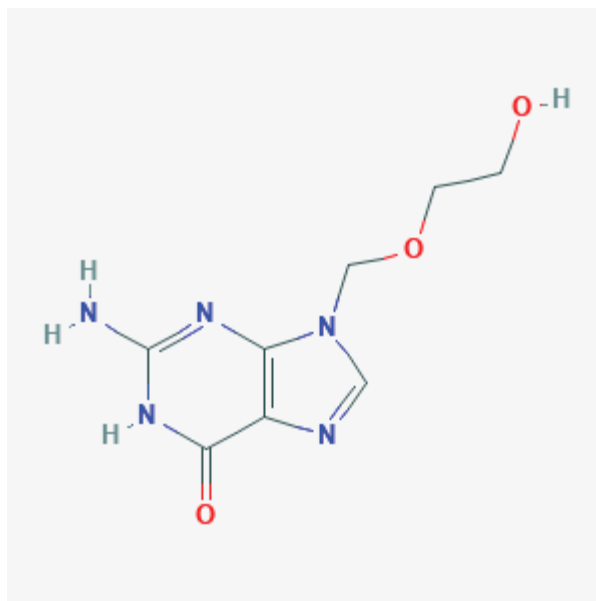


Figura 2 - Estrutura Aciclovir. Fonte: PubChem, 2010.

O fármaco apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, muito pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e ligeiramente solúvel em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ (UNITED STATES PHARMACOPEIA 42 - NSF 37, 2019.)

3.1.1 Grupos funcionais suscetíveis a degradação

A molécula de aciclovir possui grupos funcionais: éter, álcool, amina, anel pirimidínico e anel imidazólico. Esses grupos são passíveis de sofrer degradação por variados mecanismos, incluindo oxidação, hidrólise, substituição, eliminação, adição (Joule e Mills, 2010).

Apresenta dois grupos ionizáveis, devido a ser um fármaco de natureza hidrofílica e anfótera (ácido e base), conforme observado na Figura 3. A porção ácida de pKa 2,3, refere-se a desprotonação do anel imidazólico, já a porção básica, de pKa 9,3, remete ao oxigênio ligado ao anel pirimidínico (BALON, *et al.*, 1999).

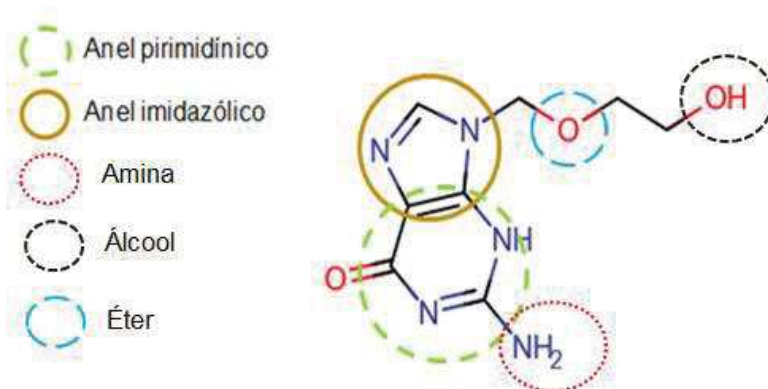


Figura 3 - Grupos funcionais de Aciclovir.

Purina – Purinas são compostos formados por um anel pirimidínico fundido a um anel imidazólico. Apresentam-se como bases fracas. Estudos de ^{13}C Ressonância Magnética Nuclear - RMN demonstram que todas as três formas protonadas estão presentes em solução (Figura 4) (Joule e Mills, 2010).

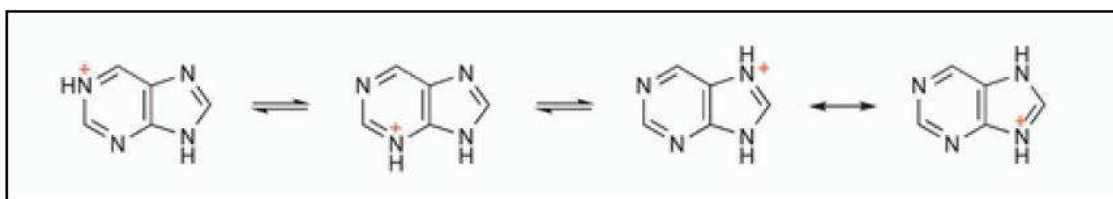


Figura 4 – Formas protonadas da purina. Fonte: Joule e Mills, 2010

A presença do grupo contendo oxigênio reduz a basicidade da purina, em contrapartida o grupo amino aumenta a basicidade (Figura 5) (Joule e Mills, 2010).

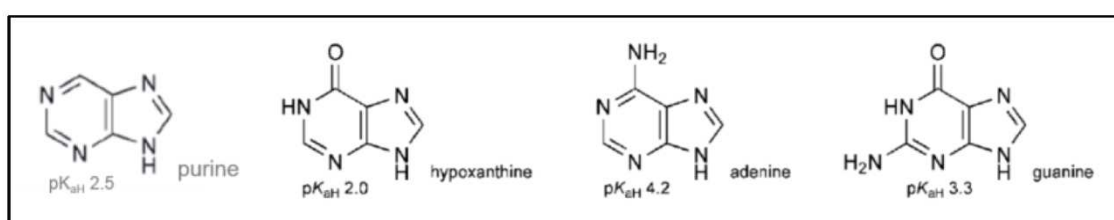


Figura 5 – Basicidade de purinas substituídas. Fonte: Adaptado de Joule e Mills, 2010.

Segundo Joule e Mills (2010), as purinas podem reagir com agentes nucleofílicos através de adição ao nitrogênio (protonação, alquilação, acilação, oxidação) e substituição no carbono (halogenação, nitração e acoplamento com sal diazônio). Além disso, são passíveis de reagir com radicais, agentes oxidantes, redutores e nucleofílicos

Aminas - A característica do grupo que constitui base para a maioria das reações envolvendo aminas é a capacidade do nitrogênio de doar um par de elétrons. Esse fato pode ocorrer com a amina agindo como nucleófilo doando seu par de elétrons ao reagente eletrofílico ou com os elétrons não compartilhados participando da ressonância tornando o átomo de carbono nucleofílico (Solomons e Fryhle, 2012).

Aminas também são passíveis de sofrer oxidação. Arilaminas são facilmente oxidadas por uma variedade de reagentes, incluindo o oxigênio no ar. A oxidação não é restrita ao grupo amina, mas também ocorre no anel (o grupo amina através de sua capacidade de doar elétrons torna o anel rico em elétrons e conseqüentemente especialmente susceptível a oxidação). A oxidação de arilaminas resulta em aril-hidroxilaminas, as quais são susceptíveis a oxidação posterior a compostos nitrosos aromáticos (Peruzzo e Canto, 2006).

Álcool – O átomo oxigênio polariza ambas as reações C-O e O-H de um álcool. A polarização da ligação O-H torna o hidrogênio parcialmente positivo e explica porque os álcoois são ácido fracos. O par de elétrons não ligantes no átomo de oxigênio, o torna básico assim como nucleofílico. Na presença de ácidos fortes, os álcoois agem como base e aceitam prótons, essa protonação torna um grupo abandonador fraco (-OH) em um grupo abandonador forte (H₂O), tornando as moléculas mais susceptível às reações de substituição e eliminação (Solomons e Fryhle, 2012; BRUICE, 2014) (Figura 6).

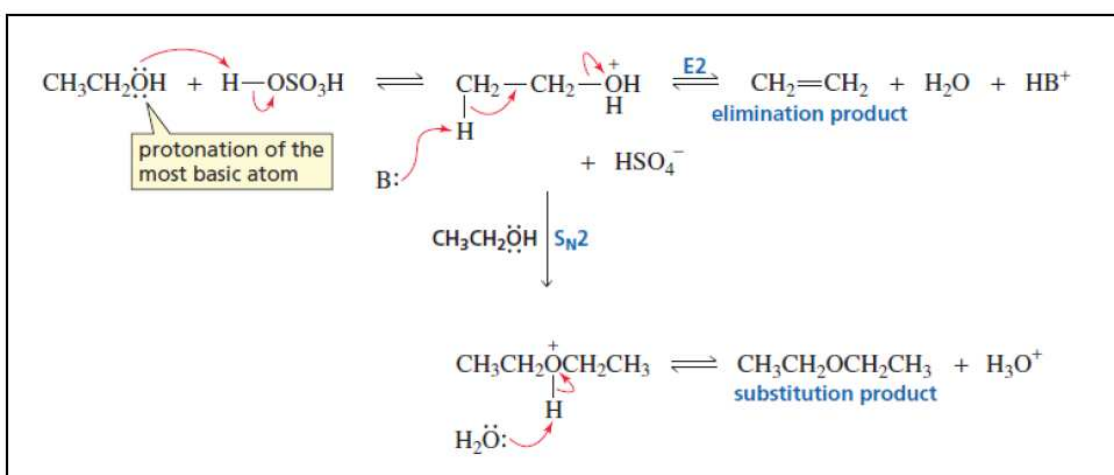


Figura 6 – Reação de adição e substituição em álcoois. Fonte: BRUICE, 2014.

Éter – Éteres conseguem resistir à ataques por bases e nucleófilos, desse modo reagem com poucas substâncias além dos ácidos (Solomons e Fryhle, 2012). O grupo RO de um éter e o grupo OH de um álcool possuem aproximadamente a mesma basicidade. Ambos os grupos são bases fortes, ou seja, grupos abandonadores fracos. Consequentemente, éteres da mesma forma que os álcoois necessitam ser ativados (ex.: protonação) antes de sofrerem uma reação nucleofílica (BRUICE, 2014). Em meio aquoso, sua quebra leva a formação dos respectivos álcoois.

Frente a todas as possíveis reações apresentadas que ocasionam a degradação da molécula de Aciclovir, embasa-se a importância de um estudo de seletividade para que seja detectado possíveis degradações e quão impactantes no momento da quantificação do teor de um ativo seja ele como insumo ou como produto acabado elas podem ser.

3.2 VALIDAÇÃO/ADEQUABILIDADE DE MÉTODOS

A validação de novos métodos analíticos é de suma importância, cientificamente, pois garante a confiabilidade dos resultados interlaboratoriais ao reproduzir determinado método e, por questões de cunho comercial, métodos validados são imprescindíveis para que seja possível o registro de novos produtos (BACCHI, 2013).

Processos de validação devem garantir experimentalmente que o método atenda exigências por meio de avaliação de uma série de exigências, devendo apresentar limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, linearidade, precisão e exatidão a análise. Todos estes parâmetros estão preconizados na RDC nº 166/2017.

A RDC 166/2017 traz em seu capítulo 2, artigo 7, que métodos compendiais devem ter sua adequabilidade comprovada por meio de validação parcial, também chamada de adequabilidade de métodos, esta adequabilidade tem por objetivo comprovar que o método reproduza nas condições reais dos laboratórios da empresa.

A adequabilidade tem a exigência de avaliar parâmetros experimentais mínimos de precisão, exatidão e seletividade (BRASIL, 2017).

3.2.1 Parâmetros experimentais de validação/adequabilidade

3.2.1.1 Seletividade

Quando um método instrumental de separação tem a capacidade de produzir uma resposta para uma única substância de interesse, pode-se dizer que este método atende parâmetros de seletividade. Este parâmetro nada mais é que a capacidade do método em medir, determinado composto (ativo), na presença de outros componentes (matriz, produtos de degradação, subprodutos de síntese e se ele sofrerá com interferência quando na presença destes componentes (BACCHI, 2013; BRASIL, 2017).

Para que um método seja seletivo, analiticamente são testadas soluções contendo o ativo e soluções contendo apenas o placebo sob as mesmas condições. As soluções são submetidas também ao stress forçado, ou seja, condições que a degradem, para que então se comprove se determinadas situações poderão influenciar ou não na quantificação do analito de interesse. Desta forma, o analito deverá ser exposto a condições de degradação em ampla faixa de pH, de oxidação, calor e de luz (BRASIL, 2017).

Quando a análise for feita por métodos cromatográficos, para o parâmetro de seletividade deve-se ainda comprovar a pureza de pico do sinal do analito. A pureza de pico é um parâmetro que tem por objetivo mostrar que não há eluição de nenhum outro composto na região de interesse, onde elui o analito principal a ser quantificado (BRASIL, 2017).

3.2.1.2 Linearidade

Para a RDC 166/2017 a linearidade de um método analítico será comprovada pela capacidade de obtenção de respostas analíticas diretamente proporcionais a concentração de um analito em uma amostra.

O ensaio de linearidade deve ser feito utilizando no mínimo cinco concentrações diferentes com solução obtida a partir da Substância Química de Referência e estas soluções deverão ser preparadas no mínimo em triplicata (BRASIL, 2017).

A avaliação deste parâmetro se dará por uma série de dados exigidos pela legislação, como: a representação gráfica das respostas obtidas em função da concentração do analito, ainda gráficos de dispersão de resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística, bem como a equação da reta de regressão de y em x, utilizando o método dos mínimos quadrados e avaliação dos coeficientes de correlação (r) e determinação linear (r^2) (BRASIL, 2017).

3.2.1.3 Precisão

A proximidade entre resultados obtidos a partir de ensaios com preparo amostras que seguem determinada metodologia é representada pelo parâmetro de precisão, ela será expressa pela repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade.

A repetibilidade deverá seguir os critérios dispostos na RDC 166/2017 em seu artigo 38, onde serão avaliadas amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Serão no mínimo nove determinações, que contemplem o intervalo linear do método, com três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas.

A precisão intermediária é determinada pelo artigo 40 da Resolução 166/2017, onde são descritos os critérios a serem seguidos, neste caso os resultados serão obtidos a partir de análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório e em dois dias diferentes, análise essa realizada por operadores diferentes. As concentrações e o número de determinações devem seguir o parâmetro de repetibilidade.

O artigo 41 da mesma resolução preconiza que o parâmetro de reprodutibilidade deve ser obtido por meio de proximidade de resultados em análises quando as mesmas são realizadas em laboratórios distintos.

3.2.1.4 Exatidão

Para que um método seja exato, ou atenda os parâmetros de exatidão ele precisa apresentar concordância entre os resultados obtidos relacionados a determinado método em relação a um valor que é aceito como verdadeiro.

Em seu artigo 43 a RDC 166/17 traz que exatidão deverá ser verificada a partir de no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), ambas em triplicata.

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é essencial para a indústria farmacêutica para a obtenção de resultados analíticos num laboratório, em virtude da sua capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos presentes numa mistura (CHUST, 1990).

A cromatografia é um método físico-químico que tem por finalidade a separação e/ou purificação de um analito, no qual os constituintes deste analito são "divididos" em duas fases, uma denominada estacionária e a outra fase móvel, a fase estacionária dispõe de grande área superficial e é por onde a fase móvel percola, uma das características cruciais é que a fase móvel seja insolúvel a fase estacionária (CHUST, 1990; Collins *et al.*, 2006).

Os seus principais componentes são um sistema de bombas, um sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o detector e um sistema que permite registrar e fazer o tratamento da resposta analítica do

detector – software e computador, conforme a ilustração na Figura 7 (SILVA, 2016).

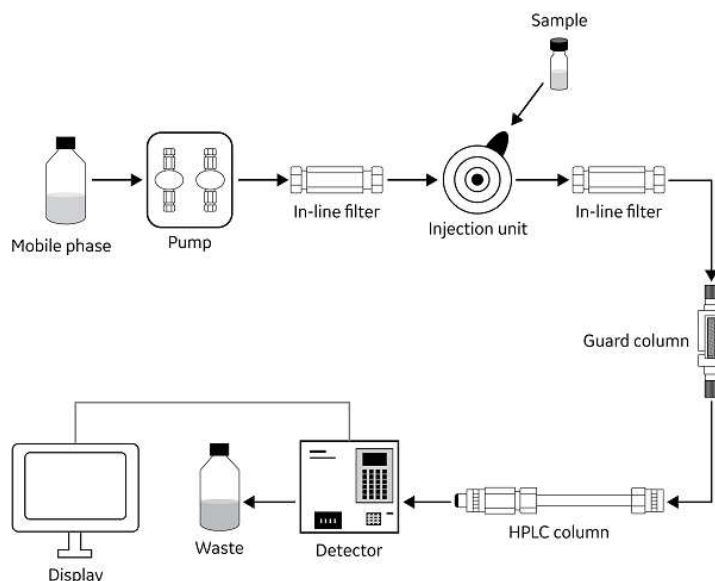


Figura 7 - Componentes básicos de CLAE. Fonte: GE Healthcare, 2019.

A fase móvel é bombeada a um determinado fluxo pelo sistema cromatográfico, podendo o fluxo ser isocrático quando se trata de uma proporção constante vinda de apenas um dos canais, ou por gradiente, quando a fase móvel entra no sistema em proporções variáveis, por diferentes canais. Este fluxo flui pelo sistema constantemente, arrastando a amostra injetada através da coluna cromatográfica (Collins *et al.*, 2006; SILVA, 2016).

É na coluna cromatográfica que ocorre a separação do analito, por meio de interações entre fase móvel e estacionária, esta separação acontecerá em virtude das particularidades da molécula em questão, que implicará em diferentes afinidades e velocidades de migração. Quando tal interação for maior com a fase estacionária, o composto eluirá por último, conseqüentemente o primeiro composto a eluir é o de menor afinidade com a fase estacionária (Degani *et al.*, 2008).

Estas interações responsáveis pela separação dos compostos são classificadas de acordo com a natureza do "recheio" de cada coluna cromatográfica, sendo assim as separações podem ocorrer por partição, adsorção, exclusão ou troca iônica (Collins *et al.*, 2006).

Esta separação ainda pode ocorrer por fase normal ou reversa, dependendo diretamente da polaridade das fases de separação do sistema. Separação por fase normal é caracterizada por fase estacionária polar (coluna com recheio em sílica) e fase móvel apolar, nestes casos analitos polares demorarão mais para eluir devido a sua interação com a fase estacionária. Já para a fase reversa e comumente utilizada tem-se a fase estacionária (colunas recheadas com sílicas quimicamente modificadas) apolar e a fase móvel polar (Collins *et al.*, 2006) .

Ao eluir pela coluna o analito, já separado, segue para o detector que é escolhido também em virtude da sua sensibilidade em relação ao analito de interesse, seletividade, linearidade (correspondente a aumento da concentração do analito), pouco sensível às variações de temperatura e fluxo, preciso e com reprodutibilidade (CHUST, 1990; Collins *et al.*, 2006).

Detectores UV-VISível são os mais usuais em técnicas cromatográficas como HPLC, por serem detectores com baixo custo, aceitarem uso de gradiente e geralmente serem robustos a variações de fluxo e temperatura (Collins *et al.*, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras

Para as análises de Teor e adequabilidade do método foram utilizados os lotes de matéria prima, produto acabado e placebo descritos na Tabela 1, no decorrer do texto os mesmos serão nomeados como o lote.

Tabela 1 - Amostras utilizadas nos testes de Adequabilidade

Amostra	Lote	Validade
Aciclovir pó - Matéria Prima	MP 1	17/10/2019
Aciclovir pó - Matéria Prima	MP 2	08/2019
Aciclovir pó - Matéria Prima	MP 3	26/03/2021
Aciclovir 50 mg g ⁻¹ creme	PA 1	10/2020
Aciclovir mg g ⁻¹ creme	PA 2	10/2020
Aciclovir 50 mg g ⁻¹ creme	PA 3	08/2020
Placebo Creme	PLACEBO	17/10/2020

A Tabela 2 apresenta os materiais e equipamentos utilizados na adequabilidade.

Tabela 2 – Materiais e equipamentos utilizados na adequabilidade.

Material	Especificação (Lote, nº série, identificação)	Validade
HPLC Shimatzu	CL071	09/2019
Coluna Supelcosil LC-18-DB C18 250mmx4,6mmx5µmm	167454-02	N/A
Estufa	ET019	12/2019
Câmara de Fotoestabilidade	CF002	11/2019
pH-metro	UI024	05/2019
Ultrassom	TI39	02/2019
Balança Analítica	WI267	01/2019
Balança Analítica	WI255	06/2019
Pipetador Automático	YN062	01/2019

4.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SRQ)

Foram utilizados como padrões, Substâncias Químicas de Referência certificadas pelas Farmacopeias Brasileira e Britânica, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Padrões utilizados para a adequabilidade do método

Insumo	Lote	Fornecedor	Pureza
Aciclovir	1021	Farmacopeia Brasileira	Vigente
Aciclovir para Identificação de Picos 1	5.1	Farmacopeia Europeia	Vigente

4.2 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO

4.2.1 Técnica

Utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por fase-reversa com detecção por absorção molecular na região do ultravioleta/visível (HPLC - UV-VIS).

4.2.2 Preparo das soluções

Os preparos utilizados no estudo serão abordados na Tabela 4. No decorrer da metodologia alguns preparos serão reportados da seguinte maneira "conforme metodologia analítica". Sempre que esse termo for utilizado se refere ao fato de utilizar a metodologia abordada na tabela abaixo, conforme o que preconiza a Farmacopeia Britânica, visto que alguns preparos mudarão conforme o objetivo de estudo de cada parâmetro como, por exemplo, seletividade.

Tabela 4 - Preparo das Soluções utilizadas para a análise de Doseamento de Aciclovir.

Soluções		Metodologia de Preparo
Soluções Tampão Fase Móvel	Tampão Fosfato pH 3,1 Tampão Fosfato pH 2,5	Farmacopeia Britânica (2018)
Diluyente	Fase Móvel A e B	
Teste Padrão	Teste 1 e 2 [Aciclovir] = 100 µg/mL. Padrão 1 e 2 [Aciclovir] = 100 µg/mL.	Farmacopeia Britânica (2018)
System Suitability	System Suitability - Identificação de Picos	
Placebo Solução Branco	Solução Placebo [Aciclovir]eq = 100 µg/mL Dimetilsufóxido	

4.2.2.3 Sistema Cromatográfico

Foi utilizado o cromatógrafo líquido, Shimadzu, Série 20. Os parâmetros cromatográficos foram: a coluna foi a Supelcosil LC-18-DB C18 (50mm x 4,6 mm x 5 µm), temperatura do forno foi ambiente, injetando-se volume de 10 µL de amostra a fluxo de 1,0 mL/minuto. O detector foi o UV/VIS a 254 nm. O tempo de corrida foi de 46 minutos e a fase Móvel foi realizada conforme gradiente mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Gradiente Fase Móvel.

Tempo (min)	Fase Móvel A (% v/v)	Fase Móvel B (% v/v)	Gradiente
0 - 5	100	0	Isocrático
5 - 27	100 – 80	0 - 20	Gradiente Linear
27 - 40	80	20	Isocrático
40 - 46	80 - 100	20 - 0	Gradiente Linear

4.2.2.4 Procedimento Experimental

4.2.2.4.1 Avaliação da adequabilidade do sistema (*system suitability*)

Após estabilização do sistema cromatográfico proceder conforme descrito a seguir:

- Injetou-se uma vez a Solução *System Suitability*.

A resolução entre os picos da Impureza C e de Aciclovir é de pelo menos 1,5.

- Injetou-se cinco vezes a Solução Padrão 1.

O desvio Padrão Relativo (DPR_{inj}) das áreas do pico de Aciclovir, na Solução Padrão 1, não deve ser superior a 1,5 %.

4.2.2.4.2 Quantificação

- Injetou-se uma vez a Solução 2 (Solução Padrão 2).
- Injetou-se uma vez as Soluções Teste 1 e 2.

Calculou-se os teores de Aciclovir, em porcentagem (T%), de cada Solução Teste. Calculou-se a média destas Soluções Teste, a média será reportada como resultado final.

4.2.2.4.3 Avaliação das Soluções Controle

- Injetou-se uma vez solução *system suitability*;
- Injetou-se uma vez cada uma das Soluções Padrão 1 e 2.

4.2.2.4.4 Cálculos

A seguir serão descritas as fórmulas e como calculou-se cada parâmetro necessário para verificar *system suitability*, curva de quantificação, teor e controles citados anteriormente.

4.2.2.4.4.1 Desvio Padrão

Calculou-se o Desvio Padrão (S_{inj}) das múltiplas injeções da Solução Padrão 1, conforme a Equação 1.

$$S_{inj} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A})^2}{n-1}} \quad (1)$$

Onde A_i são as áreas individuais do pico de Aciclovir obtidas de cada injeção da Solução Padrão 1, \bar{A} é a média das áreas das múltiplas injeções da Solução Padrão 1, e n é o número de replicatas.

4.2.2.4.4.2 Desvio Padrão Relativo (DPR)

Calculou-se o Desvio Padrão Relativo (DPR_{inj}), conforme a Equação 2 descrita abaixo:

$$DPR_{inj} = \frac{S_{inj}}{\bar{A}} \times 100\% \quad (2)$$

Na qual S_{inj} é o desvio padrão obtido na Equação 1 e \bar{A} é a média das áreas nas múltiplas injeções da Solução Padrão 1.

4.2.2.5 Especificação

Para que o resultado seja satisfatório, o teor não deve ser inferior a 95,0% e superior a 105,0%, da quantidade declarada de Aciclovir, ou seja, 47,50 a 52,20 mg/g.

4.3 Seletividade

O parâmetro de seletividade foi avaliado por meio da comprovação de que o pico quantificado no cromatograma da solução teste de fato se refere ao analito de interesse (Aciclovir), através dos tempos de retenção deste pico com seu respectivo pico obtido em soluções padrão preparado com a Substância Química de Referência (SQR).

Também foi testado que nenhum pico de produto de degradação e/ou excipiente coelui com o pico de Aciclovir na solução teste através da análise de amostras de produto acabado, matéria-prima e placebo submetidas a

degradação forçada nos meios: ácido, básico, oxidativo, íons metálicos, térmico e fotolítico com posterior verificação da pureza espectral do pico de Aciclovir nestas soluções.

Amostras submetidas ao estresse forçado foram analisadas até que ocorra decaimento entre 10 e 30% do teor do princípio ativo (Aciclovir). Caso não se observe degradação acima de 10% após 10 dias de degradação forçada (ou após exposição de dois ciclos de fotoestabilidade no caso de estresse fotolítico), deverá ser apresentada justificativa técnica comprovando a estabilidade da substância na condição testada.

Tabela 6 - Condições e tempo de degradação forçada

Amostra	Solução Degradante	Condição de Exposição	Tempo de exposição
Controle	-	-	-
Estresse Ácido	HCl 5mol L ⁻¹	HCl 1 mol L ⁻¹	3 dias
Estresse Básico	NaOH 5 mol L ⁻¹	NaOH 1 mol L ⁻¹	10 dias
Estresse Oxidativo	H ₂ O ₂ 10%	H ₂ O ₂ 3,0%	10 dias
Estresse Íon Metálico	FeCl ₃ 100mM	FeCl ₃ 1mM	24 horas
Estresse Fotolítico	-	1,2 milhões lux.h	2 ciclos,
Estresse Térmico	-	60 °C	10 dias

4.3.1 Preparo das soluções padrão

Solução Padrão 1 e 2 seguem conforme Tabela 4.

4.3.2 Preparo das soluções estoque seletividade

Na tabela 7 estão apresentados os preparos das soluções estoque teste e controle que servirão como soluções mãe para todos os preparos para os testes de seletividade.

Tabela 7 - Preparo das soluções estoque teste e controle

Soluções	Preparo
Teste Estoque	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3)
	Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3)
	Placebo
[Aciclovir] = 1000 ug/mL	
Controle	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3)
	Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3)
	Placebo
Farmacopeia Britânica (2018)	

4.3.3 Preparo das soluções de estresse forçado - Estresse Químico

Na tabela subsequente serão descritos os preparos que foram utilizados para os testes de seletividade de estresse químico (Tabela 8).

Tabela 8 - Preparo das soluções seletividade para submetidas a Estresse Químico

Exposição Química a condições estressantes					
Tipo de estresse	Preparo de soluções				
Estresse Ácido (HCl 1M)	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3) Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3) Placebo	10 mL solução estoque + 10 mL HCl 5 mol L ⁻¹	Q.S.P 50 mL água purificada	5 mL da Solução para BV 10 mL	Neutralização de pH para 7,0 com NaOH 5 mol L ⁻¹
	Branco	10 mL de DMSO + 10 mL HCl 5 mol L ⁻¹			
Estresse Alcalino (NaOH 1 mol L ⁻¹)	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3) Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3) Placebo	10 mL solução estoque + 10 mL NaOH 1 mol L ⁻¹	Q.S.P 50 mL água purificada	5 mL da Solução para BV 10 mL	Neutralização de pH para 7,0 com HCl 5 mol L ⁻¹
	Branco	10 mL de DMSO + 10 mL NaOH 1 mol L ⁻¹			
Estresse Oxidativo (H ₂ O ₂ 3%)	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3) Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3) Placebo	10 mL solução estoque + 15 mL H ₂ O ₂ 10%	Q.S.P 50 mL água purificada	5 mL da Solução para BV 10 mL	Q.S.P. 10 mL com diluyente
	Branco	10 mL de DMSO + 15 mL H ₂ O ₂ 10%			
Estresse por íon metálico (FeCl ₃)	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3) Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3) Placebo	10 mL solução estoque + 0,5 mL FeCl ₃ 100 mM	Q.S.P 50 mL água purificada	5 mL da Solução para BV 10 mL	Q.S.P. 10 mL com diluyente
	Branco	10 mL de DMSO + 0,5 mL FeCl ₃ 100 mM			

4.3.3.5 Estresse Fotolítico e Térmico

Na tabela 9 e 10 estão descritos o pré tratamento necessário para as amostras utilizadas nas análises de seletividade submetidas a estresse físico, bem como o preparo das soluções amostras feitas a partir das amostras pré tratadas, diferente dos estresses anteriores.

Tabela 9 - Condições de exposição estressantes para pré tratamento das amostras para testes de seletividade submetidas a estresse físico.

Exposição Física a condições estressantes - Pré tratamento das amostras				
Tipo de estresse		Quantidade de amostra exposta	Tempo de exposição	Condições de exposição
Estresse Fotolítico	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3)	200 mg	41 horas	tempo do ciclo de calibração actinométrica com uma intensidade de 1,2 milhões lux/hora
	Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3)	2 g		
	Placebo			
Estresse Térmico	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3)	10 mg	10 dias	Estufa à 60 °C
	Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3)	200 mg		
	Placebo			

Tabela 10 - Preparo das soluções seletividade submetidas a Estresse Físico após prétratamento

Preparo das amostras após pré tratamento					
Soluções	Preparo				
Estresse Térmico	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3) Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3) Placebo	25 mg (BV 25mL) + 10 mL DMSO	Q.S.P 25 ml com solução diluente	1 mL da Solução para BV 10 mL	Q.S.P. 10 mL
	Branco	10 mL de DMSO			
Estresse Fotolítico	Matéria Prima (MP1, MP2 e MP3) Produto Acabado (PA1, PA2 e PA3) Placebo	4 mL de DMSO direto no tubo utilizado para o pré tratamento	6 mL de solução diluente	1 mL da Solução para BV 10 mL	Q.S.P. 10 mL
	Branco	4 mL de DMSO			

4.3.4 Procedimento experimental

Avaliou-se a adequabilidade do sistema conforme metodologia analítica. Foram injetadas todas as soluções teste IFA, Soluções teste produto, Soluções teste placebo e Soluções branco, conforme o método analítico e avaliou-se:

- O surgimento de picos de degradação em todas as soluções teste;
- A resolução entre os picos de degradação e o Aciclovir em todas as soluções teste;
- A pureza espectral do pico do Aciclovir em todas as soluções teste;
- O teor de Aciclovir frente as Soluções Padrão e decaimento da área frente à Solução teste - controle.

Avaliou-se as soluções controle de acordo com a metodologia analítica.

4.3.4.1 Critérios de Aceitação

Todos os parâmetros da avaliação da adequabilidade do sistema devem ser atendidos. No cromatograma da solução branco não deverá haver nenhum pico no mesmo tempo de retenção do pico do Aciclovir, observado no cromatograma da solução padrão.

No cromatograma das soluções teste não deve ser observado nenhum pico de impureza com resolução inferior a 1,5 em relação ao pico de Aciclovir.

O pico de Aciclovir deverá se manter espectralmente puro em todos os cromatogramas das Soluções padrão e Soluções teste. Deve-se avaliar o "Purity Plot". A curva do Purity Angle não deve cruzar a curva do Purity Threshold no Purity Plot.

Todos os parâmetros da avaliação das soluções controle devem ser atendidos.

4.4 LINEARIDADE

A linearidade foi verificada através da análise de uma curva analítica com cinco níveis e com três réplicas em cada nível compreendendo o intervalo de 80 a 120% da concentração nominal limite da solução teste (100ug/mL)

abrangendo, desta forma, o intervalo de concentração de 80 a 120 ug/mL de Aciclovir.

4.4.1 Preparo das soluções

As soluções padrão estoque foram preparadas em triplicata, das quais as Soluções linearidade deverão ser preparadas, totalizando assim 15 soluções linearidade (três preparos das cinco diferentes Soluções linearidade). A solução *system suitability* e Soluções Padrão 1 e 2 foram feitas conforme o método analítico descrito no Item 4.2.2.

4.4.1.1 Soluções Padrão Estoque

Pesou-se 50,0 mg do padrão de Aciclovir para balão volumétrico de 20 mL, adicionou-se 10 mL de dimetilsulfóxido, homogeneizou-se e completou-se o volume com dimetilsulfóxido, homogeneizou-se e completou-se o volume com dimetilsulfóxido. [Aciclovir] = 2500 ug/mL

4.4.1.2 Soluções Linearidade

As diluições a partir das três soluções estoque linearidade foram realizadas conforme a Tabela 11, para balão de 10 mL e completando o volume com dimetilsulfóxido. Em seguida foram homogeneizadas e filtradas em membrana de Nylon de 0,2 um.

Tabela 11- Diluições da linearidade

Solução Linearidade	Volume de solução padrão estoque (mL)	Concentração (ug/mL)	Nível (%)
1	0,32	80	80
2	0,36	90	90
3	0,4	100	100
4	0,44	110	110
5	0,48	120	120

Foram utilizadas como soluções controles as Soluções Padrão 1 e 2, conforme método analítico.

4.4.2 Procedimento Experimental

Foi Injetada a Solução Padrão, Soluções linearidade e Solução controle conforme metodologia analítica.

- Avaliou-se a adequabilidade do system de acordo com a metodologia analítica;
- Plotou-sear um gráfico com as áreas dos picos de Aciclovir no eixo y e concentração de Aciclovir nas soluções no eixo x. Avaliou-se visualmente se os dados apresentam relação linear aparente;
- Realizou-se o teste da igualdade de variâncias (Teste de Cochran) com nível de significância de 5%;
- Avaliou-se a existência de valores aberrantes através do Teste de Grubbs;
- Realizou-se a regressão linear da curva analítica através do método por mínimos quadrados ordinários e avaliou-se: coeficiente angular da reta, coeficiente linear da reta e coeficiente de correlação (R).
- Realizou-se a análise de variância para a regressão linear (ANOVA) com nível de significância de 5%;
- Plotou-se um gráfico com resíduos padronizados;
- Avaliou-se as Soluções Controle de acordo com a metodologia analítica.

4.4.2.1 Critérios de aceitação

- Todos os critérios de aceitação da adequabilidade do sistema descritos na metodologia analítica devem ser atendidos;
- A análise visual deve demonstrar aparente linearidade entre as áreas do pico de Aciclovir e a concentração da solução;
- O teste de Cochran deve indicar homogeneidade entre as variâncias dos diversos níveis da linearidade (homocedasticidade);
- O teste de Grubbs não deve indicar nenhum valor aberrante;
- O coeficiente de correlação (R) deve ser maior que 0,990;
- A análise de varância (ANOVA) deve indicar que: o coeficiente angular da reta deve ser significativamente diferente de zero, o coeficiente linear da reta não deve ser significativamente diferente de zero;

- Todos os parâmetros da avaliação das Soluções Controle devem ser atendidos.

4.5 PRECISÃO

O parâmetro de Precisão foi verificado através da repetibilidade e da precisão intermediária.

Repetibilidade foi verificada através das seis determinações contemplando o nível de 100%, contemplando a concentração da solução amostra. Já a Precisão intermediária foi testada através de uma segunda repetibilidade realizada em um segundo dia, utilizando equipamentos diferente ou preparado por analistas diferentes.

4.5.1 Preparo das amostras

A solução teste foi preparada conforme descrito no método analítico, em sextuplicata. A Soluções Padrão (Padrão 1 e 2), *System Suitability* e Solução Controle também foram preparadas conforme método analítico.

4.5.2 Procedimento Experimental

Todas as soluções foram injetadas conforme metodologia analítica bem como a verificação de adequabilidade do sistema.

Avaliação da precisão (Repetibilidade): calculou-se o teor de Aciclovir nas seis soluções teste e calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) dos teores dos seis preparos.

Avaliação da precisão intermediária: calculou-se o teor de Aciclovir nas seis soluções teste, calculou-se o DPR dos teores dos seis preparos e calculou-se o DPR entre os doze preparos dos dois dias de análise.

4.5.3 Critérios de aceitação

Todos os parâmetros da avaliação de adequabilidade do sistema devem ser atendidos. Os DPR entre os seis preparos do mesmo nível para a

repetibilidade e precisão intermediária, devem estar de acordo com os valores apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Especificação para Repetibilidade e Precisão Intermediária

	Nível (%)	Analito na Matriz (%)	DPR (%)
Repetibilidade	100	5	2.7
Precisão intermediária	100	5	4.0

Fonte: AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures.

Todos os parâmetros de avaliação das soluções controle, devem ser atendidos.

4.6 EXATIDÃO

A exatidão da metodologia analítica foi verificada através de nove determinações contemplando os níveis baixo (80%), médio (100%) e alto (120%), compreendendo o intervalo do método analítico para o ensaio de doseamento.

4.6.1 Preparo das soluções

As soluções *System Suitability*, Solução Padrão 1 e 2, Solução Placebo e Branco seguiram método analítico.

4.6.1.1 Solução Padrão Estoque

A solução deverá ser preparada em triplicata. Pesou-se 50 mg do padrão de Aciclovir para um balão volumétrico de 20 mL, adicionou-se 10 mL de dimetilsulfóxido, homogeneizou-se e completou-se o volume com dimetilsulfóxido. [Acilovir] = 2500 ug/mL.

4.6.1.2 Solução Exatidão 80, 100 e 120%

Para o teste de exatidão todas as soluções (80, 100 e 120%) foram preparadas em triplicata.

Para os três níveis foi transferido a quantidade de placebo equivalente a 10 mg de Aciclovir (200 mg de placebo) para balão volumétrico de 10 mL. Transferiu-se 4 mL da Solução Padrão Estoque e adicionou-se 4 mL de dimetilsulfóxido e levou-se ao ultrassom, sem aquecimento, até completa solubilização. Completou-se o volume do balão com diluente e homogeneizou-se.

Para as soluções 80% transferiu-se 0,8 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com o mesmo diluente (80 ug/mL). Procedeu-se da mesma forma para as outras duas soluções, variando apenas o volume da solução padrão pipetada, sendo para a solução 100%, 1,0 mL (100 ug/mL) e para a solução de 120%, 1,2 mL (120 ug/mL). Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana de Nylon de 0,2 um. [Acilovir] = 80 ug/mL.

4.6.2 Procedimento Experimental

Foram injetadas todas as soluções conforme metodologia analítica, avaliação de adequação do sistema também deverá ser feito de acordo com a metodologia analítica.

Calculou-se o teor de Aciclovir nas nove soluções teste, calculou-se a recuperação (razão entre o teor obtido e o teor teórico) nas nove soluções teste. Calculou-se a média de recuperação de cada nível. Calculou-se o DPR obtido em cada nível e avaliou-se as soluções controle de acordo com a metodologia analítica.

4.6.3 Critérios de aceitação

Todos os critérios da avaliação da adequabilidade do sistema devem ser atendidos.

A média das recuperações de um mesmo nível e o DPR entre as triplicatas do mesmo nível deve de no máximo 2,7% e a recuperação devem ficar entre 97 e 103%.

Todos os parâmetros de avaliação das Soluções Controle devem ser atendidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELETIVIDADE

As amostras submetidas às condições de degradação forçada foram expostas conforme descrito na metodologia e estão resumidas na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições de estresse e tempo de exposição

Amostra	Condições de estresse	Tempo de Exposição
Controle	-	-
Estresse Ácido	HCl 1 mol L ⁻¹	02 dias
Estresse Alcalino	NaOH 1 mol L ⁻¹	10 dias
Estresse Oxidativo	H ₂ O ₂ 3%	10 dias
Estresse Íons Metálicos	FeCl ₃ 1 mmol L ⁻¹	24 horas
Estresse Fotolítico	1,2 milhões lux/h	Tempo suficiente para 2 ciclos
Estresse Térmico	60°C	10 dias

5.1.1. Análise de pureza de pico

A RDC 53/2015 da ANVISA - que dispõe dos parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências – preconiza que análises críticas do perfil de degradação do IFA devem contemplar a verificação da pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo no medicamento e também, a avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento.

Com base nisto, verifica-se a importância da realização da avaliação da homogeneidade espectral do pico principal e as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. Portanto, a utilização de testes de pureza de pico com auxílio de detector de arranjo de diodos é apresentada no estudo de degradação forçada (EDF) em questão para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente, tendo em vista que a seletividade do método foi validada para o pior cenário possível, que é o possível aparecimento de todos os produtos de degradação (o que não necessariamente ocorrerá na estabilidade).

Desta forma, a homogeneidade espectral foi comprovada seguindo as diretrizes do software Empower® 3, com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos, capazes de demonstrar a homogeneidade do pico do ativo principal, avaliando todas as soluções (padrões e amostras) através da análise da pureza do pico cromatográfica, a qual verifica se um pico é espectralmente puro comparando-se o valor de *purity angle* (ângulo de pureza) com o de *purity threshold* (limite de pureza). Quando se obtém valores de *purity angle* inferiores a valores de *purity threshold* e as curvas não cruzam no *purity plot* em toda a extensão do pico, o mesmo é considerado espectralmente puro.

A Figura 8 representa um típico cromatograma obtido com a Solução padrão de Aciclovir, no método analítico em questão, que juntamente com o espectro de absorção no UV do ativo (Figura 9), serão utilizados ao longo das análises para identificação do pico do ativo.

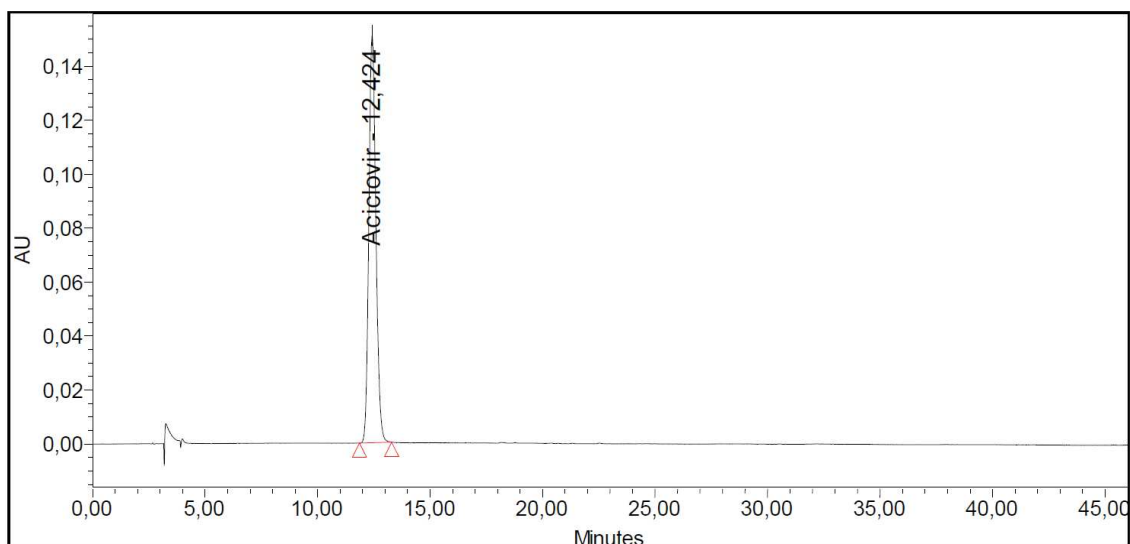


Figura 8 - Cromatograma da Solução Padrão de Aciclovir.

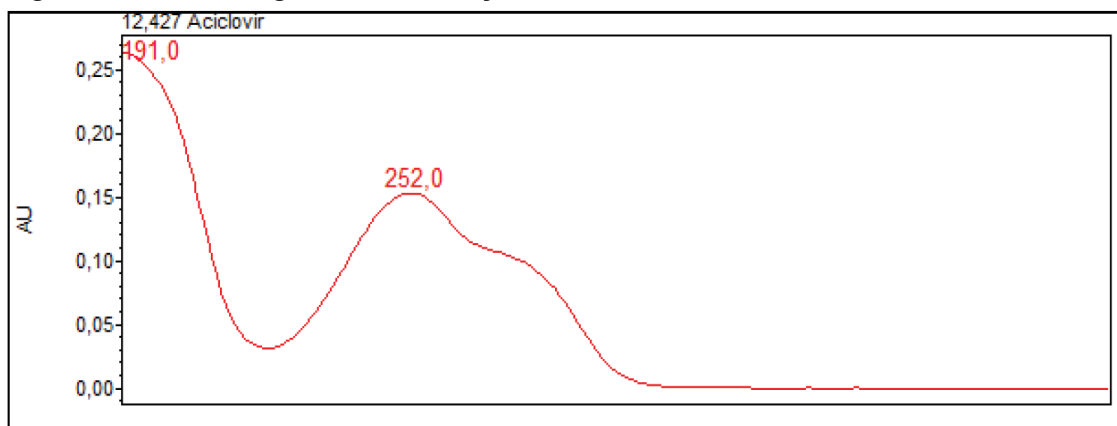


Figura 9 - Espectro de absorção na região UV-VIS para Aciclovir, na solução padrão.

Seguindo o recomendado no manual do Empower® 3, a pureza do pico foi calculada inicialmente empregando-se o parâmetro de “*Autothreshold*”, o qual computa automaticamente os ângulos de ruído e de solvente a partir do intervalo selecionado, é recomendável que a absorvância espectral máxima (MSA) seja inferior a 1 AU, fornecendo valores de pureza onde a linha do *purity angle* não ultrapassa a linha do *purity threshold* no *purity plot*.

Na Figura 10 é possível observar a pureza espectral do ativo através do gráfico do *purity plot*, para verificação da pureza de pico. Como podemos observar na Figura 11, a absorvância espectral máxima (MSA) não foi superior a 1 AU, apresentando-se dentro da faixa dinâmica do detector, utilizando o volume de injeção descrito no método, 10 µL.

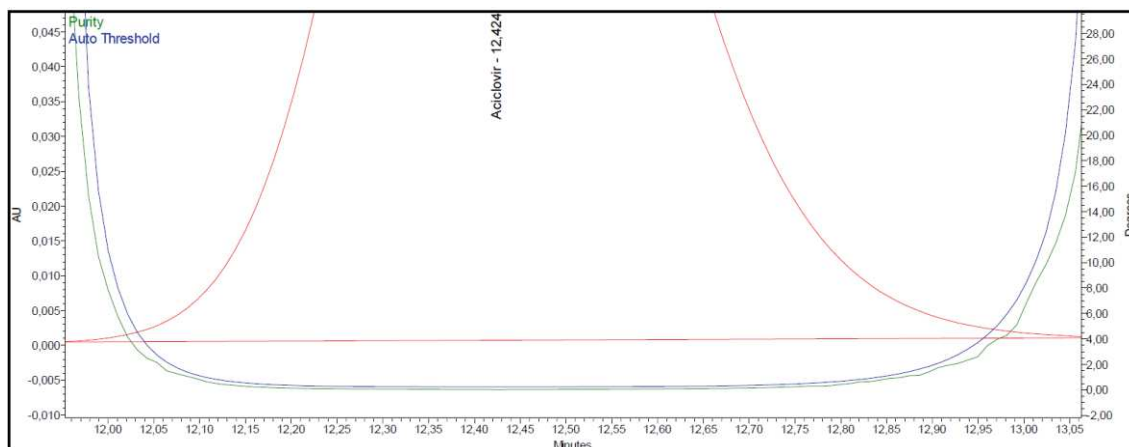


Figura 10 - Purity Plot da Solução Padrão.

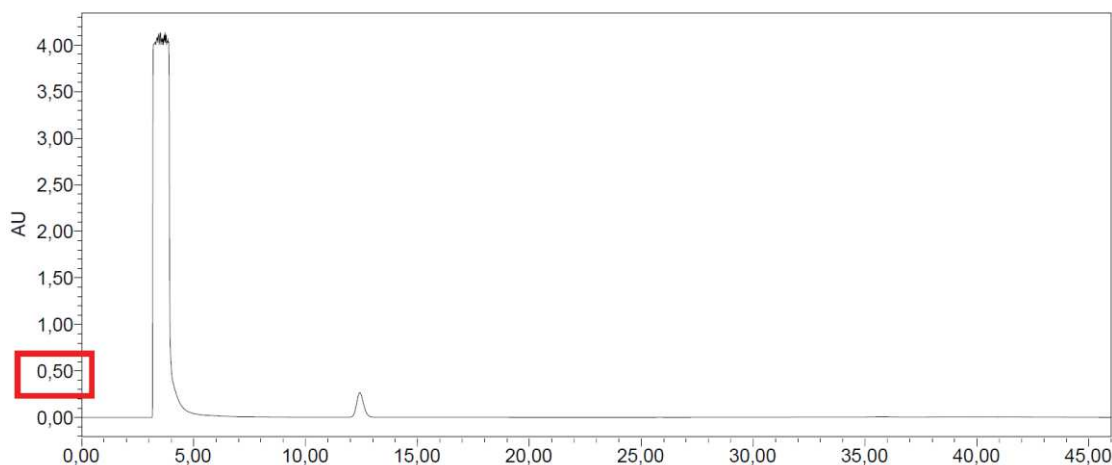


Figura 11 - Cromatograma Solução Padrão de Aciclovir – Avaliado no MaxPlot com 10 µL de injeção.

Acima dessa zona (MAS > 1AU) o erro da medição fotométrica aumenta consideravelmente e a sensibilidade à presença de coeluição diminui drasticamente.

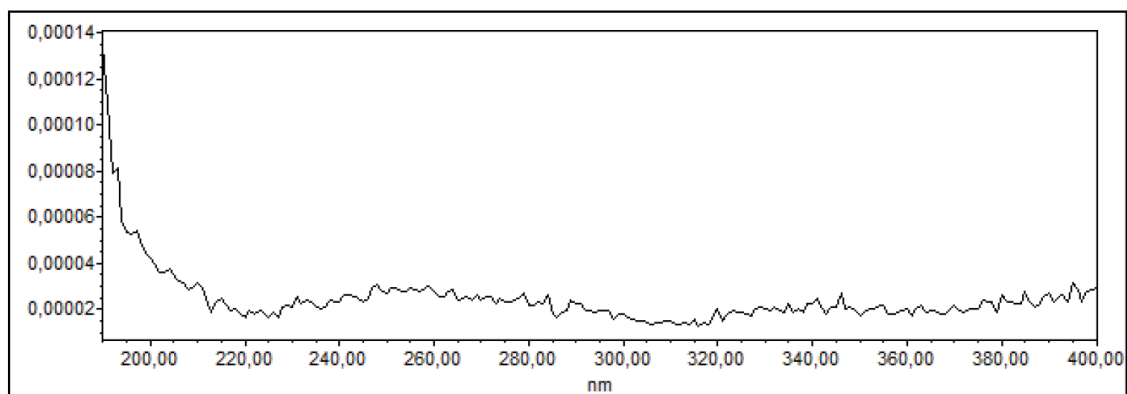


Figura 14 - Noise Spectrum Padrão.

Devido à presença de um pico de placebo em torno 29,70 a 30,70 minutos (intervalo utilizado para cálculo do padrão e amostras expostas às demais degradações do método) para as amostras expostas à degradação alcalina, foi necessário outro intervalo para o cálculo da pureza de pico, sendo usado o intervalo entre 32,00 e 33,00 minutos. Este intervalo foi definido, pois não se observou nenhum pico interferente no cromatograma da solução Amostra para avaliação de pureza de pico, quando avaliado na ferramenta *MAX Plot*, conforme Figura 15.

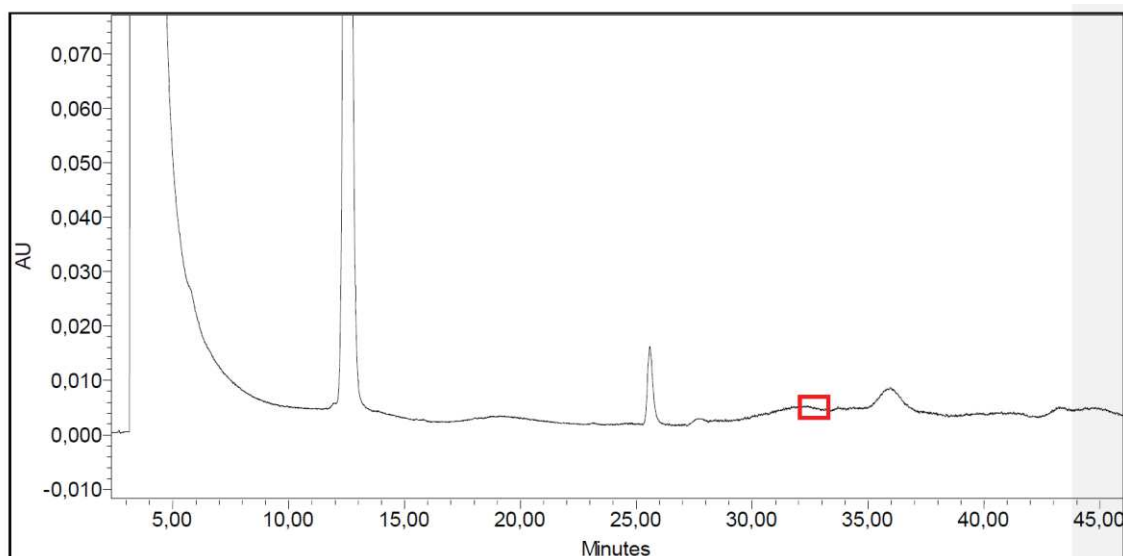


Figura 15 - Cromatograma da solução amostra no *MAX Plot* onde foi definido o intervalo de ruído.

Isto também pode ser observado no *Noise Spectrum* (Figura 16), onde é possível inferir que não há outras substâncias que possuem absorção no intervalo de ruído especificado. A aparência de um *noise spectrum* aceitável não deve apresentar forma espectral significativa além de ruído aleatório e não deve exibir absorbância ultravioleta devido a compostos eluídos.

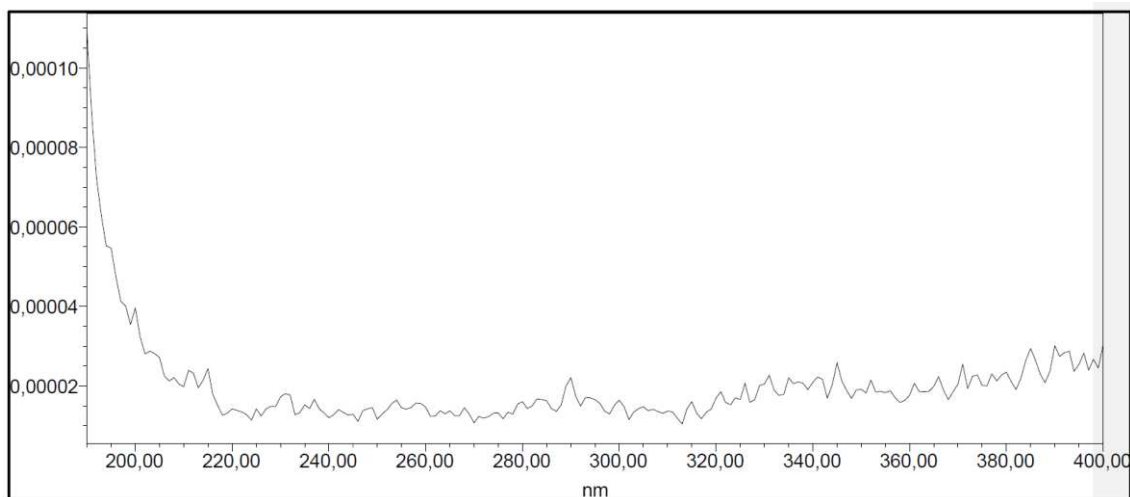


Figura 16 - Noise Spectrum Amostra

Seguem, nas Tabelas 14 a 16, os valores de *purity angle/ purity threshold* para o pico de Aciclovir nas soluções testes, bem como nas soluções submetidas a estresse químicos e físicos.

Os valores de Ângulo de Pureza (Purity Angle) e Limite de Pureza (Purity Threshold) não podem ser usados para comprovar a pureza química,

mas um Ângulo de Pureza menor que o Limite de Pureza indica que não há evidência de heterogeneidade espectral.

Tabela 14 - Resultados da avaliação de pureza de pico de Aciclovir, no Padrão e PA (purity angle/ purity threshold).

Tipo de Amostra	PA 1		PA 2	
	Purity Angle	Purity Threshold	Purity Angle	Purity Threshold
Amostra Controle	0,068	0,232	0,048	0,232
NaOH 1M	0,062	0,235	0,046	0,229
HCl 1M	0,065	0,249	0,071	0,244
H₂O₂ 3%	0,065	0,223	0,107	0,302
FeCl₃ 1 mM	0,052	0,241	0,05	0,231
Fotolítica	0,048	0,233	0,052	0,242
Térmica	0,066	0,235	0,062	0,233

Tabela 15 - Resultados da avaliação de pureza de pico de Aciclovir, no PA e IFA (purity angle/ purity threshold)

Tipo de Amostra	PA 3		MP 1	
	Purity Angle	Purity Threshold	Purity Angle	Purity Threshold
NaOH 1M	0,05	0,235	0,048	0,231
HCl 1M	0,051	0,235	0,057	0,246
H₂O₂ 3%	0,06	0,238	0,053	0,24
FeCl₃ 1 mM	0,051	0,235	0,048	0,234
Fotolítica	0,047	0,233	0,047	0,233
Térmica	0,061	0,231	0,059	0,232

Tabela 16 - Resultados da avaliação de pureza de pico de Aciclovir, no IFA (purity angle/ purity threshold)

Tipo de Amostra	MP 2		MP 3	
	Purity Angle	Purity Threshold	Purity Angle	Purity Threshold
NaOH 1M	0,048	0,231	0,047	0,229
HCl 1M	0,059	0,249	0,057	0,243
H2O2 3%	0,057	0,241	0,059	0,241
FeCl3 1 mM	0,052	0,24	0,049	0,231
Fotolítica	0,054	0,234	0,05	0,233
Térmica	0,057	0,232	0,06	0,23

Na Figura 17 são apresentados os cromatogramas e gráficos de pureza das soluções amostra controle PA, soluções amostra controle IFA, Placebo e Branco, sendo estas soluções utilizadas como referência frente aos estresses químicos e físicos/fotolítico.

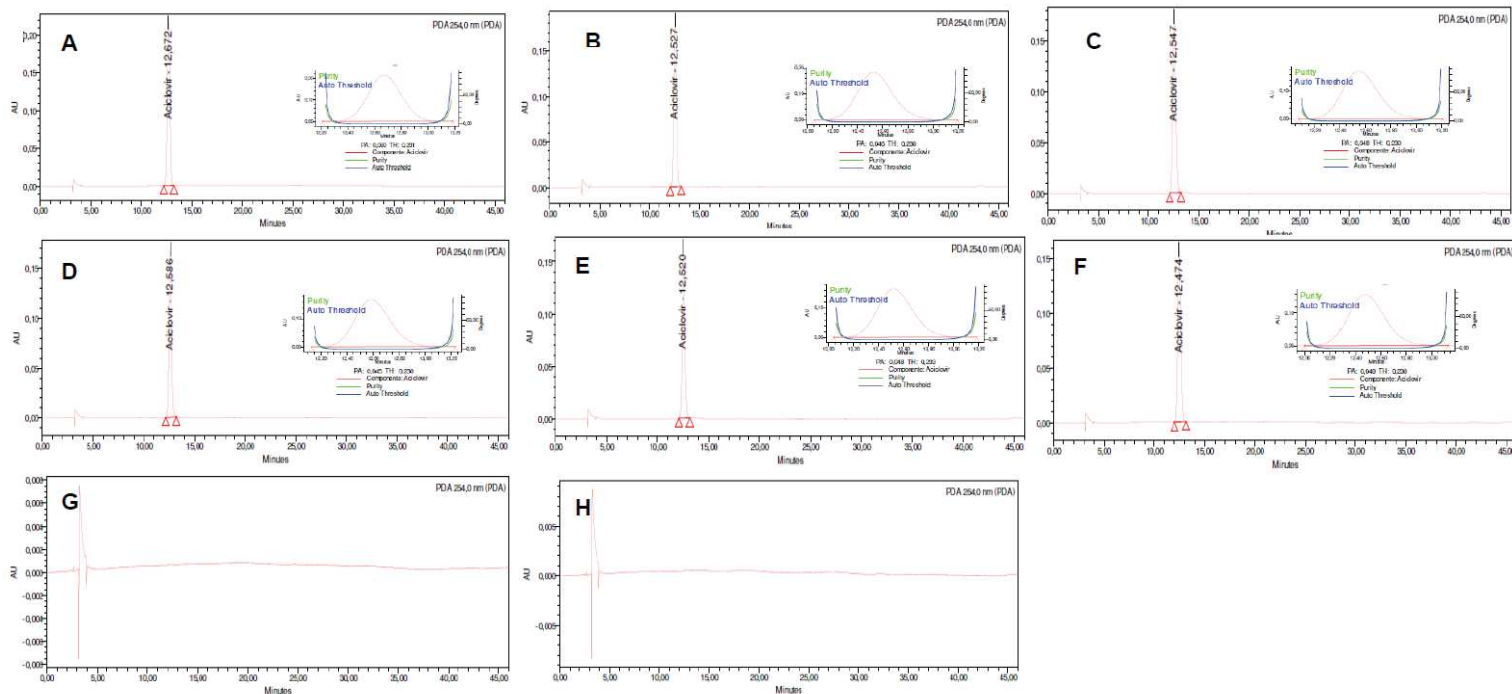


Figura 17 - Cromatogramas das Soluções Controle – Químicos (Ácido, básico, oxidativo e íons metálicos)/Físicos-Fotolítico: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 18I427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Branco; (H) Placebo.

Com a Figura 17, é possível verificar que, nos cromatogramas das soluções Placebo controle, não houve aparecimento de picos com mesmo tempo de retenção de Aciclovir (aproximadamente 12,6 minutos) resultantes de excipientes contidos na formulação do produto, desta maneira não prejudicando a seletividade do método analítico. Além disso, pode-se concluir que todas as soluções controle (IFA's e PA's) demonstraram-se espectralmente homogêneas, desta maneira atendendo aos critérios de aceitabilidade de pureza cromatográfica.

5.1.2 Amostras Controle – Físicos

Na Figura 18 são apresentados os cromatogramas e gráficos de pureza das soluções amostra controle PA e soluções amostra controle IFA, sendo estas soluções utilizadas como referência frente ao estresse físico térmico.

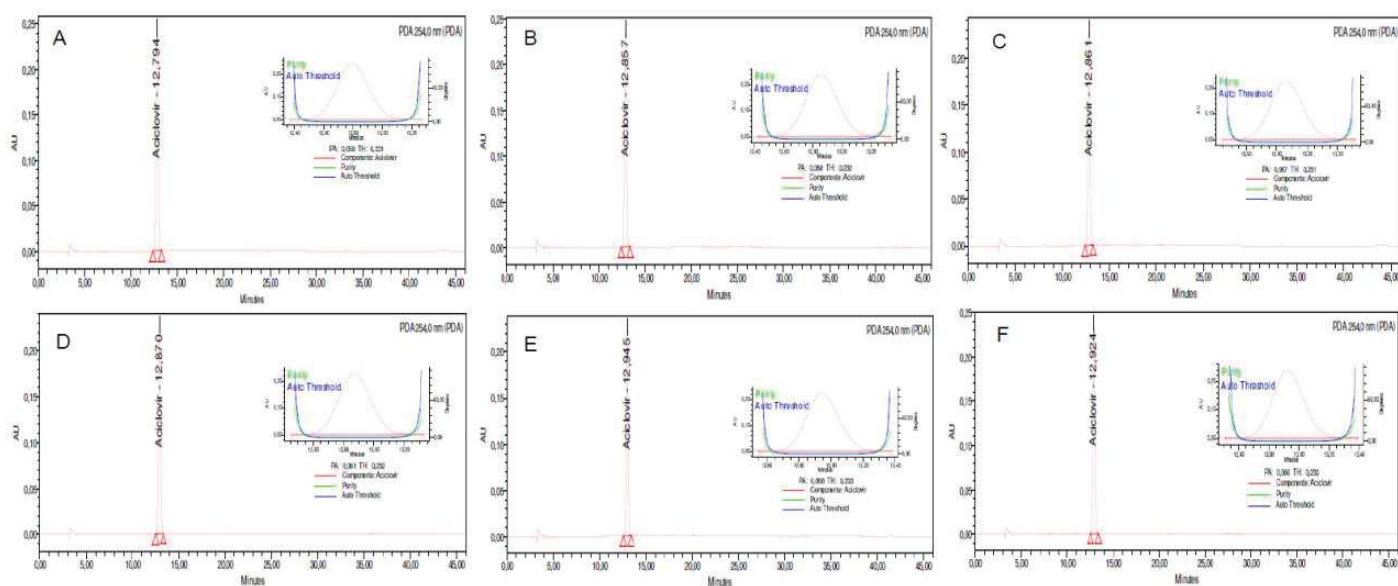


Figura 18 – Cromatogramas das Soluções Controle – Físicos-Térmico: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções controle (IFA's e PA's) (Figura 18) que os mesmos demonstraram-se espectralmente homogêneos, atendendo aos critérios de aceitabilidade de pureza cromatográfica.

5.1.3 Amostras de degradação ácida, alcalina, oxidativa e íon metálico

5.1.3.1 Estresse Ácido – HCl 1,0 M

As soluções branco, placebo, IFA e PA foram submetidas a degradação ácida de HCl 1,0 M. Nessa condição, as amostras foram expostas por um período de aproximadamente 2 dias, onde foi observado decaimento significativo na área do ativo principal.

Na Figura 19 são apresentados os cromatogramas das soluções branco, placebo, IFA e PA expostas ao estresse ácido em HCl 1,0M.

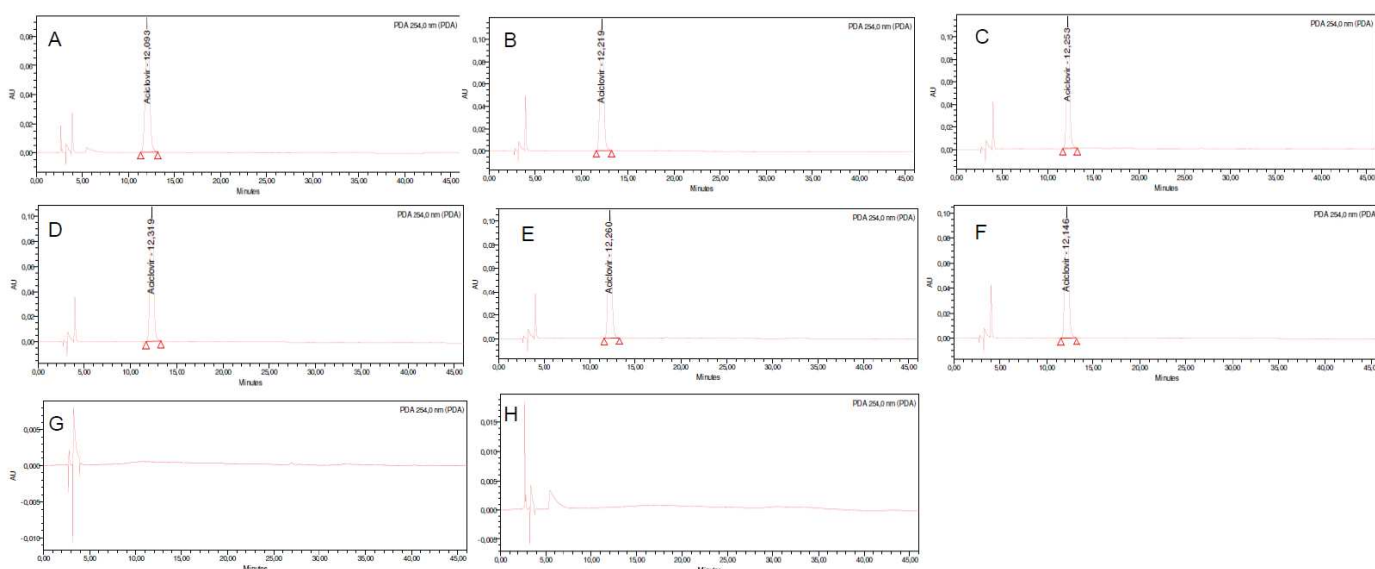


Figura 19 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação ácida (HCl 1,0 M) durante 02 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções placebo e branco o não aparecimento de picos adicionais, desta forma não prejudicando a seletividade do método para quantificação de Aciclovir.

Nas soluções IFA's e PA's submetidas a hidrólise ácida, verificou-se o decaimento significativo em área do pico de Aciclovir (12 a 16%). Com o auxílio dos gráficos de pureza pode-se concluir que o método foi capaz de separar

todas as impurezas geradas, pois não observou-se cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity e Auto Threshold para o pico de Aciclovir*). Sendo assim, o método se demonstrou seletivo para as condições testadas.

Resultados semelhantes também foram obtidos no trabalho realizado por RHEIN (2013) onde ao estressar a amostra sob HCl 1 M observou degradação de cerca de 30% após 3 dias. Em estudo realizado por KHOKALE (2014), utilizando HCl 0,1 M, foi observado aproximadamente 15% de degradação após 3 horas de exposição. SINHA *et al*, 2007 ao aquecer a amostra contendo HCl 0,1 M por 2 horas, obteve aproximadamente 50% de degradação.

5.1.3.2 Estresse Alcalino – NaOH 1,0 M

As soluções: branco, placebo, IFA e PA, foram submetidas a degradação alcalina de NaOH 1,0 M. Nessa condição, as amostras foram expostas por um período de aproximadamente 10 dias, em que não foi observado decaimento significativo na área do ativo principal. Na Figura 20 são apresentados os cromatogramas das soluções branco, placebo, IFA e PA expostas ao estresse alcalino em NaOH 1,0 M.

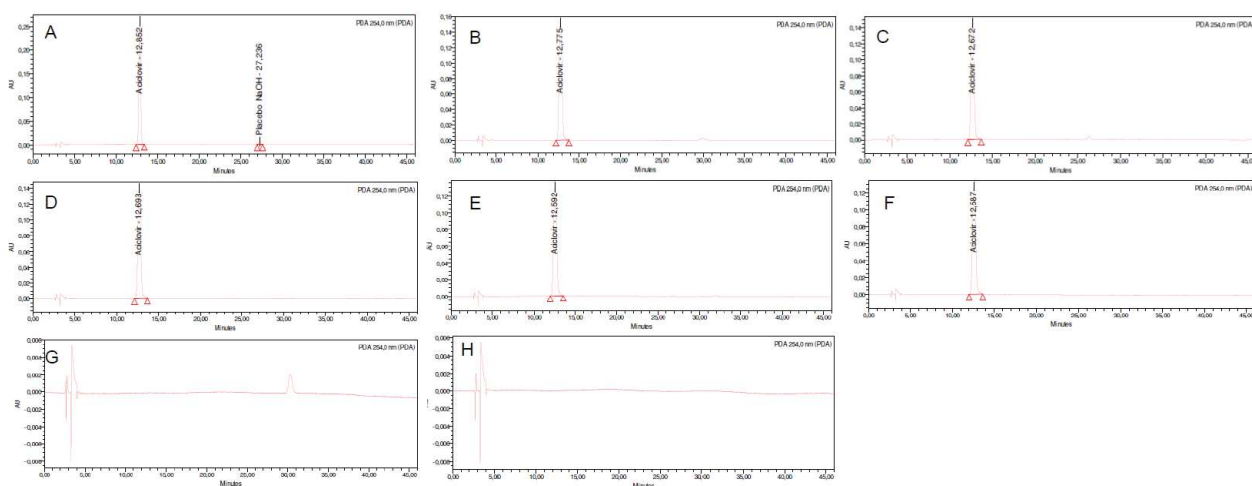


Figura 20 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação alcalina (NaOH 1,0 M) durante 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções placebo e branco o não aparecimento de picos adicionais, desta forma não prejudicando a seletividade do método para quantificação de Aciclovir.

Nas soluções IFA's e PA's submetidas a hidrólise alcalina, não verificou o decaimento significativo em área do pico de Aciclovir (inferior a 10%). Com o auxílio dos gráficos de pureza pode-se concluir que o método foi capaz de separar todas as impurezas geradas, pois não houve cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *Auto Threshold para o pico de Aciclovir*). Sendo assim, o método se demonstrou seletivo para as condições testadas.

Resultados semelhantes também foram obtidos no trabalho realizado por RHEIN (2013) onde ao estressar a amostra sob NaOH 1 M durante 14 dias observaram que não houve degradação do ativo. Em estudo realizado por SINHA *et al.* (2007), utilizando NaOH 0,1 M com aquecimento, foi observado que apenas 5,0% do ativo apresentou degradação após 1 hora de exposição no agente degradante.

5.1.3.3 Estresse Oxidativo – H₂O₂ 3,0%

As soluções: branco, placebo, IFA e PA, foram submetidas a degradação oxidativa de H₂O₂. Nessa condição, as amostras foram expostas por um período de aproximadamente 10 dias, em que não foi observado decaimento significativo na área do ativo principal. Na Figura 21 são apresentados os cromatogramas das soluções branco, placebo, IFA e PA expostas ao estresse alcalino em H₂O₂ 3,0%.

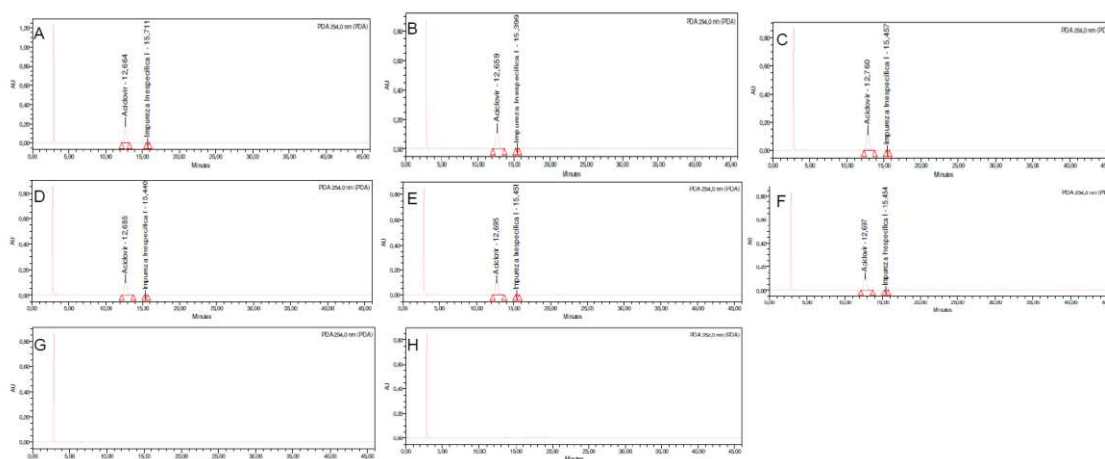


Figura 21 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação por peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3%) durante 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções placebo e branco o não aparecimento de picos adicionais, não prejudicando a seletividade do método para quantificação de Aciclovir.

Nas soluções IFA's e PA's submetidas a oxidação por peróxido de hidrogênio, não foi possível verificar o decaimento significativo em área do pico de Aciclovir (inferior a 10%). Com o auxílio dos gráficos de pureza pode-se concluir que o método foi capaz de separar todas as impurezas geradas, pois não houve cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *Auto Threshold para o pico de Aciclovir*). Sendo assim, o método se demonstrou seletivo para as condições testadas.

Em estudo realizado por SINHA *et al.* (2007), ao estressar a amostra com H_2O_2 3,0%, observou degradação de aproximadamente 11% após 8 horas, no entanto, tal degradação foi alcançada quando as amostras foram submetidas a condições de exposição ao agente degradante com aquecimento.

5.1.3.4 Estresse por Íon metálico – $FeCl_3$ 1mM

As soluções: branco, placebo, IFA e PA, foram submetidas a degradação por íons metálicos de $FeCl_3$ 1 mM. Nessa condição, a amostra foi exposta por um período de 24 horas, aonde não foi observado decaimento

significativo na área do ativo principal e nem o surgimento de impurezas, demonstrando que o ativo não é suscetível a degradação.

Na Figura 22 são apresentados os cromatogramas das soluções branco, placebo, IFA e PA expostas ao estresse metálico.

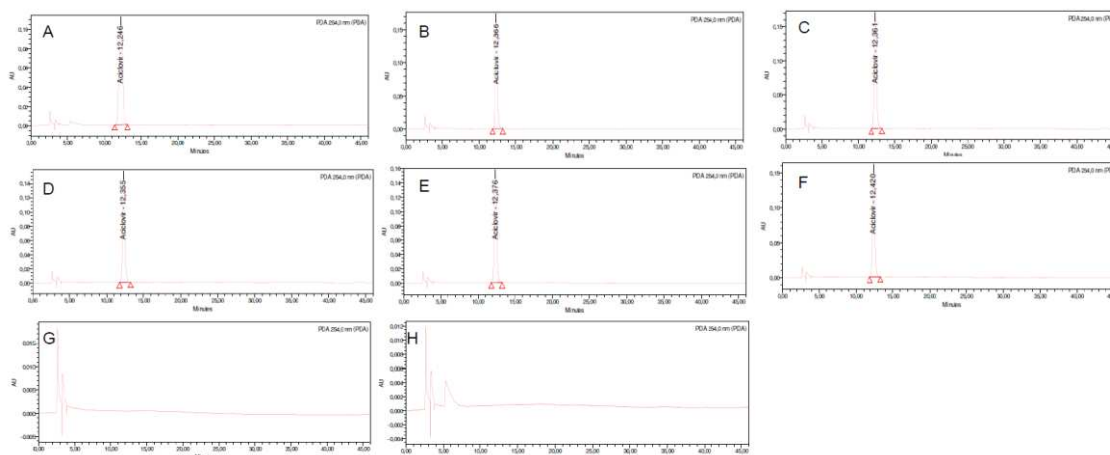


Figura 22 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação em íons metálicos (FeCl_3) durante 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções branco e placebo o não aparecimento de picos adicionais, não prejudicando a seletividade do método para quantificação de Aciclovir.

Nas soluções IFA's e PA's submetidas a degradação na presença de íons metálicos, não verificou-se decaimento significativo de área do pico de Aciclovir (inferior a 10%). Com o auxílio dos gráficos de pureza pode-se concluir que o método foi capaz de separar todas as impurezas geradas, pois não observou-se cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *Auto Threshold para o pico de Aciclovir*). Sendo assim, o método se demonstrou seletivo para as condições testadas.

Seguindo recomendações contidas no guia N° 04/2015 – Versão 1, Anvisa, pode-se considerar que o produto não foi suscetível a esse tipo de degradação, uma vez que não formou produtos de degradação ou queda de teor no período recomendado de 24 horas.

5.1.4 Discussões dos resultados obtidos com as amostras submetidas a degradação ácida, alcalina, oxidativa e por íons metálicos

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados de variação de recuperação e decaimento, porcentagem de Aciclovir nas degradações químicas.

Tabela 17 - Resultados das soluções em estresse ácido, básico, oxidativo e por íon metálico.

Lote da amostra	Tipo de amostra	Teor (%)	Varição (%)
PA1	Controle	104,25	-
	HCl 1M	91,34	-12,91
	NaOH 1M	102,97	-1,28
	H ₂ O ₂ 3%	101,51	-2,75
	FeCl ₃ 1 mM	104,68	0,42
PA 2	Controle	102,14	-
	HCl 1M	86,10	-16,04
	NaOH 1M	103,21	1,07
	H ₂ O ₂ 3%	99,03	-3,11
	FeCl ₃ 1 mM	100,67	-1,47
PA 3	Controle	101,00	-
	HCl 1M	85,91	-15,09
	NaOH 1M	102,69	1,69
	H ₂ O ₂ 3%	99,72	-1,27
	FeCl ₃ 1 mM	102,17	1,17
MP 1	Controle	96,12	-
	HCl 1M	80,92	-15,20
	NaOH 1M	96,32	0,20
	H ₂ O ₂ 3%	91,62	-4,50
	FeCl ₃ 1 mM	94,86	-1,26
MP 2	Controle	94,73	-
	HCl 1M	78,67	-16,06
	NaOH 1M	97,32	2,59
	H ₂ O ₂ 3%	94,27	-0,46
	FeCl ₃ 1 mM	95,06	0,33
MP 3	Controle	93,84	-
	HCl 1M	81,70	-12,14
	NaOH 1M	96,36	2,52
	H ₂ O ₂ 3%	90,72	-3,12
	FeCl ₃ 1 mM	95,95	2,11

Com base nos resultados obtidos para as condições testadas, o Aciclovir se demonstrou instável em condições de degradação ácida, pois apresentou variação de teor entre 12 a 16% durante o período de estudo.

Todas as impurezas formadas durante o EDF apresentaram resolução superior a 1,5 em relação ao ativo (Aciclovir). Feita a análise dos gráficos de pureza pode-se constatar a homogeneidade espectral do pico de Aciclovir em todas as condições testadas, uma vez que não observou-se cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *AutoThreshold*), desta forma provando a seletividade do método analítico em questão.

5.1.5 Amostras de degradação fotolítica e térmica

5.1.5.1 Estresse Fotolítico

Na Figura 23 estão demonstrados os cromatogramas das soluções branco, placebo, IFA e PA ao estresse fotolítico durante 2 ciclos.

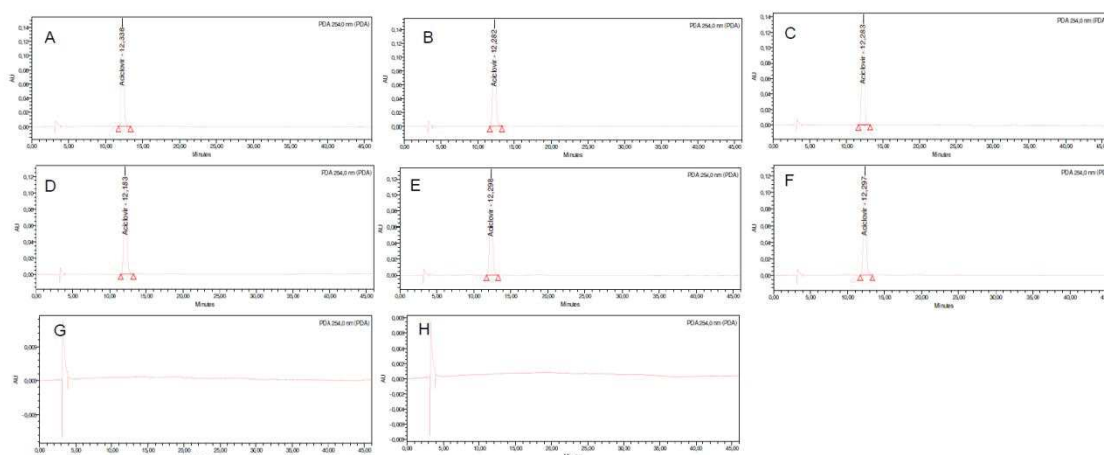


Figura 23 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação fotolítica (2 ciclos): (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções placebo e branco o não aparecimento de picos adicionais, desta forma não prejudicando a seletividade do método para quantificação de Aciclovir.

Nas soluções IFA's e PA's submetidas a degradação fotolítica, não verificou-se o decaimento significativo em área do pico de Aciclovir (inferior a 10%). Com o auxílio dos gráficos de pureza pode-se concluir que o método foi capaz de separar todas as impurezas geradas, pois não observou-se

cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *Auto Threshold*). Sendo assim, o método se demonstrou seletivo para as condições testadas.

Resultados semelhantes também foram obtidos no trabalho realizado por RHEIN (2013) onde ao manter as amostras em câmara de fotoestabilidade por 50 horas, foi observado estabilidade do ativo. SINHA *et al.* (2007) também não observaram degradação das amostras após 7 dias de exposição.

5.1.5.2 Estresse térmico

Na Figura 24 estão demonstrados os cromatogramas das soluções expostas ao estresse térmico durante 10 dias.

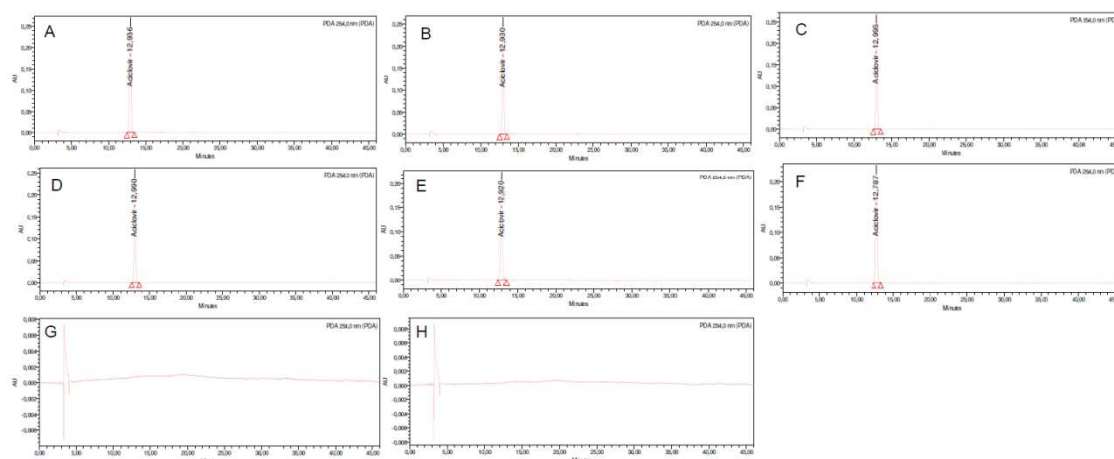


Figura 24 – Cromatogramas das Soluções expostas a condições de degradação térmica durante o período de 10 dias: (A) PA 139.18A; (B) PA 139.18B; (C) PA 181427; (D) IFA 872561; (E) IFA 663159; (F) IFA 1024802; (G) Placebo; (H) Branco.

É possível verificar nos cromatogramas das soluções placebo o não aparecimento de picos adicionais, desta forma não prejudicando a seletividade do método para quantificação de Aciclovir.

Nas soluções IFA's e PA's submetidas a exposição térmica, não verificou-se decaimento significativo de área do pico de Aciclovir (inferior a 10%). Com o auxílio dos gráficos de pureza pode-se concluir que o método foi capaz de separar todas as impurezas geradas, pois não observou-se cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *Auto Threshold*). Sendo assim, o método se demonstrou seletivo para as condições testadas.

Em estudo realizado por SINHA *et al.* (2007), ao incubar a amostra a 70°C por 15 dias, observou degradação de aproximadamente 2%.

5.1.6 Discussões dos resultados obtidos com as amostras submetidas a estresse fotolítico e térmico

Com base nos resultados obtidos para as condições testadas, o Aciclovir demonstrou-se estável em condições fotolíticas e térmicas, pois não apresentou variação de teor superior a 10% durante o período de estudo, conforme Tabelas 18 e 19 reportadas a seguir.

Tabela 18 - Resultados das soluções em estresse fotolítico.

Lote da amostra	Tipo de amostra	Teor (%)	Variação (%)
PA 1	Controle	104,25	-
	Fotolítico	104,49	0,24
PA 2	Controle	102,14	-
	Fotolítico	103,84	1,70
PA 3	Controle	101,00	-
	Fotolítico	101,44	0,44
MP 1	Controle	96,12	-
	Fotolítico	94,49	-1,63
MP 2	Controle	94,73	-
	Fotolítico	98,78	4,05
MP 3	Controle	93,84	-
	Fotolítico	95,29	1,45

Tabela 19 - Resultados das soluções em estresse Térmico.

Lote da amostra	Tipo de amostra	Teor (%)	Variação (%)
PA 1	Controle	104,62	-
	Térmico	103,67	0,95
PA 2	Controle	104,01	-
	Térmico	102,57	-1,45
PA 3	Controle	98,65	-
	Térmico	99,21	0,56
MP 1	Controle	92,80	-
	Térmico	93,15	0,36
MP 2	Controle	94,72	-
	Térmico	94,98	0,25
MP 3	Controle	97,99	-
	Térmico	95,73	-2,26

5.2 LINEARIDADE

Serão apresentados o gráfico de linearidade, avaliação para o teste de ANOVA, estatística da regressão linear e teste de *Cochran*. A Figura 25 apresenta o gráfico da linearidade com a respectiva equação da reta.

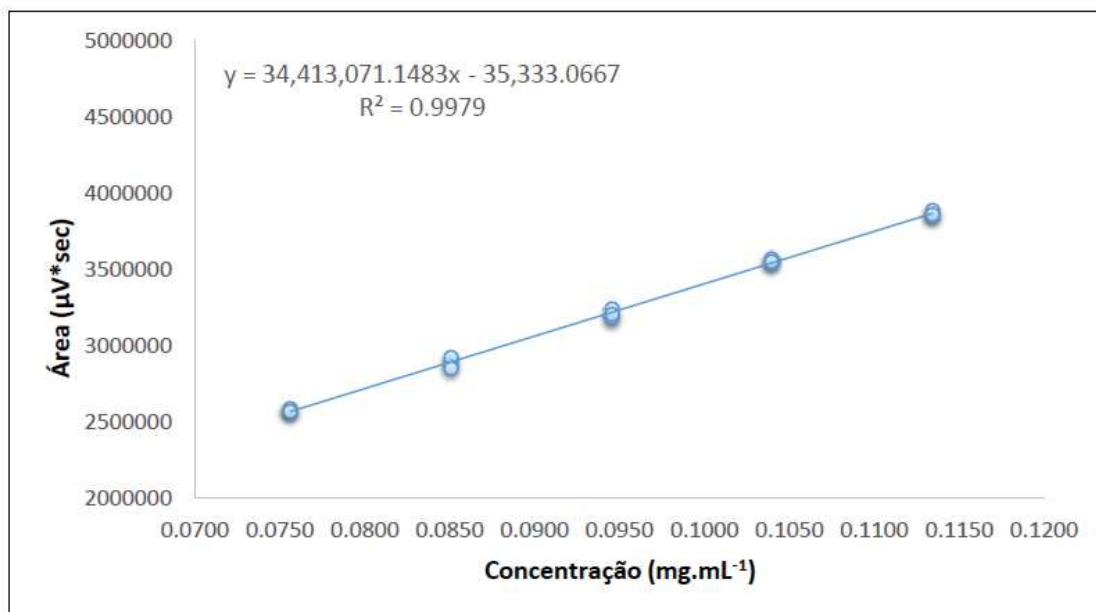


Figura 25 - Curva de calibração de Aciclovir.

Na Tabela 20 é apresentado o resultado da análise de variância (ANOVA) da regressão. Observa-se que o F calculado ($MQ_{regressão}/MQ_{resíduo} = 6179,059$) foi maior que o F tabelado ($8,52558 \cdot 10^{-19} - \alpha = 0,05$). Valores estatisticamente significativos ($F_{calc} > F_{tab}$) indicam uma relação linear entre as duas variáveis, em que quanto maior for a razão entre F_{calc} e F_{tab} , mais significativa será essa relação.

Tabela 20 – Resultados de teste ANOVA para Aciclovir.

	GL	SQ	MQ	F _{CALC}	F _{TAB}
Regressão	1	3,17615E+12	3,17615E+12		
Resíduo	13	6682235549	514018119,1	6179,059	8,52558E-19
Total	14	3,18283E+12			

A Tabela 21 apresenta dos coeficientes de regressão para o teste ANOVA.

Tabela 21 – Dados dos coeficientes de regressão segundo teste ANOVA para Aciclovir.

	Coeficientes	Erro Padrão	Stat t	Valor - P
Interseção	-35333,06667	41805,04282	-0,845186712	0,413292
Variável X1	34413071,15	437786,4107	78,60698803	8,53E-19

Pela avaliação dos dados apresentados na Tabela 16 é possível verificar a significância dos coeficientes linear (interseção) e angular (variável X1). Considerando que o módulo do t calculado (0,845186712) para o coeficiente linear foi menor que o t tabelado (2,145 - $\alpha = 0,05$) e o p-valor foi maior que 0,05 conclui-se que o parâmetro não é significativo para o modelo, ou seja, não é estatisticamente diferente de zero. Por outro lado, o t calculado (78,60698803) para o coeficiente angular, foi maior que o tabelado e o p-valor foi menor que 0,05 levando a conclusão de que o parâmetro é significativo para o modelo, ou seja, é estatisticamente diferente de zero.

Na Tabela 22 são apresentados os resultados dos testes estatísticos da regressão linear obtida a partir da curva analítica.

Tabela 22 – Resultados da Estatística de regressão.

	Resultado	Critério
R Múltiplo	0,998949717	0,99
R-Quadrado	0,997900537	-
R-quadrado ajustado	0,997739039	-
Erro Padrão	22671,96769	-
Observações	15	-

Na regressão linear simples, o modelo ajustado precisa ser validado para que os resultados sejam confiáveis. A análise visual dos resíduos em conjunto com os testes de Cochran e Grubbs foram utilizados para validar a adequabilidade do modelo de regressão. Em um modelo bem ajustado, os resíduos devem ser independentes, apresentar variância constante para os diferentes níveis, possuir distribuição normal e aleatória (Pimentel e Neto, 1996).

De acordo com a avaliação da distribuição dos resíduos (Figura 26) conclui-se que os erros são independentes, de média nula e de variância constante uma vez que os pontos se apresentaram distribuídos de forma aleatória em torno da reta de resíduo zero, com variância homogênea no início e no final das observações.

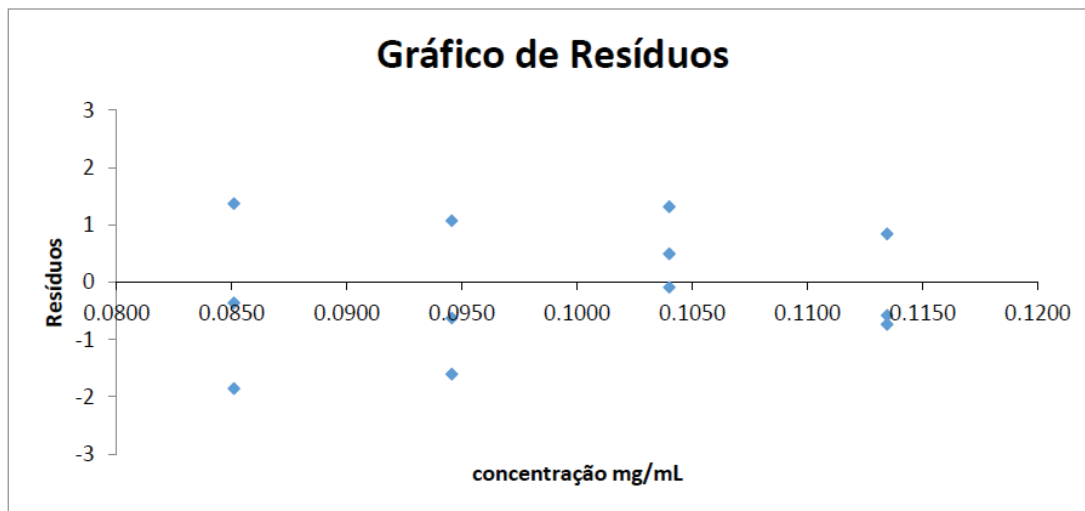


Figura 26 – Gráfico de Resíduos para Aciclovir.

Adicionalmente os resultados do teste estatístico de Cochran para homogeneidade das variâncias demonstrou que os resíduos são homogêneos em um nível de significância de 5% (C calculado 0,4961 < C tabelado 0,6838). Para verificar a ocorrência de valores extremos (*outliers*) utilizou-se o teste de Grubbs. Dentre os 15 resíduos obtidos na construção da regressão linear não houve a ocorrência de nenhum valor extremo (*outlier*), pois nenhum valor calculado foi maior que o valor tabelado ($G_{\text{tabelado}} = 2,41$) conforme Tabela 23.

Tabela 23 – Resultados de variância - Teste de Cochran para Aciclovir

Concentração (%)	$G_{\text{calculado}}$	$G_{\text{tabelado}} (n = 15, P = 0,05)$
80%	0,18	2,41
	0,91	
90%	0,07	
	0,37	
	1,37	
100%	1,86	
	1,61	
	1,07	
110%	0,63	
	0,1	
	1,31	
120%	0,49	
	0,84	
	0,74	
	0,58	

A partir dos dados apresentados, podemos concluir que a metodologia analítica é capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de Aciclovir. A conclusão é fundamentada na relação linear comprovada na faixa de 80 a 120 $\mu\text{g/mL}$ estabelecida para o método.

5.3 PRECISÃO

5.3.1 Repetibilidade

Os resultados de repetibilidade no preparo das amostras estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Resultados da Precisão 1º dia

Identificação	Resultado (%)	Teor médio (%)	DPR (%)	Especificação (%)
	103,8			
	100,7			
Precisão 100%	101,4	102,3	1,21	≤ 2,7 %
	102,9			
	103,4			
	101,7			

Conforme os resultados apresentados na Tabela 16, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR%) entre os preparos das amostras de aciclovir estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de precisão (repetibilidade). Sendo assim, o método analítico possui precisão (repetibilidade) adequada.

5.3.2 Intermediária

Os resultados da precisão 2º dia estão apresentados na Tabela 25 e pode-se observar que o desvio padrão relativo (DPR%) em todos os níveis de concentração estão de acordo com o critério de aceitação.

Tabela 25 – Resultados da Precisão 2º dia

Identificação	Resultado (%)	Teor médio (%)	DPR (%)	Especificação (%)
	103,1			
	102,9			
Precisão 100%	103,8	103,9	0,80	≤ 2,7 %
	104,7			
	103,8			
	105,0			

A Tabela 26 apresenta os dados necessários para determinação da precisão intermediária, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações.

Tabela 26 – Resultados da Precisão Intermediária

Identificação	Teores 1° dia (%)	Teores 2° dia (%)	Teor médio (%)	DPR (%)	Especificação (%)
Precisão 100%	103,8	103,1	103,1	1,10	≤ 2,7 %
	100,7	102,9			
	101,4	103,8			
	102,9	104,7			
	103,4	103,8			
	101,7	105,0			

Conclui-se que o método é preciso uma vez que a proximidade dos resultados das duas precisões para doseamento de aciclovir (1° e 2° dia) cumpre com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro.

5.4 EXATIDÃO

A exatidão é o parâmetro que mostra quão próximos os resultados da análise estão dos valores reais do analito presente na amostra. Para tal, foram preparadas soluções com concentrações conhecidas do analito em presença dos excipientes da amostra. Foram preparadas soluções nas concentrações 80%, 100% e 120%.

Os resultados das análises encontram-se na Tabela 27, demais informações encontram-se nos cromatogramas.

Tabela 27 - Resultados obtidos a partir dos testes de Exatidão para três níveis os três níveis.

Identificação/Nível	Recuperação (%)	Média rec.	Especificação (%)	DPR (%)	Especificação (%)
Exatidão 80%	99,92	100,44	97-103%	0,5	2,70%
	100,84				
	100,55				
Exatidão 80%	99,47	100,57	97-103%	1,0	2,70%
	101,49				
	100,75				
Exatidão 80%	98,34	99,96		1,6	
	101,60				
	99,94				

Conforme os resultados apresentados na Tabela 27, realizada para a metodologia proposta, tanto nos valores individuais quanto nas médias em

todos os níveis analisados foram satisfatórios baseados nos critérios de aceitação estabelecidos. Sendo assim, o método analítico possui exatidão adequada nos níveis de concentração 80 µg/mL a 120,0 µg/mL de aciclovir.

6. CONCLUSÃO

Após realizar com êxito todas as análises pertinentes ao protocolo de adequabilidade de metodologia analítica, conclui-se que o método proposto é adequado para dosear Aciclovir em Aciclovir – creme dermatológico de 50 mg/g produzidos com as três matéria prima (MP1, MP2 e MP3), devido ao mesmo se demonstrar seletivo, separando de forma adequada todos os picos secundários formados nos estresses aplicados e o pico de Aciclovir apresentar-se espectralmente homogêneo, nas condições aplicadas.

A metodologia também demonstrou-se linear e exata entre a faixa de 80 $\mu\text{g/mL}$ a 120 $\mu\text{g/mL}$ (80 a 120% em relação a concentração de trabalho de Aciclovir) e precisa na faixa de trabalho de 100 $\mu\text{g/mL}$, por atender a todos os critérios de aceitabilidade, conforme AOAC 2016.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC INTERNACIONAL. Guidelines for standard method performance requirements. AOAC official methods of analysis - 2016.

BACCHI, M. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e satolol. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - USP. p-229. 2013.

BAERTSCHI, S.W.; ALSANTE, K.M.; REED, R.A. Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation. 2ª Ed. v. 210, p-25. 2005.

BALON, K.; RIEBESEHL, B.U.; MULLER, B.W. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. Pharm Resarch. v.16, p882-888. 1999.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 565p., 2v/il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº166 de 24 de julho de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº17 de 16 de abril de 2010.

BRITISH PHARMACOPOEIA, 2018.

BRUICE, P. Y. Química Orgânica 4 edição, vol 1 e 2, 2014.

CARNEIRO, W.; SANTOS, M. C. Estudo comparativo in vitro e avaliação da qualidade físico-química do antirretroviral aciclovir comprimidos obtidos via internet. Ectetica Química Journal. v.41, p.43-53. 2016.

CHUST, R. B. Introdução à Cromatografia de Líquidos. BOLETIM SPQ, 39: p 39- 53. 1990.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, F. Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp. 2006. p.926.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. Química Nova, São Paulo, v. 14, p. 21-25. 1998.

GE Halfcare. HPLC Pain Points – Part I. Disponível em: < <https://www.gelifesciences.com/en/us/solutions/lab-filtration/knowledge-center/hplc-pain-points-part-1> >. Acesso em: 09 de maio de 2019.

Guia Nº 04/2015 – Versão 01, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde.

ICH. Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures - Methodology: Rockville, 1996.

KHOKALE. A. S.; PATIL. P. M. Stability-indicating spectrophotometric method of acyclovir in bulk and pharmaceutical dosage form. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. v. 3, p.1235-1245. 2014.

ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in new drug products - Q3B.

PERUZZO, F. M.; CANTO, E. L. Química na Abordagem do Cotidiano. 4. ed. São Paulo. Editora Moderna. 2006.

PubChem. Acyclovir (Compound). Disponível em: <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acyclovir#section=Crystal-Structures>>. Acesso em: 09 de maio de 2019.

SILVA, A. F. Validação de Métodos Analíticos para controlo de Qualidade de um Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa. 2006.

SINHA. V. R.; TREHAN. M. A.; KUMAR M.; SINGH S.; BHINGE. J.R. Stress Studies on Acyclovir. Journal of Chromatographic Science, Vol. 45, July 2007.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

STULZER, H. K. Desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados de liberação modificada a base de quitosana contendo o antiviral Aciclovir. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

The United States Pharmacopeia, USP 41. United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2017.

The United States Pharmacopeia, USP 42. United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2019.