

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LOUIS KWAME DOTSE

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE PEMETREXEDE, FLUDARABINA E
IDARRUBICINA-HCL EM LIÓFILOS INJETÁVEIS

BRASILIA

2017

LOUIS KWAME DOTSE

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
PARA DETERMINAÇÃO DE PEMETREXEDE, FLUDARABINA E IDARRUBICINA-
HCL EM LIÓFILOS INJETÁVEIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Martin Infante
Cordova

BRASILIA

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

LOUIS KWAME DOTSE

Desenvolvimento, validação e adequação de metodologias analíticas empregando cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de Pemetrexede, Fludarabina e Idarrubicina-HCl em liófilos injetáveis

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____ de _____ de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Martin Infante Córdoba

Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré

Profª. Dra. Monica Valero da Silva

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio e por ter suportado bravamente a minha ausência durante estes anos. Em especial aos meus pais Eric e Gladys, sem os quais nada que eu faço seria possível. E a todos que, contribuíram para a realização desta etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Já que todo trabalho de pesquisa é uma produção conjunta, se apoiando nas produções de outros para construir algo novo, além de todas as pessoas e instituições que constam nas referências bibliográficas, há aquelas que contribuíram diariamente para a realização deste trabalho.

Como não é possível mencionar todas elas, compreendam que pessoas e estabelecimentos que me auxiliaram nisso, possuem participação nesta obra. São esses: familiares, amigos, colegas de curso, além dos funcionários da universidade, assim como as instituições que contribuíram com o suporte material e financeiro.

Gostaria de pedir perdão aos que não mencionei, pois seria extenuante e quem sabe desleal se eu não me lembrasse de um deles; sendo assim, escolhi citar somente alguns e em nome desses, honrar todos os que fazem parte desse grupo especial.

Agradeço imensamente a:

Linford e Leroy, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis e por terem cuidado da família quando eu não podia estar presente;

Eric e Gladys, que representa a nossa grande família, pelo amor e desprendimento dedicado a todos nós;

Kosi Umenyiliora, representando todos os meus amigos, pelo afeto incondicional e a paciência que mesmo de longe sempre teve uma palavra de conforto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Infante Cordova, pelo incentivo, paciência além da confiança em me permitir fazer parte do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Chemicaltech, pela gentileza em fornecer os recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

"To become truly great, one must stand with people, not above them."

Charles de Montesquieu

Resumo

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico simples e sensível para a determinação de Pemetrexede em pó liofilizado, por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), além da adequação das metodologias analíticas vigentes na Farmacopeia americana (USP) para Fludarabina e Idarrubicina, todos princípios ativos de medicamentos antineoplásicos aprovados para o tratamento de cânceres. Para o desenvolvimento do método, utilizou-se a coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), comprimento de onda de detecção de 254 nm à temperatura ambiente (25°C). A composição da fase móvel foi de acetonitrila (ACN): solução tampão de fosfato monobásico de sódio pH 4 (30:70) com vazão de 0,8 ml/min por meio de eluição isocrática, obtendo o tempo de retenção de 4,2min. A equação da curva analítica foi, $y=37,55x+214,62$, com $r^2 = 0,99$. O desvio padrão relativo foi 0,1%, com Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 1,49 µg/mL e 4,53 µg/mL respectivamente. O método analítico desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação do teor de Pemetrexede em amostras de produtos farmacêuticos acabados obtendo-se boa precisão (desvio relativo de 0,3%). Nos ensaios de adequação do método para controle de qualidade dos medicamentos antineoplásicos Fludarabina e Idarrubicina, ambos os métodos mostraram boa linearidade ($r^2>0,99$), seletividade e precisão ($DPR\leq 2,0\%$). Os métodos estudados podem ser considerados simples, e capazes de avaliar a qualidade, eficácia e segurança em líofilos injetáveis de Pemetrexede, Fludarabina e Idarrubina.

Palavras-chave: Pemetrexede, Fludarabina, Idarrubicina, cromatografia líquida, metodologias analíticas, validação e controle de qualidade.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop and validate a simple, sensitive and cost-effective analytical method for the determination of Pemetrexed in lyophilized powder by means of the high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) technique, besides evaluating the adequacy of analytical methods present in United States Pharmacopoeia (USP) belonging to Fludarabine and Idarubicin, active ingredients in antineoplastic drugs approved for the treatment of various cancers. The method was developed employing C18 Column (250 x 4,6 mm; 5 μ m), with absorbance wavelength measured at 254 nm, at column oven temperature of 25°C, with mobile phase composed of acetonitrile ACN: sodium dihydrogen orthophosphate buffer of pH 4 (30:70) at a flow rate of 0,8ml/min in isocratic elution, obtaining a retention time of 4.2mins. the method proved to be linear with $r^2 >0.99$, a curve equation of $y=37,55x+214,62$, of relative standard deviation of 0.1%, with limit of detection (LOD) and limit of quantification LOQ of 1,49 μ g/mL e 4,53 μ g/mL respectively the developed method was then used in the determination of Pemetrexede in bulk pharmaceutical formulations obtaining (relative deviation of 0,3%). Tests evaluating the adequacy of quality control methods for other antineoplastic agents such Fludarabina e and Idarubicin present in USP was also carried out, during which both methods tested demonstrated, precision ($RSD \leq 2,0\%$), linearity ($r^2 > 0.99$) and selectivity respectively. The studied method is simple, efficient and capable of determining the quality, quantity, efficacy and security of Pemetrexed, Fludarabine and Idarubicin in lyophilized powder for injection.

Key word: Pemetrexed, Fludarabine, Idarubicin, Liquid chromatography, Analytical methods, validation and Quality control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química de Permetrexede Disódico. Nome IUPAC: N-[4-[2- (2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-d] pyrimidin-5-yl) ethyl]benzoyl]-L-glutamic acid disodium..... **Pag. 5**
- Figura 2.** Estrutura química de Fosfato de Fludarabina Nome IUPAC: [(2R,3S,4S,5R) -5-(6-amino-2-fluoropurin-9-yl) -3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl dihydrogen phosphate..... **Pag. 7**
- Figura 3.** Estrutura química de Idarrubicina HCL. Nome IUPAC: (7S,9S) -9-acetyl-7-[(2R,4S,5S,6S) -4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12 dione; hydrochloride **Pag. 8**
- Figura 4.** Esquema de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência. **Pag. 11**
- Figura 5.** Composição da fase móvel: **a) 65:35, b) 70:30, c) 75:25**, Água (buffer): Solvente. Vazão 0,8 mL min⁻¹; pH = 4,0; Volume de injeção 10 µL **Pag. 32**
- Figura 6.** Volume de injeção: **a) 5µL, b) 10 uL, c) 20uL**. Fase móvel-70:30 Água (buffer): Solvente. Vazão 0,8 mL min⁻¹; pH = 4,0. **Pag. 33**
- Figura 7.** Vazão da fase móvel: **a) 1,0 mL min⁻¹, b) 0,8 mL min⁻¹, c) 0,6 mL min⁻¹**. Fase móvel-70:30 Água (buffer): Solvente. pH = 4,0; Volume de injeção 10 µL **Pag. 34**
- Figura 8.** Variação de pH: **a) pH = 4,5; b) pH = 4,0; c) pH = 3,5**. Fase móvel-70:30 Água (buffer): Solvente. Vazão 0,8 mL min⁻¹; Volume de injeção 10 uL. **Pag. 34**
- Figura 9.** Cromatograma do padrão diluído com fase móvel de pH 4 injetado na vazão de 0,8ml/min, temperaturas de 25°C, proporção de fase móvel de 30:70 v/v de ACN: Tampão de fosfato..... **Pag. 35**
- Figura 10.** Cromatograma de Pemetrexede padrão de referência (100µg/ml) adquirido através da metodologia proposta..... **Pag. 35**
- Figura 11.** Curva analítica para o Pemetrexede..... **Pag. 36**
- Figura 12.** Cromatograma da solução padrão de calibração de Idarrubicina..... **Pag. 44**
- Figura 13.** Gráfico da curva de regressão linear- Cloridrato de Idarrubicina..... **Pag. 45**
- Figura 14.** Cromatograma da solução padrão de calibração de Fludarabina..... **Pag. 49**
- Figura 15.** Gráfico da curva de regressão linear- Fludarabina..... **Pag. 50**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estimativa da INCA sobre as incidências de casos de câncer para o biênio 2016 -2017.....	Pag. 3
Tabela 2.	Classificação de antineoplásicos.....	Pag. 4
Tabela 3.	Padrões de referências Idarrubicina HCL, Fludarabina, Pemexed disodium.....	Pag. 17
Tabela 4.	Informações das amostras de Idarrubicina HCL, Fludarabina e Pemexede utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.....	Pag. 17
Tabela 5.	Condições cromatográficas de Pemexede.....	Pag. 22
Tabela 6.	As diluições para a construção da curva da avaliação da linearidade referente ao desenvolvimento do método de Pemexede.....	Pag. 23
Tabela 7.	Condições cromatográficas de Idarrubicina.....	Pag. 25
Tabela 8.	Diluições para a construção da curva de avaliação da linearidade referente a adequação do método de Idarrubicina.....	Pag. 27
Tabela 9.	Condições cromatográficas	Pag. 28
Tabela 10.	Diluições para a construção da curva de avaliação da linearidade referente a adequação do método de Fludarabina.....	Pag. 30
Tabela 11.	Repetibilidade e Precisão intermediária de Pemexede.....	Pag. 37
Tabela 12.	Avaliações do parâmetro da exatidão do método cromatográfico para determinação de Pemexede por CLAE.....	Pag. 38
Tabela 13.	Estudos de robustez.....	Pag. 39
Tabela 14.	Resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do método cromatográfico.....	Pag. 40
Tabela 15.	Respostas médias do padrão e amostras na avaliação da estabilidade.....	Pag. 40
Tabela 16.	Respostas médias do padrão de calibração na avaliação do filtro	Pag. 41
Tabela 17.	Respostas médias da amostra na avaliação do filtro.....	Pag. 41
Tabela 18.	Resultados obtidos do padrão de calibração de Idarrubicina na avaliação do filtro em diferentes condições.....	Pag. 42
Tabela 19.	Resultados obtidos da solução amostra 5mg na avaliação do filtro em diferentes condições.....	Pag. 42

Tabela 20.	Resultados obtidos da solução amostra 10mg na avaliação do filtro em diferentes condições.....	Pag. 43
Tabela 21.	Resultados obtidos da solução padrão e amostra na avaliação da estabilidade.....	Pag. 43
Tabela 22.	Resultados obtidos da solução amostra de 10mg na avaliação da estabilidade.....	Pag. 44
Tabela 23.	Resultados de Análise Estatística da Regressão Linear.....	Pag. 45
Tabela 24.	Desvio Padrão Relativo – Padrão de Calibração Idarrubicina.....	Pag. 46
Tabela 25.	Resultados da repetibilidade – Cloridrato de Idarrubicina 5mg.....	Pag. 46
Tabela 26.	Resultados da repetibilidade – Cloridrato de Idarrubicina 10mg	Pag. 47
Tabela 27.	Estabilidade da solução padrão de calibração de Fludarabina.....	Pag. 48
Tabela 28.	Resultados obtidos da solução amostra de 50mg na avaliação da estabilidade.....	Pag. 48
Tabela 29.	Resultados de Análise Estatística da Regressão Linear de Fludarabina.....	Pag. 50
Tabela 30.	Desvio Padrão Relativo – Padrão de Calibração de Fludarabina...	Pag. 51
Tabela 31.	Resultado de Recuperação – Padrão de Confirmação de Fludarabiana.....	Pag. 51
Tabela 32.	Resultado da repetibilidade – Fludarabina 50mg.....	Pag. 52

LISTA DE ABREVIACOES

Abreviatura	Significado
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Liquida de alta eficiência
FB	Farmacopeia Brasileira
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essências
USP	United states Pharmacopoeia
SUS	Sistema nico de saúde
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
INCA	Instituto de Câncer
AML	Anemia mieloide aguda
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
TS	Sintase de timidilato
FDA	Food and Drugs Administration
ACN	Acetonitrila
CLAE-UV	Cromatografia Liquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
CLL	Leucemia linfocítica crnica
DNA	cido desoxirribonucleico
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
q.s.p	Quantidade suficiente para
IDA	Idarrubicina HCL
CL	Cromatografia liquida
C18	Octadecil siliano
C8	Octil
DPR	Desvio padrão relativo
mL	Mililitros
mg	Miligramas
SE	Solução Estoque
μ g	Microgramas
μ L	Microlitro
GGMED	Gerencia-geral de medicamentos
RDC	Resolução da diretoria do

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1.	Câncer	2
2.1.1.	Dados Epidemiológicos	2
2.1.2.	Fatores de risco	3
2.1.3.	Terapêutica	4
2.2.	Pemetrexede.....	5
2.3.	Fludarabina	6
2.4.	Idarrubicina.....	8
2.5.	Exigências para o registro e venda de medicamentos no Brasil	9
2.6.	Cromatografia líquida	10
2.7.	Validação da métodos analíticos por CLAE-UV.....	12
2.7.1.1.	Especificidade e Seletividade	13
2.7.1.2.	Linearidade.....	13
2.7.1.3.	Intervalo.....	14
2.7.1.4.	Precisão	14
2.7.1.5.	Limite de Detecção e Quantificação	15
2.7.1.6.	Robustez.....	15
2.7.1.7.	Adequação de Sistema	16
3.	OBJETIVOS.....	16
3.1.	Objetivo geral	16
3.2.	Objetivos específicos:.....	16
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1.	Materiais	17
4.1.1.	Padrões de Referência e Amostras	17
4.1.2.	Reagentes e Solventes	17
4.1.3.	Soluções.....	18
4.1.3.1.	Pemetrexede.....	18
4.1.3.2.	Idarrubicina.....	19
4.1.3.3.	Fludarabina	20
4.2.	Material e Equipamentos	21
4.3.	Métodos	21

4.3.1.	Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de Pemetrexede em produto acabado.	21
4.3.1.1.	Seletividade/ Especificidade	22
4.3.1.2.	Adequação De Sistema	23
4.3.1.3.	Linearidade.....	23
4.3.1.4.	Precisão	24
4.3.1.5.	Limite de detecção e quantificação.....	24
4.3.1.6.	Exatidão	24
4.3.1.7.	Robustez.....	24
4.3.1.8.	Avaliação de filtro	24
4.3.1.9.	Estabilidade da Solução.....	25
4.3.2.	Adequação e validação de método analítico para determinação de idarrubicina	25
4.3.2.1.	Avaliação de filtro	26
4.3.2.2.	Estabilidade Da Solução	26
4.3.2.3.	Seletividade/ Especificidade	26
4.3.2.4.	Adequação De Sistema	27
4.3.2.5.	Linearidade.....	27
4.3.2.6.	Precisão	28
4.3.3.	Adequação de método analítico para determinação de fludarabina.....	28
4.3.3.1.	Estabilidade da Solução.....	28
4.3.3.2.	Seletividade/ Especificidade	29
4.3.3.3.	Adequação de Sistema	29
4.3.3.4.	Linearidade.....	30
4.3.3.5.	Precisão	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1.	Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de Pemetrexede.....	32
5.1.1.	Seletividade/ Especificidade	35
5.1.2.	Linearidade.....	36
5.1.3.	Limites de detecção e quantificação	37
5.1.4.	Precisão	37
5.1.5.	Exatidão	38
5.1.6.	Robustez.....	39

5.1.7.	Adequabilidade do sistema.....	39
5.1.8.	Estabilidade da Solução.....	40
5.1.9.	Avaliação do Filtro.....	41
5.2.	Adequação de método analítico para Idarrubicina para injetáveis.....	42
5.2.1.	Avaliação de filtro.....	42
5.2.2.	Estabilidade de solução.....	43
5.2.3.	Seletividade/ especificidade.....	44
5.2.4.	Linearidade.....	45
5.2.5.	Precisão.....	45
5.3.	Adequação de método analítico de Fludarabina para injetáveis.....	48
5.3.1.	Estabilidade da solução.....	48
5.3.2.	Seletividade/ especificidade.....	49
5.3.3.	Linearidade.....	50
5.3.4.	Precisão.....	51
6.	CONCLUSÕES.....	50
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

“Tell me and I forget. Teach me and I remember. Involve me and I learn.”

Benjamin Frankli

1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma doença não contagiosa caracterizada pela proliferação descontrolada de células capazes de invadir os tecidos e outros órgãos. Trata-se de um dos principais problemas de saúde pública, resultando em uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo (INCA, 2016; SIEGEL, 2014).

Na atualidade, o câncer ocupa o segundo lugar na classificação das causas de óbito no Brasil de acordo com a classificação bianual 2016-2017 (INCA, 2016). Neoplasias como: anemia mieloide aguda (AML), câncer de células não pequenas (NSCLC), câncer de próstata e câncer de mama, acometem milhões de pessoas no mundo todo. O aumento revela progressão estatisticamente significativa, sendo os fatores principais que levam ao seu desenvolvimento: fumo de tabaco, obesidade, exposição à radiação ultravioleta e produtos carcinogênicos (BURRELL et al., 2013; WONG et al., 2017).

A Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), que orienta a assistência farmacêutica e a política de medicamentos no Brasil (BRASIL, 2015), inclui diversos medicamentos para o tratamento do câncer, por exemplo ciclofosfamida, metotrexato, entre outros, porém, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a encarregada do registro e fiscalização de medicamentos no Brasil (BRASIL, 1999), utilizando como ferramenta principal a Farmacopeia Brasileira (FB), documento que dita normas e especificações para o controle de qualidade de medicamentos e demais ativos farmacêuticos (BRASIL, 2010). Outras Farmacopeias como a Americana (USP) são referência valiosa no caso de medicamentos sem indicação da FB. Infelizmente, não existem recomendações para a análise de Fludarabina, Idarrubicina e Pemetrexede na FB embora sejam comercializados no Brasil. Na USP, não havia recomendações para análise de Pemetrexede, mas durante o desenvolvimento desta pesquisa tem sido incorporada uma monografia sobre este fármaco.

O controle de qualidade de medicamentos comercializados é de suma importância para resguardar a saúde da população que faz uso destes. Por conseguinte, faz-se necessário o desenvolvimento, adequação e validação de metodologias analíticas para a determinação destes fármacos em medicamentos.

O presente trabalho visa o desenvolvimento e otimização de um método analítico para determinação do princípio ativo Pemetrexede, e a adequação dos métodos para determinação de Fludarabina e Idarrubicina, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), técnica analítica versátil e de amplo uso. A validação será realizada para todos os fármacos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

“Give a man a fish and you feed him for a day; teach a man to fish and you feed him for a lifetime.”

Maimonides

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer

O câncer é uma condição clínica de causas multifatoriais, distinguindo-se pela apresentação de várias neoplasias, tanto malignas quanto benignas. Apresenta-se em células de qualquer tecido do corpo (PUCKETT, CHAN, 2017).

Relaciona-se com frequência à instabilidade genômica e as alterações epigenéticas que ocorrem com a exposição aos diversos fatores como: produtos carcinogênicos, infecções por alguns tipos de vírus oncogênicos, tabagismo e envelhecimento (IARC, 2016). Sendo o último fator, contribuinte para o aumento do número de mutações, cujo acúmulo provoca danos ao DNA e conseqüentemente ocasiona transformação das células saudáveis em cancerosas diante da falha ou ausência de meios de reparo e proliferação celular. (WHITE et al., 2014).

A classificação do câncer se dá devido à célula de origem, mas não pelos órgãos ou tecidos em que se espalhou. Esta nomenclatura é classificada como primária (INCA, 2017)

Os tipos de câncer podem ser inseridos nos grupos carregando o sufixo *-oma*, cuja tradução literal é tumor (MURAD, KATZ, 1996), alguns exemplos desses grupos são os carcinomas, sarcomas, linfomas e mielomas.

2.1.1. Dados Epidemiológicos

Estima-se cerca de 14,1 milhões de incidências de novos casos de câncer, com aproximadamente 6,2 milhões de mortes em 2012 registrada no mundo. A principal causa do aumento dos casos, apontada pelo instituto de pesquisa sobre câncer, é o envelhecimento da população (IARC 2015; IARC, 2016).

Hoje, o câncer ocupa o segundo lugar dentre as causas de morte no país, estima-se que para o biênio 2016-2017, há possibilidade de 600 mil casos novos (INCA, 2017). Dentro da estimativa são cerca de 61 mil casos novos de câncer de próstata em homens e quase 58 mil novos casos de câncer de mama em mulheres, representando 28,6% e 28,1% respectivamente dentre as incidências de câncer para cada sexo, por ano, além de 10 mil casos novos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão. Na tabela 1 podem ser observadas diversas estimativas para a incidência de câncer.

Devido à natureza silenciosa do câncer, a falta de cuidado e meios simples de diagnóstico, o seu desenvolvimento só é perceptível no estágio avançado na maioria dos casos.

Tabela 1: Estimativa sobre incidências de casos de câncer para o biênio 2016 -2017 (INCA)

Homens			Mulheres		
Localização primária	Novos Casos	%	Localização primária	Novos Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama feminina	57.960	28,1%
Traquéia, brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.680	7,8%	Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traquéia, brônquio e pulmões	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula tireóide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: Dados obtidos do Instituto Nacional de Câncer 2016.

2.1.2. Fatores de risco

Existem vários fatores de risco ligados ao desenvolvimento de câncer, tais como: envelhecimento, exposição à radiação UV, consumo de alguns tipos de alimentos, além de substâncias cancerígenas, por exemplo tabaco. Outros fatores que também contribuem para a incidência do câncer é a obesidade, características reprodutivas, hábitos de vida, históricos familiares, fatores ambientais e genéticos (BURRELL et al., 2013; WONG et al., 2017).

Alguns estudos mostraram que houve um aumento da incidência de câncer em pacientes com níveis de gordura acima do normal (LIGIBEL et al., 2017). O tecido adiposo influencia no metabolismo lipídico e na regulação do equilíbrio energético dos outros tecidos por meio da liberação de hormônios peptídicos como Leptina (CALLE, KAAKS, 2004; LIGIBEL et al., 2017)

O envelhecimento aumenta o risco de desenvolver cânceres pelo acúmulo de mutações e danos ao DNA, além da falha nos meios de reparo celulares (WHITE et al., 2014).

2.1.3. Terapêutica

A terapia administrada para os diferentes tipos de câncer tem uma relação com o estágio e a especificidade das neoplasias apresentadas por cada paciente. Em geral, envolve a quimioterapia, como adjuvante ou neoadjuvante; efetuada antes ou depois da cirurgia. Com a finalidade de garantir a qualidade de vida dos pacientes, a quimioterapia paliativa é administrada para controle da carga tumoral. Pode haver ainda, o emprego da radioterapia em conjunto com a quimioterapia (DELANEY, JACOB, 2005).

A cirurgia leva a retirada dos tumores com eficácia; na ausência de metástase. Em alguns casos, como por exemplo a leucemia; há o emprego de outros tipos de terapias, podendo envolver a reposição de medula (KATZ, 1996; PUCKETT, CHAN, 2017).

São observados alguns critérios na escolha dos medicamentos utilizados, visando a melhor via de administração, embora prevaleça a via endovenosa, pois confere segurança e tolerabilidade diante do custo/benefício que favorecem o paciente. Durante quimioterapia, utiliza-se medicamentos de várias classes disponíveis para o tratamento de câncer, podendo ser utilizados à medida que preservam as indicações e contraindicações (INCA, 2016). Uma classificação usual dos antineoplásicos e alguns exemplos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos Antineoplásicos

Classes	Exemplos
Agentes alquilantes	Mostarda nitrogenada e derivados (mecloretamina ciclofosfamida, clorambucil), etilenamina, epóxidos (dibromomanitol, dibromocitrol), alquil sifonatos (bussulfan), nitrosouréias (carmustine, lomustine, streptomizicín), diaquiritriazenas (dacarbazina), streptozocina, ifosfamida, melfalan, cisplatina, estramustina, melfalano, tiopeda, semustina, dacarbazina, carboplatina.
Agentes antimetabólicos	Metotrexato, análogos da pirimidina (5-fluorouracil, citosin-arabinosídeo).
Antibióticos antitumorais	Antacíclicos (doxorubicina, daunoblastina, epirubicina, idarubicina), bleomicina, mitomicina, mitoxotrona.
Plantas alcaloides	Vincristina e vimblastina, paclitaxel, teniposídeo e etoposídeo
Compostos de platina	carboplatina, cisplatina, oxaliplatina

Fonte: Adaptado do Protocolo de administração de quimioterápicos antineoplásicos da EBSEH

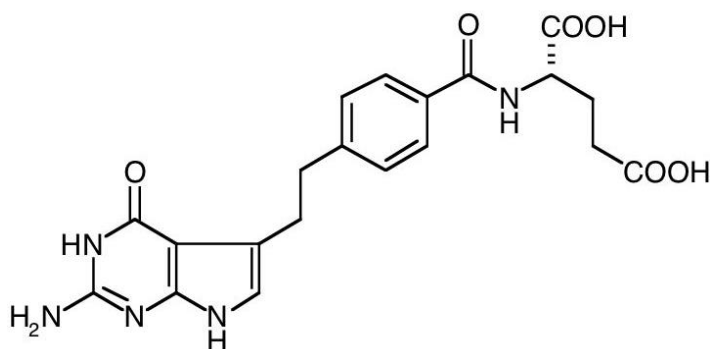
Há vários mecanismos pelos quais as células saudáveis transformam-se em malignas, por isso, é indispensável a compreensão dos mecanismos e a etiologia do câncer para melhor tratá-lo. (HAHN, 2002; KIM & ALGAN, 2017).

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento contra câncer, atuam inibindo a proliferação celular pela sua interferência em uma das fases do ciclo celular (PUCKETT, CHAN, 2017).

2.2. Pemetrexede

O pemetrexede é um agente antineoplásico multialvo, antifolato, que interfere nos processos metabólicos dependentes de folato necessários para a replicação celular. O medicamento é indicado para o uso como agente único em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) após um tratamento prévio associado com cisplatina para mesotelioma pleural maligno não tratável por cirurgia (TAKEZAWA et al., 2011). Seus derivados tri e penta glutamato, demonstram uma significativa atividade inibitória para múltiplos sistemas. A inibição da síntese de timidilato (TS) é o seu mecanismo de ação primária. (WILSON et al., 2014).

Figura 1. Estrutura química de Pemetrexede Disódico. Nome IUPAC: N-[4-[2-(2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-1H-pyrrolo[2,3-d] pyrimidin-5-yl) ethyl]benzoyl]-L-glutamic acid disodium.



O Food and Drugs Administration (FDA) aprovou Pemetrexede em 2009 para manutenção do tratamento em pacientes que possuem metástase local avançada de NSCLC, onde a doença não progrediu após 4 ciclos de tratamento quimioterápico com agentes de primeira linha; derivados de Platinum. Adicionalmente, o efeito terapêutico de Pemetrexede

está sendo testado em 132 estudos clínicos para o tratamento de vários tumores sólidos, incluindo câncer de mama, câncer de cabeça, gástrico e de pescoço (COHEN et al., 2010.).

A produção de medicamentos é um processo amplo e multidisciplinar, que aborda desde a produção do princípio ativo à sua formulação, resulta importante o uso de metodologias analíticas adequadas para o controle de qualidade na determinação tanto do princípio ativo, quanto de seus produtos de degradação (conhecidos ou não). Isso facilita o ajuste da dose individual através do monitoramento da ação terapêutica dos fármacos (NOVÁKOVÁ, SANTÍNSKÝ, SOLICH, 2008).

Cinco métodos empregando Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para determinação de Pemetrexede em formulações farmacêuticas acabadas foram encontrados na literatura entre 2005 e 2017. Dois estudos utilizaram colunas de fase estacionária C18 com eluição em modo isocrático e fase móvel composta por acetonitrila (ACN) e ácido fosfórico.

O primeiro estudo determina Pemetrexede em produto acabado, empregando a proporção de 65:35 de solução tampão fosfato pH3.0 e acetonitrila como Fase Móvel em modo isocrático (AGRAWAL, 2013).

Outro trabalho utiliza CLAE-UV em fase reversa para a determinação de Pemetrexede em sua formulação farmacêutica acabada, com coluna C18 com fase móvel composta por ACN e tampão pH 4. Os limites de detecção e de quantificação estimados foram $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,085 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente (BANU, 2010).

Foi constatada a estabilidade química por 2 dias à temperatura ambiente e de 31 dias em refrigeração após a avaliação da estabilidade de Pemetrexede em bolsas de infusão por meio CLAE, com o intuito de determinar a segurança e o comportamento do ativo na presença de cloreto de polivinila (ZHANG & TRISSEL, 2006). Outro estudo dos mesmos autores empregando CLAE avaliou a estabilidade química de soluções de Pemetrexede contidas em seringas plásticas, (ZHANG & TRISSEL, 2005).

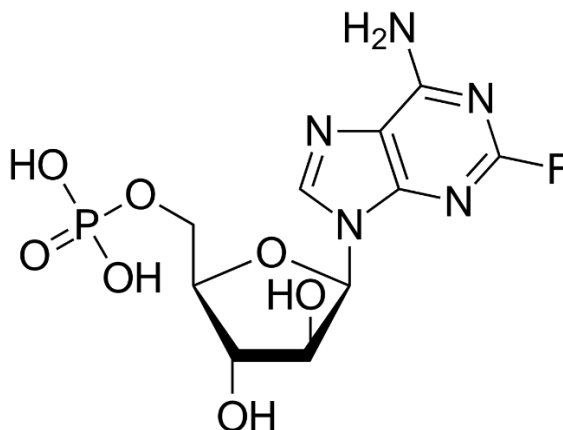
Por fim, o último método descreveu a determinação e quantificação de compostos relacionados com potencial ação genotóxica em produto acabado de Pemetrexede utilizando CLAE –UV (WADEKAR et al., 2014).

2.3. Fludarabina

A fludarabina (9- β -D-arabino-furanosyl-2-fluoradenine) é um análogo de adenosina, eficaz no tratamento de malignidades hematológicas (TSIMBERIDOU, et al, 2009), como

linfoma não Hodgkin, leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfocítica crônica (CLL) de células B refratárias (BULGAR et al., 2010). A forma de monofosfato (9-β-D-arabino-furanosyl-2- fluoradenine monophosphate) do fármaco é aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para uso no tratamento clínico, devido a sua solubilidade melhorada e consequente biodisponibilidade em meio aquoso. Levando em consideração que as propriedades farmacológicas do fármaco foram intensamente estudadas (GANDHI & PLUNKETT, 2002; CARNEY et al.,2010).

Figura. 2. Estrutura química de fosfato de fludarabina, Nome IUPAC: [(2R,3S,4S,5R) -5-(6-amino-2-fluoropurin-9-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methyl dihydrogen phosphate.



O mecanismo de ação de Fludarabina proposto começa com a desfosforilação do ativo pela fosfatase no soro sangue em Fludarabina (9-β-D-arabino-furanosyl-2-fluoradenine) em pouco tempo, após a administração por via intravenosa. Depois, o fármaco desfosforilado pode ser transportado para dentro das células através do transportador de membrana específico de nucleósido. Após a sua absorção, a Fludarabina é refosforilada pela desoxicitidina quinase para Fludarabina monofosfato. Após ativação, atua inibindo múltiplas enzimas envolvidas na síntese de DNA, sendo aceita no geral, como limitador da cadeia de DNA. Estudos recentes sugerem que a Fludarabina pode ser inserido no meio do DNA (KAMIYA, HUANG, PLUNKETT, 1996).

Foi encontrado um método para determinação de Fludarabina por CLAE, utilizando uma coluna C18 nas especificações 250 x 4.6mm, 5μm, a temperatura ambiente. Com fase móvel composta por metanol: acetonitrila: tampão de Fosfato nas proporções 50:20:30(v/v)

por detecção UV no comprimento de onda 265 nm e com tempo de retenção de 5,97 min (LAKSHMI, KRISHNA, JAYAVEERA, 2014)

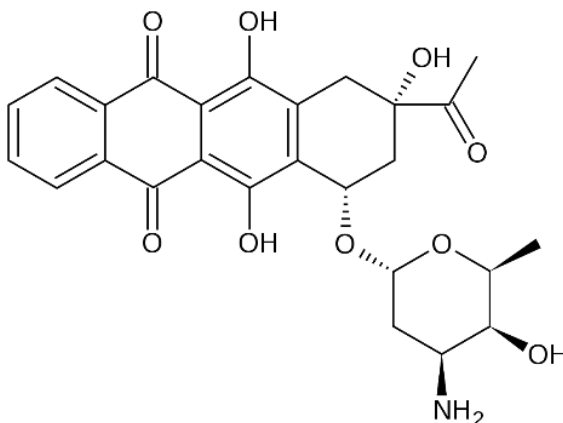
Um método é descrito para a quantificação simultânea de idelalisib, Fludarabina e lenalidomide em plasma de ratos empregando coluna C18 em fase reversa em LC-MS (VEERARAGHAVAN et al, 2014).

A fludarabina possui um método para determina-lo na USP utilizando HPLC, uma coluna C18 de 150mm X 4,6 X 5µ em comprimento de onde de 260 nm e fase móvel composta por uma solução 10 mM de fosfato monobásico de potássio:metanol (470:30) (USP 39, 2015).

2.4. Idarrubicina

A Idarrubicina é um derivado de daunorrubicina (WEISS, 1992), empregado frequentemente no tratamento de doenças hematológicas malignas, bem como outras antraciclinas aprovadas pelo FDA em 1990.

Figura.3. Estrutura química de Idarrubicina HCL. Nome IUPAC: (7S,9S) -9-acetyl-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methylxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12 dione; hydrochloride.



Exerce sua ação por intercalação com o DNA, inibindo topoisomerase II (BULGAR et al, 1984; WANG et al., 2013). Entre os antineoplásicos mais utilizados no tratamento de câncer/neoplasias, a família de antraciclinas contribui com o maior número de compostos em uso clínico para o tratamento de uma ampla variedade de tumores. A ação citotóxica foi potencializada pelo aumento da lipofilicidade devido alteração da molécula. A eliminação do grupo metoxi do anel 4 do anglicano resultou também em melhor perfil toxicológico (MENNA, SALVATORELLI E, 2008).

Como outros agentes quimioterápicos, a Idarrubicina induz alguns efeitos adversos. Comumente, se manifestam por fadiga, náusea e vômitos. Porém, as principais toxicidades de Idarrubicina, bem como a sua família de origem, é a cardiotoxicidade irreversível desenvolvida pelos pacientes após o tratamento com doses elevadas ou com doses baixas durante um longo período. Dessa forma, existe a necessidade de desenvolver metodologias para a sua determinação e quantificação em líofilos e no plasma, com o intuito de garantir a quantidade ideal do fármaco a ser envasado e administrado, de forma a garantir o efeito terapêutico desejado.

Em 2002 foi publicado um método para determinação de cloridrato de idarrubicina e seu produto de degradação por CLAE em coluna C18, e fase móvel composta por solução fosfato de potássio, tetrahidrofurano 70:30 e 1000ml de solução contendo 1,44g dodecil sulfato de sódio, ácido fosfórico e 1mL N, N-dimetiltilamina a 254 nm de comprimento de onda. (YANG, GUO, 2002)

A quantificação simultânea de Idarrubicina, epirubicina, doxorubicina entre outros no plasma e urina de ratos foi descrita em 2009 empregando HPLC em eluição por gradiente com detecção na região de 480 – 555 nm (MAUDENS et al, 2009).

Embora a literatura traga diferentes métodos para determinação de Fludarabina e Idarrubicina injetáveis, já, com o intuito de cumprir as exigências determinadas pela ANVISA, priorizou-se os métodos de análises vigentes publicados em compêndio oficial - USP 39.

2.5. Exigências para o registro e venda de medicamentos no Brasil

O registro de medicamentos no Brasil é atribuição da Gerência Geral de Medicamentos (GGMED) uma subdivisão da ANVISA, que utiliza as legislações vigentes como ferramentas para obtenção do registro de todos os medicamentos novos, genéricos e similares em suas formas farmacêuticas. Atualmente, aplica-se a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014, em vigor desde novembro de 2015, e demais legislações complementares ao processo de registro.

A RDC nº 39 de 2013, dispõe da concessão de Certificado de Boas Práticas de Fabricação, Distribuição e/ou Armazenamento, que é pré-requisito para então garantir a segurança e a qualidade dos medicamentos. O certificado fornecido é válido para um grupo de produtos e forma farmacêutica segundo a RE 124/2004. Além dos documentos para importação de medicamentos, exigidos pela RDC 60/2014, as empresas solicitantes também

devem possuir Autorização de Funcionamento e outros documentos que são solicitados pela Agência Reguladora (BRASIL, 2010).

Para reforçar ainda mais a garantia da qualidade de medicamentos que são importados, foi publicada a resolução RDC nº 10 de 2011. Diante disso, tornou-se obrigatório às importadoras possuir laboratório próprio para realizar os ensaios de controle de qualidade dos medicamentos (BRASIL, 2010).

Adicionalmente, foi publicada recentemente a RCD nº 166 de 2017, esta resolução dispõe sobre a validação de métodos analíticos, excluindo-se os que são microbiológicos. Portanto, a validação deve produzir resultados confiáveis e adequados ao que se pretende alcançar. Os métodos que não estão descritos em compêndios oficiais devem seguir os critérios que estão estabelecidos nessa resolução (BRASIL, 2017).

2.6. Cromatografia líquida

Dentre as técnicas empregadas na determinação quantitativa e qualitativa de princípios ativos de fármacos nas formulações farmacêuticas disponíveis, pode-se destacar a cromatografia líquida, técnica bastante difundida e consolidada na atualidade. A técnica é uma separação por meio de uma fase líquida (móvel) e uma fase estacionária (coluna cromatográfica) baseando-se na separação de componentes nas duas fases e eluindo sob pressão (SCHLUTER, 1999). A escolha da fase estacionária delimita os mecanismos de separação, tais como a adsorção e troca iônica, pelas quais as separações são alcançadas (BRASIL, 2010).

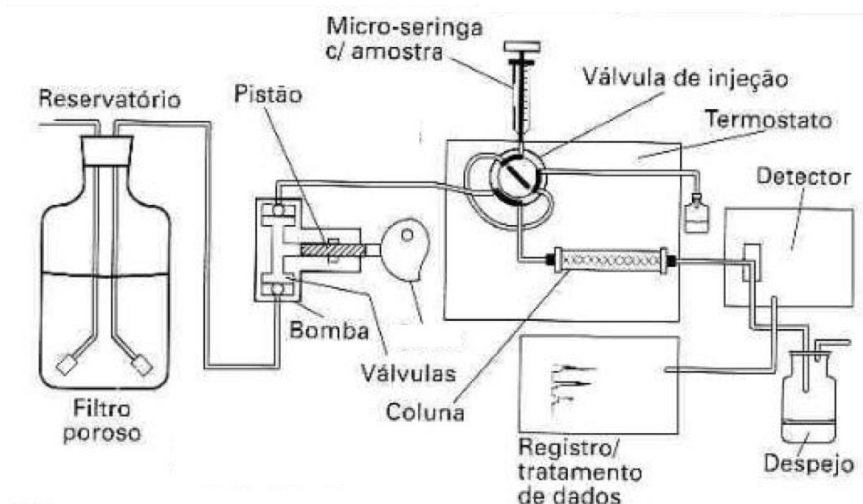
Um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência em geral tem as seguintes partes: recipiente de solventes, linhas de transferência, coluna, injetor de amostras, bombas de alta pressão, detectores e software para processamento de dados (MEYER, 2004), a figura 4 apresenta um esquema de um equipamento típico.

A CLAE é uma evolução da Cromatografia líquida (CL), na qual utiliza solventes líquidos com fase móvel e colunas preenchidas com partículas menores, eluídos sob pressão (FEKETE, 2012; MEYER, 2010).

No intuito de garantir resultados mais precisos e com alta reprodutibilidade, os solventes que compõe a fase móvel devem possuir elevado grau de pureza, viscosidade moderada, solubilidade alta, não serem corrosivos e moderada acidez e alcalinidade (MERCK, 2012).

A fase móvel deve ser capaz de solubilizar a amostra sem provocar a degradação, permitindo o seu transporte pela coluna e sem alteração nos componentes do analito. Deve-se usar a fase móvel ou um dos seus constituintes no preparo da amostra evitando a precipitação do analito, tanto no injetor, quanto na coluna, preservando a resolução das separações (SKOOG, 2006).

Figura 4. Esquema de um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência



Adaptado de Autor, Conselho Regional de Química da IV Região (SP), 2010.

Desta forma, sabemos que a fase móvel exerce maior influência em relação a retenção e a separação dos analitos, pela sua interação tanto com a amostra quanto com a fase estacionária da coluna. Assim, a sua composição contribui de forma decisiva no desenvolvimento de qualquer metodologia (MBUNA et al, 2015).

Há dois tipos de cromatografia por partição que se distinguem através da polaridade dos solventes e a fase estacionária da coluna. Na cromatografia líquida, onde a fase estacionária é composta por partículas mais polares, enquanto o solvente da fase móvel é apolar, consideramos como Fase normal (CLAE-FN). Por outro lado, a cromatografia em fase reversa (CLAE-FR) se refere a polaridades invertidas (SKOOG, 2006; FEKETE, 2012). A separação dos componentes neste mecanismo depende da sua hidrofobicidade. Compostos hidrofílicos são retidos por menos tempo em comparação aos hidrofóbicos. Assim, o fator de retenção aumenta em relação ao tempo que um componente permanece retido na coluna, conseqüentemente são eluídos e separados em tempos diferentes (SKOOG, 2006; SCHLUTER, 1999). Este último, utiliza solventes mais fortes por serem mais apolares,

portanto a fase móvel possuindo solventes orgânicos em maior quantidade é considerada forte na CLAE-FR. Com esse raciocínio, o tempo de retenção aumenta à medida em que há um aumento da proporção de água presente na fase móvel (MEYER, 2010).

As partículas da fase estacionária da cromatografia em fase reversa formam um esqueleto de sílica no qual estão unidos por meio de ligações covalentes grupos alquil. Separações em fase reversa são realizadas com mais frequência devido a facilidade de preparação da fase móvel, assim como estabilidade e também pela melhor identificação de compostos semelhantes entre si (MEYER, 2004).

Estima-se que mais da metade das separações de medicamentos são realizadas na indústria farmacêutica se dar por meio da cromatografia em fase reversa na atualidade, com o emprego das colunas octil (C8) e octadecil siliano (C18) com partículas de preenchimento de 3 e 10µm (KEITH, 2007).

O analito é identificado como picos (sinais) por meio de detectores e sua variação depende da natureza do analito em teste. O detector UV é o mais utilizado, por ser barato, versátil e também, porque a maioria dos compostos orgânicos absorvem a radiação na região ultravioleta (MERCK, 2012).

A versatilidade da cromatografia líquida, a torna a técnica mais utilizadas na rotina de indústrias ambientais, biológicas e farmacêuticas (SKOOG, 2006). Nas indústrias farmacêuticas a CLAE é empregada no desenvolvimento de novos métodos no controle de qualidade de produtos acabados e na pesquisa (JUNDERA, 2015).

O desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, sem afetar a performance da cromatografia e proporcionando diminuição do tempo de análise, mediante o uso de coluna de menor comprimento e partículas menores, é uma nova técnica chamada cromatografia líquida de ultra eficiência, resultado da evolução cromatográfica exigindo, no entanto, maior pressão de trabalho e por tanto bombas muito potentes (HEBA, 2015).

2.7. Validação da métodos analíticos por CLAE-UV.

Com o término do desenvolvimento de uma metodologia analítica, a implementação da mesma compreende um procedimento que avalie e comprove a sua eficiência para uso em análises de rotina. Por isso, é indispensável a realização da validação, que envolve a avaliação da eficiência de um procedimento, equipamento ou método por desenhos estatísticos para todas as condições de trabalho estabelecidos (RIBANI et al., 2004).

A validação de métodos analíticos baseia-se nas orientações da RE no 899 de 29 de maio de 2003 e no RDC 166 de 2017, através dos parâmetros de i) especificidade e seletividade; ii) Linearidade; iii) intervalo ou faixa de quantificação do método analítico; iv) Exatidão v) Precisão; vi) limite de quantificação (LQ); e vii) limite de detecção (LD); viii) Robustez, em concordância com as recomendações das instituições nacionais (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003) e internacionais (ICH,2005; FDA, 1994) e a da comunidade científica (GREEN,1996; RIBANI et al., 2004).

2.7.1.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como: fase móvel, diluente e componentes da matriz. De acordo com a Resolução RE nº 899, de 29/05/2003, em métodos cromatográficos deve-se garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente, por isso, a avaliação da seletividade deve ser o primeiro item medido e assegurado durante o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica (USP 39; IMETRO, 2010; BRASIL,2003).

2.7.1.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A determinação empírica da relação da concentração ou massa da amostra e o sinal (usualmente área) é obrigatória. Essa relação matemática transforma-se em uma equação de reta, conhecida como a curva de analítica. A Resolução RE nº 899 recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. No final os resultados são tratados estatisticamente por modelo matemático; no caso a regressão linear, dada pela equação:

$$Y = mx + b$$

Onde a concentração da amostra (x), o sinal analítico (Y), Coeficiente linear (b), o coeficiente angular (m). Podemos determinar o coeficiente de correlação (r^2) e adicionalmente é calculado o desvio padrão relativo das áreas (DPR).

A qualidade da curva adquirida é averiguada pelo coeficiente de correlação. Quando a dispersão dos conjuntos dos pontos é menor, a incerteza dos coeficientes medidos tende a ser menor pela aproximação do valor do R^2 a 1,0. O critério mínimo permitido para o coeficiente de correlação recomendado é de 0,99. No entanto, quando há uma relação linear, deve ser realizado o tratamento estatístico adequado para descrever um critério que gera uma resposta analítica com relação direta com a concentração contida na amostra (IMETRO, 2010; BRASIL,2003; ICH, 2005).

2.7.1.3. Intervalo

O intervalo apontado é determinado dentre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. O limite inferior é definido através do limite de quantificação, e o limite superior pela resposta do equipamento. No geral, o intervalo escolhido é originado do estudo da linearidade, estabelecido pela confirmação de que o método desenvolvido apresenta exatidão, precisão e linearidade admissíveis quando aplicado ao analito dentro da faixa especificada (BRASIL,2003; IMETRO,2003).

A RE N°899 de 2003 indica que para a determinação quantitativa de um analito em formas farmacêuticas o intervalo deve ser de 80 a 120% da concentração teórica do teste (BRASIL,2003), ou seja, da concentração esperada na forma farmacêutica.

2.7.1.4. Precisão

O parâmetro precisão caracteriza o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos, aplicando-se o método repetidamente a múltiplas amostragens de um produto homogêneo. Retrata a distribuição dos resultados entre testes independentes repetidos da mesma amostra. A precisão é subdividida em três grupos: repetibilidade, precisão intermediária e a reprodutibilidade (INMETRO, 2015)

Repetibilidade refere-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Segundo a Resolução RE n° 899, a Repetibilidade do método pode ser verificada através de, no mínimo, seis determinações a 100 % da concentração do teste. Ela é aferida estatisticamente por meio da estimativa do desvio padrão relativo, não admitindo valores superiores a 5% (USP 39, 2016).

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a

determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes (ICH, 2005).

A reprodutibilidade é avaliada através dos testes realizados em laboratórios diferentes. Em geral, emprega-se na padronização de metodologias analíticas que serão inclusas em compêndios oficiais (BRASIL, 2003).

2.7.1.5. Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção é a quantidade mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado. Esse limite é averiguado através de uma solução com concentração experimental conhecida e decrescente a um nível mínimo detectável. Por outro lado, a detecção pode ser feita visualmente quando se refere a métodos qualitativos (BRASIL 2003).

$$LD: \frac{3,3 \alpha}{IC}$$

IC

Onde α = coeficiente linear

IC = coeficiente angular

Limite de Quantificação é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Em geral, ele é expressado em concentrações do analito em cada amostra (p/v, p/p, p/m). Este parâmetro é aplicado a testes de quantificação de produtos de degradação de medicamentos ou produtos farmacêuticos. O mesmo, pode ser verificado através da relação sinal/ruído do desvio padrão ou por métodos estatísticos como mostra a equação abaixo (USP 39, 2016; INMETRO, 2010).

$$LQ: \frac{10\alpha}{IC}$$

IC

Onde α = coeficiente linear

IC = coeficiente angular

2.7.1.6. Robustez

Este parâmetro se relaciona a capacidade de reprodução de um método analítico após variações mínimas das condições experimentais como alterações no pH e proporção da fase móvel, temperatura, marca de coluna, entre outros (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

2.7.1.7. Adequação de Sistema

Envolve a avaliação da resolução e reprodutibilidade da metodologia analítica através de parâmetros, no caso dos métodos cromatográficos: fator de cauda, fator de capacidade (k), número de pratos teóricos (N), resolução, desvio padrão relativo (DPR), fator de simetria (α) e fator de resolução (R).

3. OBJETIVOS

"Look deep into nature, and then you will understand everything better."

Albert Einstein

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação de fármacos oncológicos em medicamentos líofílos injetáveis, empregando cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2. Objetivos específicos:

- Desenvolver um método analítico para a determinação de Pemetrexede, ainda inédito na farmacopeia brasileira, em medicamentos genéricos, empregando cromatografia líquida de alta eficiência.
- Realizar a validação da metodologia desenvolvida para a determinação de Pemetrexede em medicamentos.
- Adequar as metodologias analíticas, presentes na farmacopeia Americana, para a determinação de Idarrubicina em medicamentos genéricos empregando cromatografia líquida de alta eficiência.
- Adequar as metodologias analíticas, presentes na farmacopeia Americana, para a determinação de Fludarabina em medicamentos genéricos empregando cromatografia líquida de alta eficiência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

“If they give you ruled paper, write the other way.”

Juan Ramon Jimenez

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Todos os reagentes e amostras utilizados neste projeto foram gentilmente cedidos pela empresa CHEMICALTECH.

4.1.1. Padrões de Referência e Amostras

A tabela 3 abaixo possui as informações referentes aos padrões analíticos utilizados no trabalho.

Tabela 3. Padrões de referências Idarrubicina HCL, Fludarabina, Pemexed disodium.

Padrão de Referência	Teor	Lote	Fabricante
Idarrubicina HCL	97.3%	J0L467	USP
Fludarabina	99,6%	H0K220	USP
Pemetrexed disódico	78.3%	F042E0	USP

A Tabela 4. Apresenta as informações das amostras (produto acabado), utilizados no presente trabalho.

Tabela 4. Informações das amostras de Idarrubicina HCL, Fludarabina e Pemetrexede utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Amostra	Concentração declarado	Lote	Data de Validade
Idarrubicina HCL	5 e 10mg	150307/140906	31/03/2017, 30/09/2016
Chemifludar	50mg	150617	30/06/2018
Peymetrel	500mg	141006	10/2016

4.1.2. Reagentes e Solventes

Foram utilizados os seguintes reagentes nos ensaios de adequação dos métodos, desenvolvimento e validação do método:

- Ácido clorídrico (Merck)
- Água Ultrapura (J.T. BAKER)
- Metanol (J.T. BAKER)

- Acetonitrila (J.T. BAKER)
- Ácido fosfórico (Sigma Aldrich)
- Lauril sulfato de sódio (Merck)
- Tetrahidrofurano (J.T. BAKER)
- Hidróxido de sódio (Sigma Aldrich)
- Fosfato monobásico de potássio (Sigma Aldrich)
- Fosfato monobásico de sódio (Merck)
- Ácido octano sulfônico de sódio (Merck)

4.1.3. Soluções

4.1.3.1. Pemetrexede

- Preparo do Solução estoque de Pemetrexede

Pesou-se 35,1 mg na balança analítica, pemetrexede padrão de referência equivalente ao 27,7 mg de pemetrexede que foi transferido para o balão volumétrico de 25 mL. Neste balão, acrescentou-se 16 mL de diluente (preparado nas seguintes proporções: Acetonitrila: Tampão de fosfato monobásico de sódio em 800 mL de água ultrapura, ajustando o pH para 4 e a proporção final de 30:70 v/v). A solução foi levada para o banho de ultrassom até completa solubilização. O volume final foi completado com o mesmo diluente seguido de homogeneização. Transferiu-se 2,0 mL para um balão volumétrico de 20 mL, completando o volume com o mesmo diluente seguindo de homogeneização e filtração em membrana de Nylon de 0,22 µm, descartando os primeiros mililitros de cada filtrado. Concentração aproximada: 100 µg/ mL de Pemetrexede.

- Preparo das amostras de Pemetrexede

Foram separadas 2 unidades de Pemetrexede 500 mg, das quais foram retiradas os selos e etiquetas. Os frascos foram identificados e pesados. Em seguida, o conteúdo foi reconstituído com 20 mL de água ultra purificada e transferido quantitativamente o conteúdo dos 2 frascos para um balão volumétrico de 200 mL, completando o volume com água ultra purificada. Dessa solução, foram transferidos 2,0 mL para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume novamente com diluente seguido de homogeneização. Os frascos foram levados à estufa em temperatura de 100°C a 105°C por 1 hora. Após esfriar em dessecador, foi realizado o cálculo do pó liofilizado transferido por diferença de peso. Filtrou-

se a solução em membrana de Nylon de 0,22 μm e descartou-se os primeiros mililitros de cada filtrado. Concentração aproximada: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pemetrexede.

- Preparo do placebo

Pesou-se analiticamente 500 mg do placebo (manitol) que é o excipiente do medicamento e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água ultra purificada. Em seguida, transferiu-se 2,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL, completando novamente o volume com diluente seguido de homogeneização e filtração em membrana de nylon de 0,22 μm . Foram descartados os primeiros mililitros de cada filtrado.

4.1.3.2. Idarrubicina

- Preparo da solução estoque de Idarrubicina

Pesou-se 10 mg de cloridrato de Idarrubicina padrão de referência transferindo-a para o balão volumétrico de 20 mL. A este balão, adicionou-se 16 mL de diluente (preparado nas seguintes proporções: Água: Acetonitrila: Metanol: Acido fosfórico, 540:290:170:2, v/v) levando-o para o banho de ultrassom até completa solubilização. O volume foi completado com o mesmo diluente, seguido de homogeneização. Obteve-se a concentração aproximada de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Preparo a solução de resolução de Idarrubicina

Pesou-se analiticamente 10 mg de cloridrato de Idarrubicina padrão de referência que foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se ao balão contendo o padrão, 8 mL de água ultrapura submetendo-o ao banho de ultrassom até completa solubilização. O volume foi completado com água ultrapura após esse processo.

Transferiu-se 2 mL dessa solução para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 20 μl de ácido clorídrico concentrado, seguido de aquecimento em banho de óleo a 95° C por aproximadamente 8 minutos. Após atingir temperatura ambiente, 1,0 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Utilizou-se diluente para completar o volume. Esta solução de resolução contém uma mistura de 4-demethoxydaunorubicinona e Idarrubicina.

- Preparo das amostras de Idarrubicina

Foram separados dois frascos do medicamento IDA[®] (cloridrato de idarrubicina), um para cada apresentação, transferindo o conteúdo (equivalente a 5 mg/ 10 mg de IDA) para um balão volumétrico de 10 mL (apresentação de 5mg) e balão volumétrico de 20 mL (apresentação de 10 mg). Adicionou-se 8 mL do diluente ao balão para que fosse levado ao ultrassom até a completa solubilização. Em seguida, o volume foi completado com o diluente.

4.1.3.3. Fludarabina

- Solução de fosfato monobásico de potássio 10 mM

Pesou-se exatamente 0,6805 g de fosfato monobásico de potássio que foi adicionado a recipiente adequado e dissolvido com 200 mL de água qualidade HPLC completando o volume com até 500 mL do mesmo solvente.

- Fase móvel

Solução 10 mM de fosfato monobásico de potássio: metanol (470:30) filtrada e degaseificada.

- Preparo do Solução estoque de Fludarabina

Em um balão volumétrico de 25 mL, pesou-se exatamente 25 mg de fosfato de Fludarabina padrão de referência. O volume foi completado com a fase móvel, homogeneizando-o até completa dissolução. Foram transferidos, 2 mL da solução para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com a fase móvel, homogeneizando novamente. Concentração aproximada final 0,02mg/mL.

- Preparo das amostras de Fludarabina

O conteúdo dos 5 frascos reconstituídos com a fase móvel foram transferidos qualitativamente para um balão volumétrico de 250 mL, ao qual também foi acrescentado fase móvel para completar o volume, seguido de homogeneização. Concentração aproximada final 1,0 mg/ mL.

Transferiu-se 2 mL dessa solução para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com a fase móvel e homogeneizando a mistura. Concentração aproximada 0,02 mg/ mL de fosfato de Fludarabina.

4.2. Material e Equipamentos

O desenvolvimento da parte experimental deste trabalho foi realizado no laboratório de controle de qualidade de medicamentos oncológicos da empresa CHEMICALTECH que possui os seguintes equipamentos:

- Balança analítica shimadzu aux. 220 volts
- Cromatógrafo Rigol L3000 equipado com detector UV
- Cromatógrafo Agilent 1100, equipado com detector DAD
- Banho de ultrassom Elma S 120
- PHmetro de bancada digital H2221 Hanna
- Cabine de segurança classe IIB Veco
- Develosil 5 μ , TMS-UG 140A (250x4,6mm)
- Hypersil BDS C8(250x4,6mm; 5 μ ,) Thermos®
- RP 18(L1), 150MM X 4,6, 5 μ , Phenomenex®
- Filtro PVDF 0,22 μ m
- Filtro PVDF 0,45 μ m
- Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)

Todas as análises de seletividade foram realizadas no Cromatógrafo da Agilent equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) modelo G1315A, obtendo espectros no intervalo de 200 a 400nm, todas as áreas picos foram integrados e os demais parâmetros de cromatografia calculados através do software Openlab.

Os demais parâmetros foram analisados no Cromatógrafo Rigol equipado com um detector UV-VIS modelo L3500 e sistemas de bombas quaternária L3240. Todas as áreas foram integradas e demais parâmetros da cromatografia calculados pelo do software Clarity.

4.3. Métodos

4.3.1. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de Pemetrexede em produto acabado.

Foram testadas diversas condições de vazão, volume de injeção, proporção solvente solução aquosa na fase móvel, considerando eluição isocrática. As condições de trabalho são sumarizadas na tabela a seguir:

Tabela 5: Condições cromatográficas de Pemetrexede

Parâmetro	Condição
Coluna	Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) – P/N 00G-4252-E0
Detecção	UV 254 nm – largura de banda 4 nm
Vazão	0,8mL/min
Modo	Isocrático
Fase móvel	Solvente ACN: Tampão de fosfato (30:70)
Volume de Injeção	10 µL
Temperatura da coluna	25 °C
Tempo de corrida	10 minutos

Os parâmetros escolhidos para a validação do método para o produto acabado foram: seletividade/ especificidade, linearidade, precisão, exatidão estabilidade de solução e teste do efeito do filtro, de acordo com a RE n°899 de 29 de maio de 2003 e RDC 166 de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2003). Dessa perspectiva, todos os parâmetros foram avaliados quanto a sua adaptabilidade à análise das amostras liofilizadas.

4.3.1.1. Seletividade/ Especificidade

Para determinação da seletividade preparou-se soluções analíticas da amostra, do produto acabado (Pemetrexede), padrão de calibração, diluente, placebo (manitol) e fase móvel conforme descrito na otimização do método. Em seguida, construiu-se amostra pesando analiticamente 25mg de manitol; o excipiente e placebo do medicamento, e 27,7 mg de Pemetrexede matéria-prima, transferindo para balão volumétrico 25 mL, solubilizando e completando o diluente com (água ultra purificada). Transferiu-se volumetricamente 2,0 mL para um balão volumétrico de 20 mL e completando o volume com o mesmo diluente seguido de homogeneização. A concentração aproximada desta solução é de 100 µg/mL de Pemetrexede. Após a preparação destas soluções, realizou-se três injeções da solução padrão de calibração, duas injeções do padrão de confirmação (possui os mesmos componentes do padrão de calibração), uma injeção da amostra de Pemetrexede -produto acabado- e uma injeção da amostra sintética.

4.3.1.2. Adequação De Sistema

A adequação do sistema é composta por um grupo de ensaios aplicados ao método cromatográfico, com o intuito de verificar se o sistema está adequado para ser utilizado quanto a sua reprodutibilidade, fator de cauda, fator de capacidade (k), número de pratos teóricos (N), resolução, desvio padrão relativo (DPR), fator de simetria (α) e resolução (R). Baseando-se na compreensão de que os equipamentos, as amostras a serem analisadas e os procedimentos analíticos compõem um sistema completo, esses devem ser analisados como um todo (USP 39, 2016).

4.3.1.3. Linearidade

A solução estoque de Idarrubicina do padrão de referência foi preparada a uma concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução foram feitas cinco (5) diluições de concentrações diferentes conforme a tabela.

Tabela 6: As diluições para a construção da curva da avaliação da linearidade referente ao desenvolvimento do método de Pemetrexede

Pontos da Linearidade	Volume da SE (ml)	Quantidade do diluente q.s.p (ml)	Concentração aproximada ($\mu\text{g/ml}$)
80%	1,6	20	80
90%	1,8	20	90
100%	2,0	20	100
110%	2,2	20	110
120%	2,4	20	120

SE= Solução Estoque, q.s.p= quantidade suficiente para

A linearidade foi avaliada entre os intervalos de 80 a 120%, correspondendo as concentrações de 80 a 120 $\mu\text{g/ mL}$ de Pemetrexede. Os dados da curva de linearidade foram representados graficamente para as áreas dos picos contra as concentrações de Pemetrexede, após qual, os dados alcançados foram sujeitos a análise de regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação.

4.3.1.4. Precisão

As precisões intra e intercorridas foram avaliadas através de seis (6) determinações de soluções preparadas a 100% de concentração referente ao nível da linearidade. As soluções de cloridrato de Pemetrexede foram preparadas conforme exposto no item 5.1 da otimização do método. Lembrando que, esses ensaios foram realizados em um intervalo de dois (2) dias sucessivos. Em cada um dos ensaios foram determinados a recuperação em porcentagem e o desvio padrão relativo (DPR) para as injeções.

4.3.1.5. Limite de detecção e quantificação

Tanto o limite de detecção quanto o de quantificação foram ponderados mediante a equação que leva em consideração os dados obtidos da curva de linearidade. O desvio padrão relativo das áreas do pico de Pemetrexede para as três injeções do ponto mínimo foi analisado para determinação deste limite de quantificação.

4.3.1.6. Exatidão

Este parâmetro foi avaliado por meio do ensaio de recuperação. Para isso, foi adicionada uma quantidade de padrão de referência conhecida ao placebo. As amostras foram construídas conforme o modo de preparo descrito na otimização do método.

O resultado deste ensaio foi expresso em porcentagem de recuperação a partir do cálculo da quantidade de ativo presente em cada amostra construída.

4.3.1.7. Robustez

A robustez deste método foi avaliada por meio de modificações deliberadas das condições estabelecidas, por exemplo, lote de coluna, pH da solução tampão da fase móvel 3,9 e 4,1, fluxo da fase móvel 0,7 e 0,9 mL/min, proporção de Acetonitrila na fase móvel 29:71 e 31:69 e temperatura da coluna. Foram utilizadas as médias das três injeções realizadas em condições normais comparadas com as das injeções realizadas em condições alteradas para avaliação da influência das variações.

4.3.1.8. Avaliação de filtro

Para iniciar a adequação de método foi verificado a influência dos filtros nos resultados de quantificação do ativo das soluções analíticas dos produtos acabados (medicamento) preparados no momento da pesquisa. Para isso preparou-se as amostras e

padrões analíticos conforme o método de preparo. Preparou-se e filtrou-se uma parte no filtro PVDF 0,45µm sem descartar os primeiros volumes, em seguida preparou-se outra amostra e solução de padrão de referência filtrando e descartando os primeiros 2 ml. Por último preparou-se sem filtrar a solução padrão e amostra.

4.3.1.9. Estabilidade da Solução

A Estabilidade avalia a manutenção das respostas das soluções analíticas preparadas com diluente dentro de um determinado intervalo de tempo. Para a realização deste estudo preparou-se uma solução padrão de calibração e uma solução da amostra Pemetrexede 500mg.

Procedeu-se com três injeções do padrão de calibração, três injeções de cada amostra nos tempos 0,2,4 e 10h. Foi avaliada a variação (em %) em relação ao tempo inicial (0 horas) - espera-se obter uma recuperação entre 98 e 102%. Onde o desvio padrão (DPR) entre as áreas das triplicatas, da solução padrão de calibração e amostras devem ser $\leq 2,0\%$.

4.3.2. Adequação e validação de método analítico para determinação de idarrubicina

Seguindo o protocolo estabelecido pela USP, foram implementadas diversas condições de vazão, volume de injeção, proporção de solvente e solução aquosa na fase móvel, considerando eluição isocrática. As condições de trabalho são sumarizadas na tabela a seguir:

Tabela 7: Condições cromatográficas de Idarrubicina

Parâmetro	Condição
Coluna	Develosil 5µ, TMS-UG 140A (250x4,6mm)
Detecção	UV 254 nm – largura de banda 4 nm
Vazão	2,0 mL/min
Modo	Isocrático
Fase móvel	Água: ACN: Metanol: ácido fosfórico (540:290:170:2)
Volume de Injeção	20 µL
Temperatura da coluna	25 °C)
Tempo de corrida	40 min

4.3.2.1. Avaliação de filtro

Para iniciar a adequação de método, verificou-se a influência dos filtros nos resultados de quantificação do ativo das soluções analíticas dos produtos acabados (medicamento) preparados no momento da pesquisa. Para isso, preparou-se as amostras e padrões analíticos conforme descrito para Idarrubicina. Esta solução preparada foi filtrada parcialmente em filtro PVDF 0,45 μ m sem descartar os primeiros volumes. Em seguida, preparou-se outra amostra e solução de padrão de referência filtrando e descartando os primeiros 2 mL. Por último, preparou-se a solução padrão e amostra sem filtração.

4.3.2.2. Estabilidade Da Solução

A Estabilidade avalia a manutenção das respostas das soluções analíticas preparadas com diluente dentro de um determinado intervalo de tempo. Para a realização deste estudo, preparou-se uma solução de resolução, uma solução padrão de calibração, uma solução amostra de IDA[®] 5 mg e uma solução amostra de IDA[®] 10 mg, conforme descrito. Procedendo-se com uma injeção da solução de resolução, três injeções do padrão de calibração, três injeções de cada amostra nos tempos 0, 6,12 e 24, para avaliação da variação (em %) em relação ao tempo inicial (0 horas) - espera-se obter uma avaliação contida entre 98 e 102%. Onde o desvio padrão (DPR) entre as áreas das triplicatas, da solução padrão de calibração e amostras devem ser $\leq 5,0\%$.

Os parâmetros escolhidos para verificação e validação do método Farmacopeico para o produto acabado são: seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade da solução e teste de filtro. Com o objetivo de comprovar que a matriz do produto terminado eleito, pode ser analisada pelo método Farmacopeico. Diante dessa perspectiva, todos os parâmetros foram avaliados quanto a sua adaptabilidade a análise das amostras liofilizadas e também, para detecção simultânea de impurezas ou produtos de degradação presentes no analito.

4.3.2.3. Seletividade/ Especificidade

Para averiguar a seletividade, preparou-se soluções analíticas de amostra do produto acabado (medicamento) padrão de calibração, diluente, fase móvel e solução de resolução conforme os itens; 2.1, 2.2 e 2.3. Em seguida, preparou-se amostra construída, pesando analiticamente 103,5 mg de placebo e 10,0 mg de cloridrato de Idarrubicina padrão de referência, transferindo-os para balão volumétrico de 20 mL. Foi adicionado 16 mL do

diluyente para então levar o balão ao ultrassom até completa solubilização. O volume foi completado com o mesmo diluyente. A concentração aproximada desta solução é de 0,5 mg/mL de cloridrato de Idarrubicina. Após a preparação destas soluções, realizou-se três injeções da solução padrão de calibração, duas injeções do padrão de confirmação, duas injeções das amostras e três injeções da solução padrão de resolução/solução de resolução.

4.3.2.4. Adequação De Sistema

A adequação do sistema é composta por um grupo de ensaios aplicado ao método cromatográfico, com o intuito de verificar se o sistema está adequado para ser utilizado quanto a sua; reprodutibilidade, fator de cauda, fator de capacidade (k), número de pratos teóricos (N), desvio padrão relativo (DPR), fator de simetria (α), fator de resolução (R) e resolução. Baseando-se na compreensão de que os equipamentos, as amostras a serem analisadas e os procedimentos analíticos compõem um sistema completo, esses devem ser analisados como um todo (USP 39, 2016).

4.3.2.5. Linearidade

A solução estoque de Idarrubicina do padrão de referência foi preparada a uma concentração de 2,0 mg/mL. A partir desta solução, foram feitas cinco (5) diluições de concentrações diferentes, conforme a tabela abaixo.

Tabela 8. Diluições para a construção da curva de avaliação da linearidade referente a adequação do método de Idarrubicina.

Pontos da Linearidade	Volume da SE (ml)	Quantidade do diluyente q.s.p (ml)	Concentração aproximada (mg/ml)
80%	2,0	10	0,4
90%	2,25	10	0,45
100%	2,5	10	0,5
110%	2,75	10	0,55
120%	3,0	10	0,6

SE= Solução Estoque, q.s.p= quantidade suficiente para

A linearidade foi avaliada entre os intervalos de 80 a 120%, correspondendo as concentrações de 0,4 a 0,6 mg/mL de Idarrubicina. Os dados da curva da linearidade foram

representados graficamente para as concentrações de Idarrubicina versus as áreas dos picos, após qual, os dados alcançados foram sujeitos a análise da regressão linear.

4.3.2.6. Precisão

As precisões intra e intercorridas foram avaliadas através de seis (6) determinações de soluções preparadas a 100% de concentração referente ao nível da linearidade. As soluções de cloridrato de Idarrubicina foram preparadas conforme exposto no item 4.1.3.2. Lembrando que esses ensaios foram realizados em um intervalo de dois (2) dias sucessivos. Em cada um dos ensaios, foram determinados a recuperação em porcentagem e o desvio padrão relativo (DPR) para as injeções.

4.3.3. Adequação de método analítico para determinação de fludarabina

Seguindo o protocolo estabelecido pela USP foram implementadas diversas condições de trabalho sumarizadas na tabela a seguir:

Tabela 9. Condições cromatográficas

Parâmetro	Condição
Coluna	D RP 18 (L1), 150mm x 4,6 mm, 5µm;
Detecção	UV 260nm
Vazão	1,0 mL/min
Modo	Isocrático
Fase móvel	Metanol: fosfato de potássio (30:470) v/v
Volume de Injeção	10 µL
Temperatura da coluna	25 °C)
Tempo de corrida	10 min

4.3.3.1. Estabilidade da Solução

A Estabilidade avalia a manutenção das respostas das soluções analíticas preparadas com diluente dentro de um determinado intervalo de tempo. Para a realização deste estudo, preparou uma solução de resolução, uma solução padrão de calibração, uma solução amostra de Fludarabina 50mg e uma solução amostra conforme descrito no item 4.1.3.3.

Procedeu-se com uma injeção da solução de resolução, três injeções do padrão de calibração, três injeções de cada amostra nos tempos 0, 4, 8 e 12 hrs para avaliação da

variação (em %) em relação ao tempo inicial (0 horas) - espera-se obter uma avaliação contida entre 95 e 105%. Onde o desvio padrão (DPR) entre as áreas das triplicatas da solução padrão de calibração e amostras deve ser $\leq 5,0\%$.

Os parâmetros eleitos para verificação do método Farmacopeico para o produto acabado são: seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade da solução e teste de filtro. Com o objetivo de comprovar que a matriz do produto terminado eleito pode ser analisada pela metodologia Farmacopeica.

Diante dessa perspectiva, todos os parâmetros foram avaliados quanto a sua adaptabilidade a análise das amostras liofilizadas e também para detecção simultânea de impurezas ou produtos de degradação presentes analito

4.3.3.2. Seletividade/ Especificidade

Para averiguar a seletividade, preparou-se soluções analíticas de amostra do produto acabado (medicamento), padrão de calibração, diluente, fase móvel e solução de resolução conforme o item 4.1.3.3. Em seguida, preparou-se amostra construída transferindo 2 mL da solução estoque do placebo (preparada pesando 25mg de manitol em balão volumétrico de 25 mL e misturado até total dissolução com o diluente; no caso água ultra purificada) para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com fase móvel. Após a preparação destas soluções, realizou-se três injeções da solução padrão de calibração, duas injeções do padrão de confirmação e duas injeções das amostras.

4.3.3.3. Adequação de Sistema

A adequação do sistema é composta por um grupo de ensaios aplicado ao método cromatográfico com o intuito de verificar se o sistema está adequado para ser utilizado quanto a sua reprodutibilidade, fator de cauda, fator de capacidade (k), número de pratos teóricos (N), desvio padrão relativo (DPR), fator de simetria (α), fator de resolução (R) e resolução. Baseando-se na compreensão de que os equipamentos, as amostras a serem analisadas e os procedimentos analíticos compõem um sistema completo, esses devem ser analisados como um todo (USP 39, 2016).

4.3.3.4. Linearidade

A solução estoque de Fludarabina do padrão de referência foi preparada a uma concentração de 1,0mg/ mL. A partir desta solução, foram feitas cinco (5) diluições de concentrações diferentes conforme a tabela abaixo.

Tabela 10: Diluições para a construção da curva de avaliação da linearidade referente a adequação do método de Fludarabina

Pontos da Linearidade	Volume da SE (ml)	Quantidade do diluente q.s.p (ml)	Concentração aproximada (mg/ml)
80%	1,6	100	0,016
90%	1,8	100	0,018
100%	2,0	100	0,020
110%	2,20	100	0,022
120%	2,40	100	0,024

SE= Solução Estoque, q.s. p= quantidade suficiente para

A linearidade foi avaliada entre os intervalos de 80 a 120%, correspondendo as concentrações de 0,016 a 0,024 mg/ mL de Fludarabina. Os dados da curva de linearidade foram representados graficamente para as concentrações vs as áreas dos picos, após qual, os dados alcançados foram sujeitos a análise da regressão linear.

4.3.3.5. Precisão

As precisões intra e intercorridas foram avaliadas através de seis (6) determinações de soluções preparadas a 100% de concentração referente ao nível da linearidade. As soluções foram preparadas conforme detalhado no método de preparo para Fludarabina no item 4.1.33. Lembrando que, esses ensaios foram realizados em um intervalo de dois (2) dias sucessivos. Em cada um dos ensaios foram determinados a recuperação em porcentagem e o desvio padrão relativo (DPR) para as injeções.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

"Honesty's the best policy."

Miguel Cervantes

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de Pemetrexede

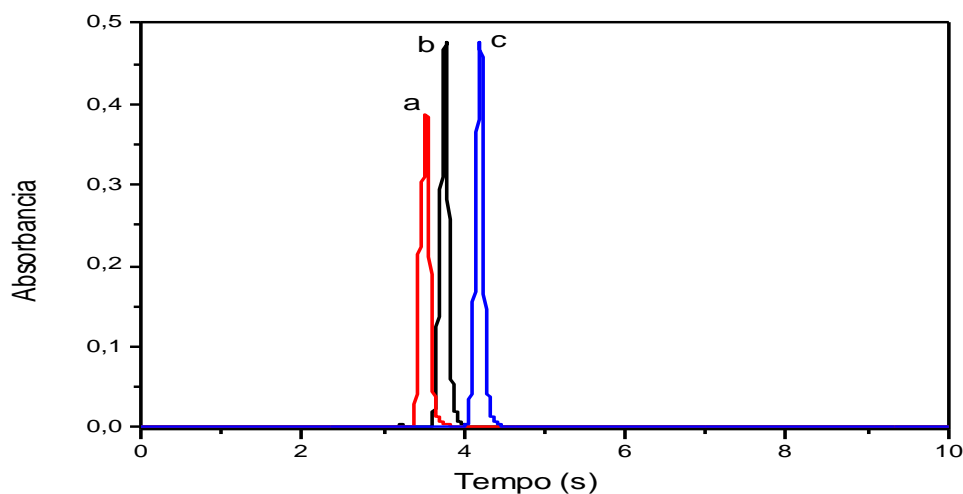
O desenvolvimento da metodologia analítica por cromatografia iniciou-se com levantamento bibliográfico das condições cromatográficas empregadas na análise de Pemetrexede, atentando-se à vazão, fase móvel e tipo de coluna. Colunas do tipo octadecilsilano (C18) foram escolhidas considerando algumas referências (PATEL *et al*, 2011; Protocolo Chemicaltech, 2016) e empregadas no desenvolvimento do método utilizando especificamente a coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) da Phenomenex.

Os padrões foram preparados em suas concentrações adequadas para análise e avaliou-se por inspeção visual a formação ou presença de sólidos ao utilizar um determinado diluente, a ausência de precipitado foi indicativa de que o solvente promovia uma solubilização adequada.

Foram avaliados os parâmetros: vazão, volume de injeção, pH além da proporção da solução tampão de fosfato monobásico de sódio e acetonitrila com o intuito de obter as condições favoráveis para a quantificação do fármaco.

Na figura 5 são apresentados os resultados (absorbância contra tempo em minutos) para a avaliação da composição da fase móvel.

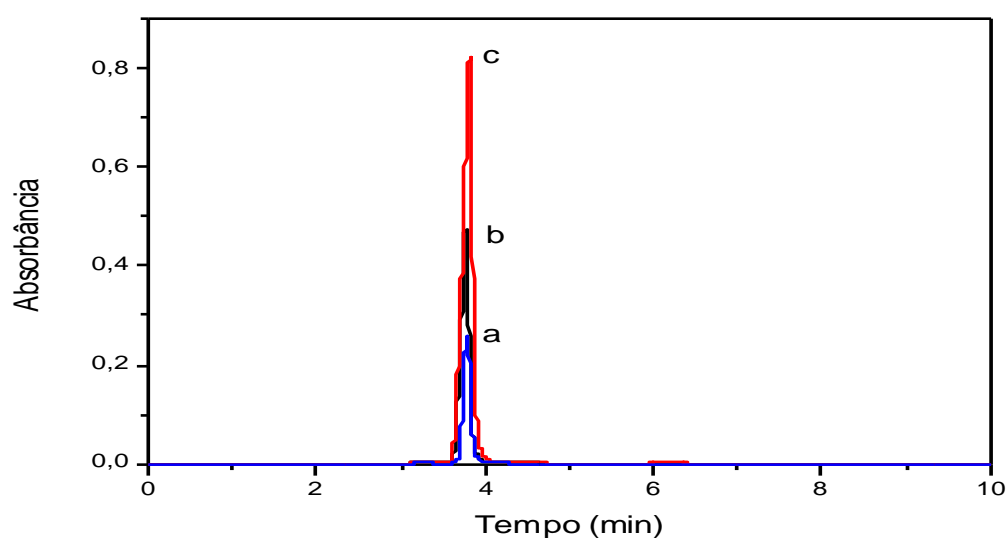
Figura 5 Composição da fase móvel: a) 65:35, b) 70:30, c) 75:25, Água (buffer): Solvente. Vazão 0,8 mL min⁻¹; pH = 4,0; Volume de injeção 10 μ L.



A melhor condição foi a obtida no cromatograma (b) da figura 5, para todos os parâmetros pois os mesmos apresentaram respostas de fator de capacidade e assimetria dentro do critério de aceitação, preservando a não saturação da coluna cromatográfica utilizado. Com base nas respostas obtidas estabeleceu-se as condições de trabalho utilizadas nas determinações tanto das amostras quanto dos padrões de referência. Na avaliação o uso de acetonitrila e solução tampão com pH 4 na proporção Acetonitrila: Tampão de Fosfato monobásico de sódio (30:70 v/v) foi selecionado como fase móvel e diluente na preparação das soluções estoque para os seguintes estudos.

Outro parâmetro extremamente importante é o volume de injeção que foi avaliado de 5 a 20 μL e os resultados apresentados na figura 6.

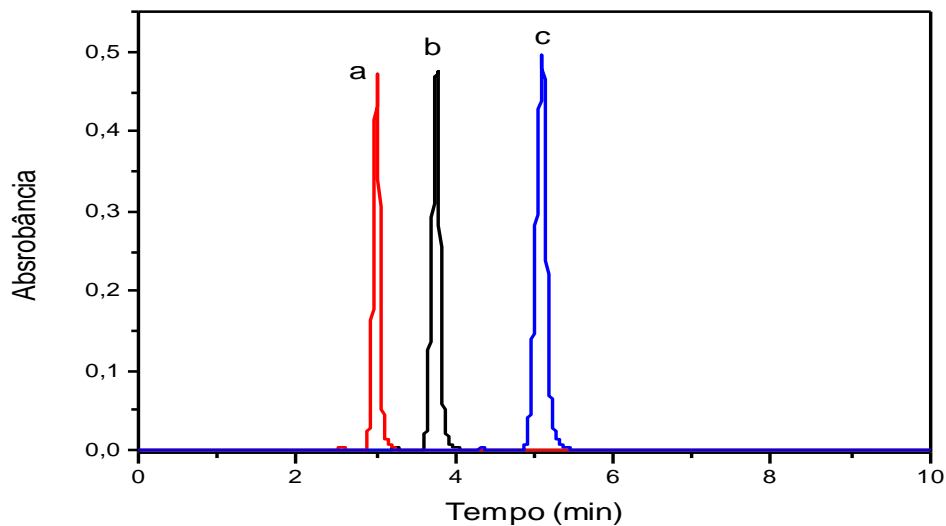
Figura 6. Volume de injeção: **a) 5 μL , b) 10 μL , c) 20 μL** . Fase móvel-70:30 Água (buffer): Solvente. Vazão 0,8 mL min^{-1} ; pH = 4,0.



A condição selecionada foi a obtida no cromatograma (b) da figura 6, apresentando respostas de fator de capacidade e assimetria dentro do critério de aceitação, preservando adicionalmente a não saturação da coluna cromatográfica utilizada. A condição de 10 μL foi selecionada para os seguintes estudos.

A vazão da fase móvel foi outro parâmetro avaliado, na faixa de 0,6 a 1,0 mL min^{-1} , especialmente considerado a produtividade analítica, se apresentam na figura 7.

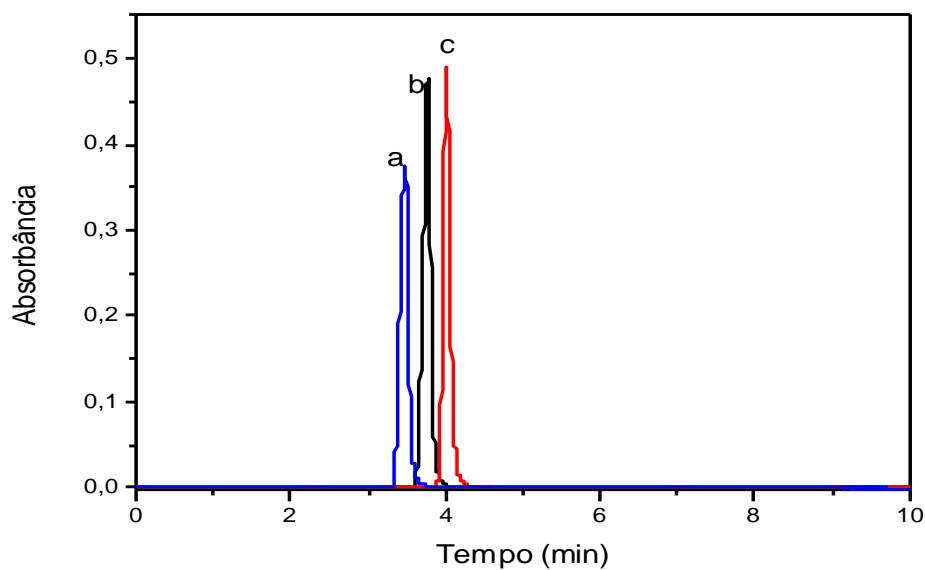
Figura 7. Vazão da fase móvel: a) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, b) $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, c) $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel-70:30 Água (buffer): Solvente. pH = 4,0; Volume de injeção $10 \mu\text{L}$.



Embora em todos os casos são obtidos resultados aceitáveis, por apresentar um consumo menor de fase móvel a condição $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para os seguintes estudos.

Considerando a possível influência do pH na separação, foi realizado um estudo deste parâmetro na faixa de 3,5 a 4,5 e os resultados são apresentados na figura 8.

Figura 8. Variação de pH: a) pH = 4,5; b) pH = 4,0; c) pH = 3,5. Fase móvel-70:30 Água (buffer): Solvente. Vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; Volume de injeção $10 \mu\text{L}$.

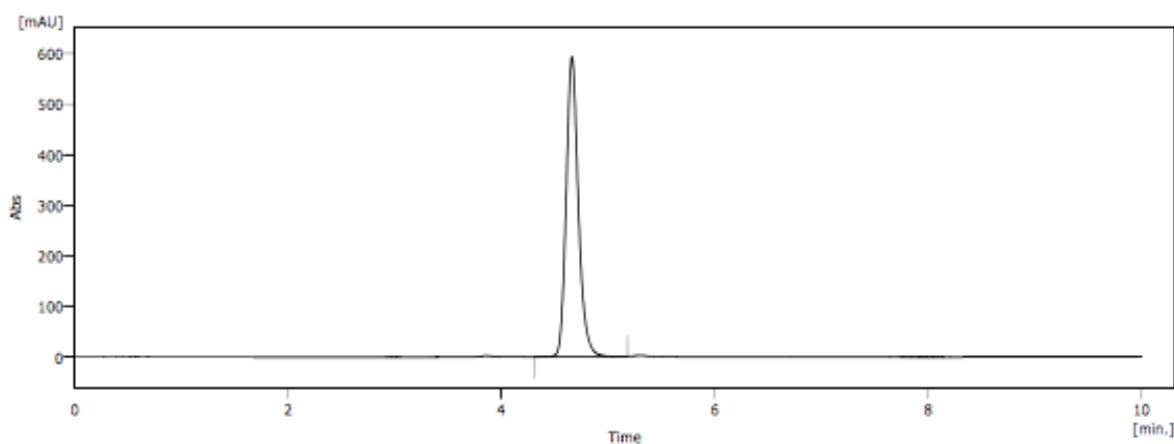


Segundo pode ser observado no maior pH o pico resulta mais largo e com menor

tempo de retenção, e no menor pH o pico resulta ter um tempo de retenção maior, por isto foi escolhida uma condição intermediária com pH = 4 para os seguintes estudos.

Na figura 9 podem ser observados os cromatogramas em condições otimizadas do padrão e o branco

Figura 9. Cromatograma do padrão diluído em fase móvel pH 4 injetado na vazão de 0,8ml/min, temperatura de 25°C, proporção de fase móvel de 30:70 v/v de ACN: Tampão fosfato.



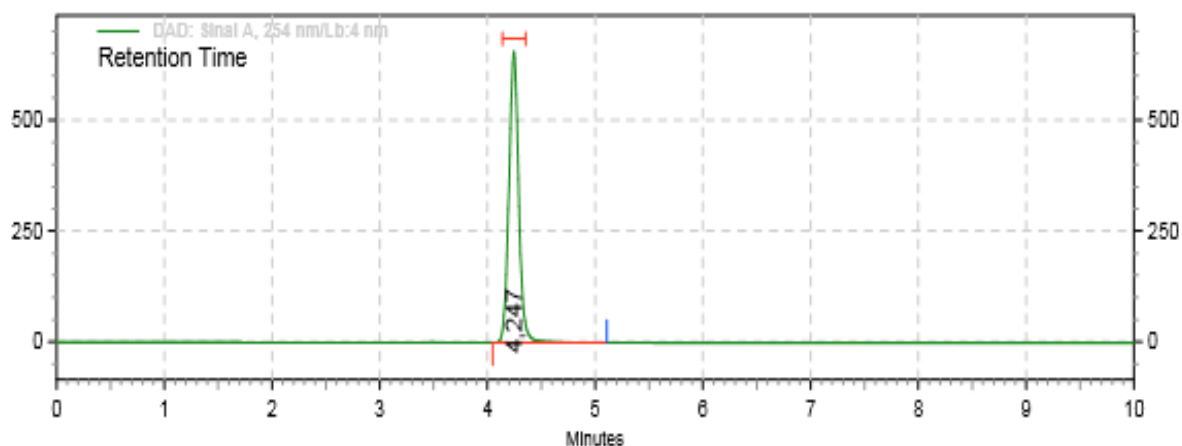
Os resultados evidenciam a simetria e a resolução do pico correspondendo a Pemetrexede. Foi observado um tempo de retenção de 4,2 minutos, permitindo a determinação rápida do analito, o que facilita a sua utilização em controle de qualidade do medicamento testado.

Depois da escolha da coluna e otimização dos demais parâmetros experimentais, vazão, volume de injeção, pH, e proporção da solução tampão de fosfato monobásico de sódio e acetonitrila na fase móvel, procedeu-se com a validação da metodologia.

5.1.1. Seletividade/ Especificidade

Considerando todas as condições otimizadas são apresentados na figura 10 os cromatogramas obtidos com o método desenvolvido para o branco e o padrão de referência de 100 µg/ml.

Figura. 10. Cromatograma de Pemetrexede padrão de referência (100 µg/ml) em condições otimizadas.

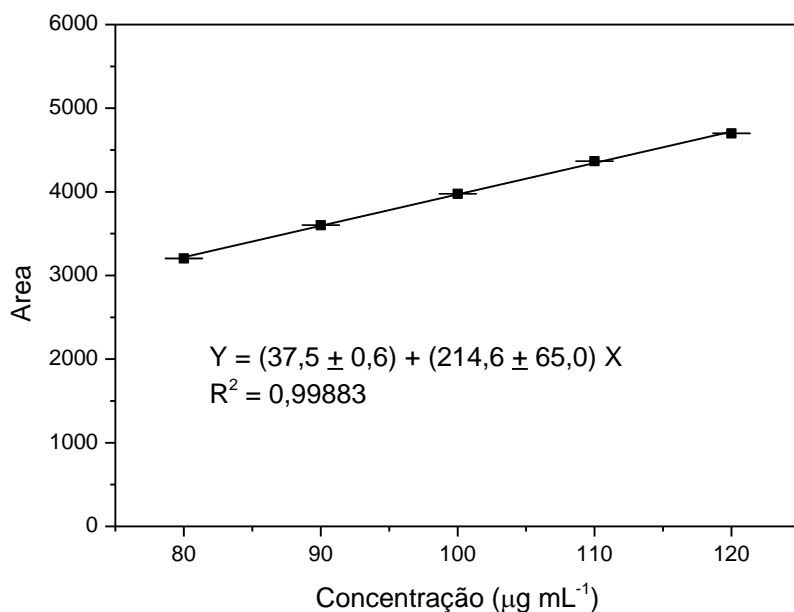


Não foram observadas interferências significativas na região do tempo de retenção do analito de interesse. O método apresentou seletividade / especificidade para o composto testado. E a pureza dos picos demonstra que estes são atribuídos a somente um componente.

5.1.2. Linearidade

As medias de todas áreas de cada nível de concentração para o intervalo escolhido 80 - 120µg/ml de Pemetrexede, obtidas em triplicata, são representados na figura abaixo.

Figura 11. Curva analítica para o Pemetrexede.



Pode ser observado que os dados das áreas obtidas apresentam correlação linear com as concentrações de pemetrexede, sendo o desvio padrão para cada replicata muito pequeno, por tanto a linearidade é apropriada para a aplicação proposta.

5.1.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a metodologia foram estimados em 1,49 µg/mL e 4,53 µg/mL respectivamente. Considerando a aplicação proposta, estes valores são aceitáveis. Porém o cálculo dos limites de detecção e quantificação não é mais solicitado para os ensaios de doseamento e identificação (ANVISA, 2017).

5.1.4. Precisão

O parâmetro de precisão foi avaliado através da repetibilidade, com os resultados expressos com base no DPR. Analisou-se sucessivamente seis (6) amostras de Pemetrexede preparadas na concentração de 100% da linearidade (100 µg/ml).

Tabela 11: Repetibilidade e Precisão intermediária de Pemetrexede

	Analista 1	Analista 2
	Área	Área
1	4016145	4154747
2	4016914	4154214
3	4016018	4154341
4	4016228	4154928
5	4016483	4154590
6	4016995	4155315
Média	4016464	4154689
DPR%_{intra-dias}	0,01	0,01
Critério de Aceitação	DPR ≤ 2,0%	
DPR%_{inter-dias}	1,8	
Critério de Aceitação	DPR ≤ 2,0%	
F calculado	1,0399	
F crítico	5,0503	

Todos os resultados obtidos pelo mesmo analista, no mesmo dia frente as mesmas condições, proporcionaram um DPR de 0,01%. Na precisão entre analistas foram analisadas as mesmas quantidades de amostras obtendo DPR de 0,01. O DPR da precisão inter-dias foi de 1,8% levando em conta as áreas obtidos pelos dois analistas

5.1.5. Exatidão

A tabela abaixo apresenta os resultados da exatidão determinada por meio de recuperação expressas em termos da porcentagem adquiridos a partir da relação entre a media dos três níveis de concentração determinado durante o experimento e a concentração teórica adequada, frente a metodologia proposta.

Tabela 12: Avaliações do parâmetro da exatidão do método cromatográfico para determinação de Pemetrexede por CLAE

Nível (%)	Concentração teórica (mg/mL)	Concentração experimental (mg/mL)	Rc (%)
80%-1	0,0800	0,0810	101,3
80%-2	0,0800	0,0810	101,3
80%-3	0,0800	0,0810	101,3
100%-1	0,1000	0,1013	101,3
100%-2	0,1000	0,1014	101,4
100%-3	0,1000	0,1012	101,2
120%-1	0,1200	0,1217	101,4
120%-2	0,1200	0,1213	101,1
120%-3	0,1200	0,1214	101,2
Média das recuperações (%)			101,3
Desvio padrão das recuperações			0,1
DPR%			0,1
Critério de Aceitação (%)			98 ≤ Rc ≤ 102 %
Rc %= Recuperação			

Observou-se uma média de 101,3%, contudo com base no desvio padrão não houve variação significativa das respostas individuais.

5.1.6. Robustez

Determinou-se a robustez por meio de pequenas alterações nos parâmetros da metodologia: coluna (de outro lote), pH, vazão, proporção do tampão na fase móvel, na tabela 13 estão detalhados as médias das áreas, o Status de cada condição de robustez e o DPR (%) para as 3 injeções.

Tabela 13. Estudos de robustez.

Parâmetro	Média Padrão	DPR (%)	Média Amostra	DPR (%)	Status
Controle	4005193	0,1	3967319	0,1	De Acordo
Temperatura: 24°C	4006891	0,3	3970018	0,1	De Acordo
Temperatura: 26°C	4003784	0,7	3959918	0,2	De Acordo
FM 1-ACN: Tampão(31:69 v/v)	3986255	0,1	3969105	0,1	De Acordo
FM 2- ACN: Tampão(29:71 v/v)	3999403	0	3978615	0,3	De Acordo
Coluna	3986181	0,1	3976792	0,2	De Acordo
Vazão: 0,7 mL/min	4007662	0,1	3968106	0,1	De Acordo
Vazão: 0,9 mL/min	3997001	0,3	3975817	0,3	De Acordo
DPR (%)		≤ 2,0%		≤ 2,0%	

Mesmo com essas modificações as amostras analisadas não apresentaram alterações significativas durante a sua determinação e quantificação, confirmando a robustez do método desenvolvido

5.1.7. Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi verificada por meio de cálculos de parâmetros cromatográfico como: fator de capacidade, número de pratos teóricos da coluna, área do pico do ativo, assimetria do pico, fator de capacidade e o tempo de retenção, para 5 injeções do padrão de referência de Pemetrexede. Os dados obtidos encontram-se detalhados na tabela 14 abaixo.

Tabela 14: Resultados obtidos na avaliação da adequabilidade do método cromatográfico

	Fator de capacidade	Assimetria do pico	Pratos teóricos	Área	Tempo de retenção (min)
Media	2	1,100	9598	3858201	4,4422
DPR (%)	0,23	0,0	0,40	0,23	0,16

Os dados obtidos na avaliação da adequabilidade do sistema demonstram que o equipamento e as demais condições cromatográficas asseguram a confiabilidade dos resultados, por está dentro do preconizado em literatura, onde a assimetria do pico deve ser $\leq 2,0$, número de pratos teóricos > 2000 , valor de DPR $\leq 2,0$ para cada parâmetro avaliado e fator de capacidade > 2 (ICH, 2005; USP 39, 2016)

5.1.8. Estabilidade da Solução

A estabilidade da solução amostra e solução padrão foi avaliada nos tempos de 0,2,4 e 10 horas. Todas as soluções foram mantidas à temperatura ambiente. A tabela 15 abaixo mostra os dados obtidos neste ensaio.

Tabela. 15: Respostas médias do padrão e amostras na avaliação da estabilidade

Tempo aproximado em horas	Media Amostra	DPR Amostra	Recuperação (%)	Média-Padrão	DPR	Recuperação (%)
0,0	4011799	0,3	100,0	3862631	0,1	100,0
2,0	3980047	0,5	99,2	3887991	0,2	100,7
4,0	4023187	0,1	100,3	3860230	0,2	99,9
10,0	4076830	0,3	101,6	3935528	0,1	101,9
Critério de Aceitação		$\leq 2,0\%$	$98,0\% \leq R_c \leq 102,0\%$		$\leq 2,0\%$	$98,0\% \leq R_c \leq 102,0\%$

Ambas apresentaram estabilidade por pelo menos 10 horas, tempo este considerado a partir do preparo.

5.1.9. Avaliação do Filtro

Neste ensaio pretende-se verificar se a filtração realizada em millex HV-PVDF 0,22 µm e diâmetro 13 mm é adequada para as soluções Padrão de Calibração e Amostra. A tabela sumariza os resultados.

Tabela. 16: Resultados médios do padrão de calibração na avaliação do filtro.

Parâmetro	Média	DPR	Recuperação (%)	Status
Sem Filtração (centrifugado)	3901268	0,2	100,0	n/a
HV-PVDF 0,22µm, diâmetro 33 mm - Filtração sem descarte	3845284	0,13	98,6	De acordo
HV-PVDF 0,22µm, diâmetro 33 mm - Filtração com descarte	3844371	0,16	98,5	De acordo
Critério de Aceitação		$\leq 2,0$	$98,0\% \leq R_c \leq 102,0\%$	

n/a= não se aplica

Tabela. 17: Resultados médios da amostra na avaliação do filtro.

Parâmetro	Média	DPR	Recuperação (%)	Status
Sem Filtração (centrifugado)	4031939	0,2	100,0	n/a
HV-PVDF 0,22µm com diâmetro 33 mm - Filtração sem descarte	3960053	0,2	98,2	De acordo
HV-PVDF 0,22µm com diâmetro 33 mm - Filtração com descarte	3970764	0,2	98,5	De acordo
Critério de Aceitação		$\leq 2,0$	$98,0\% \leq R_c \leq 102,0\%$	

O método proposto atende os requisitos exigidos pela resolução vigente e compêndios oficiais adotados, e pode ser empregado na análise de controle de qualidade de Pemetrexede em produtos farmacêuticos

Vale ressaltar que Pemetrexede só foi descrito em compêndios oficiais da USP durante o desenvolvimento deste trabalho, porém com condições cromatográficas diferentes e estabelecendo critérios de limite mínimo e máximo quanto ao seu teor em produtos farmacêuticos.

5.2. Adequação de método analítico para Idarrubicina para injetáveis

5.2.1. Avaliação de filtro

Neste ensaio pretende-se verificar se a filtração realizada em millex HV-PVDF 0,45µm é adequada para as soluções Padrão de Calibração e Amostra.

As tabelas abaixo apresentam os resultados do padrão e da amostra – áreas – para as diferentes condições de filtração e o cálculo da recuperação em relação à condição sem filtração

Tabela. 18: Resultados obtidos do padrão de calibração de Idarrubicina na avaliação do filtro em diferentes condições.

Parâmetro	Média área – Padrão	DPR	Recuperação (%)	Status
Sem Filtração	21070010	0,1	100,0	n/a
HV-PVDF 0,45µm - Filtração com descarte	21053721	0,1	99,9	De acordo
Critério de Aceitação		≤ 2,0	95,0% ≤ R_C ≤ 105,0%	

n/a = não se aplica

Tabela. 19. Resultados obtidos da solução amostra 5mg na avaliação do filtro em diferentes condições

Parâmetro	Média área – Amostra	DPR	Recuperação (%)	Status
Sem Filtração	23573254	0,4	100,0	n/a
HV-PVDF 0,45µm - Filtração com descarte	23514360	0,2	99,8	De acordo
Critério de Aceitação			95,0% ≤ R_C ≤ 105,0%	

n/a = não se aplica

Tabela. 20. Resultados obtidos da solução amostra 10mg na avaliação do filtro em diferentes condições

Parâmetro	Média área-Amostra	DPR	Recuperação (%)	Status
Sem Filtração	24025331	0,1	100,0	n/a
HV-PVDF 0,45µm - Filtração com descarte	23971553	0,4	99,8	De acordo
Critério de Aceitação			95,0% ≤ R_c ≤ 105,0%	
n/a = não se aplica				

Nestes ensaios apresentados nas tabelas 18, 19 e 20 foi verificado que a filtração realizada em millex HV-PVDF 0,45µm não interfere nas respostas de identificação e quantificação das soluções do Padrão de Calibração (concentrações 5 e 10 mg), e na Amostra. Dessa forma, é adequado filtrar ambas as soluções na hora do preparo para injeção.

5.2.2. Estabilidade de solução.

Um estudo para comprovar o tempo de estabilidade das soluções foi realizado, todas as soluções foram mantidas à temperatura ambiente de 25°C, e os resultados são apresentados nas tabela 21 e 22.

Tabela. 21: Resultados obtidos da solução padrão e amostra 5 mg na avaliação da estabilidade

Tempo aproximado em horas	Media Amostra	DPR Amostra	Recuperação (%)	Média-Padrão	DPR	Recuperação (%)
0,0	23688062	0,1	100,0	211340691	0,0	100,0
6,0	23759575	0,0	100,3	21201526	0,1	100,3
12,0	23736777	0,2	100,2	21228608	0,0	100,4
24,0	23893897	0,1	100,9	21305197	0,1	100,8
Critério de Aceitação		DPR% ≤ 2,0%		98,0% ≤ R_c ≤ 102,0%		

Tabela. 22: Resultados obtidos da solução amostra de 10mg na avaliação da estabilidade

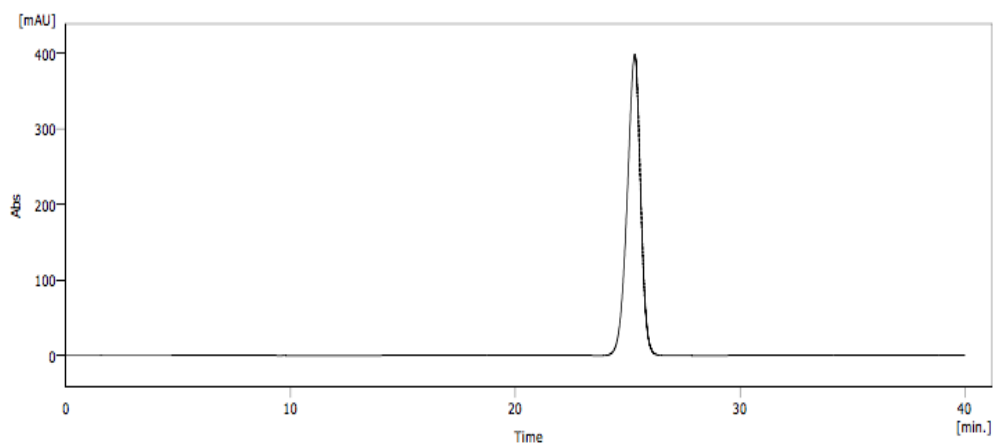
Tempo aproximado em horas	Media	DPR	Recuperação (%)
0	24114794	0,1	100
6	24134320	0	100,1
12	24171865	0,1	100,2
24	24408842	0,2	100,2
Critério de Aceitação		DPR% ≤ 2,0%	98,0% ≤ R_C ≤ 102,0%

Segundo detalhado nas tabelas 21 e 22, a solução amostra de 5 mg e 10 mg apresentaram estabilidade por pelo menos 24 horas, a solução padrão apresentou estabilidade por pelo menos 24,0 horas, tempo este considerado a partir do preparo.

5.2.3. Seletividade/ especificidade

Neste ensaio não foram observadas interferências significativas na região do tempo de retenção dos analitos de interesse. O método apresenta seletividade / especificidade para o composto testado. A pureza dos picos demonstra que estes são atribuídos a somente um componente. A figura 8 expõe a avaliação visual do cromatograma.

Figura 12. Cromatograma da solução padrão de calibração de Idarrubicina



5.2.4. Linearidade

O método para determinação de Teor de Cloridrato de Idarrubicina em IDA 5mg e IDA 10mg demonstrou ser linear dentro do intervalo 80% a 120% da concentração alvo testado, com coeficiente de correlação durante o ensaio, conforme a figura 12.

Figura 13. Gráfico da curva de regressão linear- Cloridrato de Idarrubicina

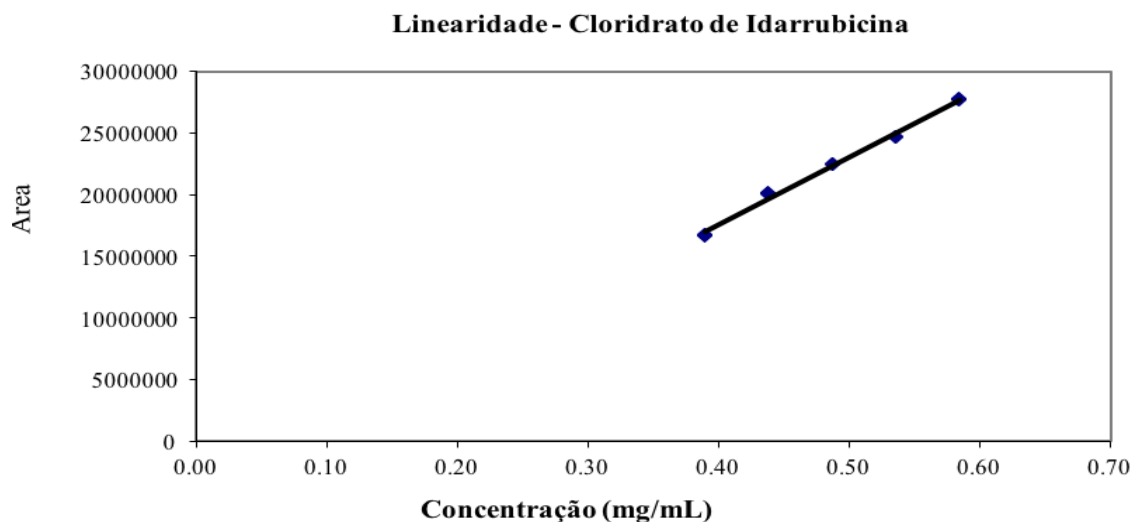


Tabela 23. Resultados de Análise Estatística da Regressão Linear

Parâmetro	Resposta obtida	Critério de aceitação
R^2	0,9943	$\geq 0,99$
Intersecção com o eixo Y	-4,268764E+06	Informativo
Coefficiente angular	5,470314E+07	Informativo

Foi obtido um coeficiente de correlação de 0,994 estando dentro do critério de aceitação, por outro lado pode se concluir o método é capaz de detectar além de quantificar os níveis de ativo nas amostras preparadas.

5.2.5. Precisão

Para avaliar a precisão foram realizados estudos considerando a repetibilidade das amostras preparadas pelo mesmo analista e nas mesmas condições além precisão intermediária cujo o preparo foi de analista diferente em dois dias consecutivos.

Tabela 24. Desvio Padrão Relativo – Padrão de Calibração Idarrubicina

Injeção	Analista 1	Analista 2
	Área	Área
Média	20942563	21323495
DPR %	0,1	0,1
Critério de Aceitação	DPR ≤ 2,0 %	DPR ≤ 2,0 %

Tabela 25: Resultados da repetibilidade – Cloridrato de Idarrubicina 5mg

Amostras	Analista 1	Analista 2
	mg/ml	mg/ml
1	0,545	0,552
2	0,546	0,551
3	0,550	0,540
4	0,562	0,564
5	0,539	0,541
6	0,558	0,547
Média	0,550	0,549
DPR_{intra-dias}(%)	1,56	1,6
Especificação	DPR ≤ 2,0%	
DPR_{inter-dias} (%)	1,5	
Especificação	DPR ≤ 2,0%	

Na determinação da precisão foram obtidos resultados de acordo com o especificado para a adequação do sistema, repetibilidade das amostras (preparados pelo mesmo analista nas mesmas condições) e precisão intermediária (analista diferente em dois dias consecutivos).

Tabela 26: Resultados da repetibilidade – Cloridrato de Idarrubicina 10mg

Amostras	Analista 1	Analista 2
	mg/ml	mg/ml
1	0,558	0,540
2	0,549	0,544
3	0,550	0,540
4	0,556	0,558
5	0,549	0,560
6	0,63	0,558
Média	0,554	0,550
DPR_{intra-dias}(%)	1,04	1,075
Especificação		DPR ≤ 2,0%
DPR_{inter-dias} (%)		1,4
Especificação		DPR ≤ 2,0%

Os desvíos padrão relativo obtidos variaram entre 0,554 e 1,4 mostrando-se satisfatório considerando que os resultados obtidos se encontram abaixo do 2%, valor de referência recomendados para o parâmetro avaliado para ambas as apresentações conforme os resultados mostrados nas tabelas 24 às 26.

5.3. Adequação de método analítico de Fludarabina para injetáveis

5.3.1. Estabilidade da solução.

As soluções da amostra e padrão apresentaram estabilidade de pelo menos 12 horas desde o preparo do mesmo, tempo este considerado a partir do preparo, detalhado nas tabelas 27 e 28. Todas as soluções foram mantidas à temperatura ambiente de 25°C.

Tabela. 27: Estabilidade da solução padrão de calibração de Fludarabina de 0,02 mg/ml

Tempo aproximado em horas	Média	DPR	Recuperação (%)
0,0	458,045	0,4	100,0
6,0	456,662	0,1	99,7
12,0	452,132	0,1	98,7
Critério de Aceitação		≤ 2,0%	95,0% ≤ Rc ≤ 105,0%

Tabela. 28: Resultados obtidos da solução amostra de 50mg na avaliação da estabilidade

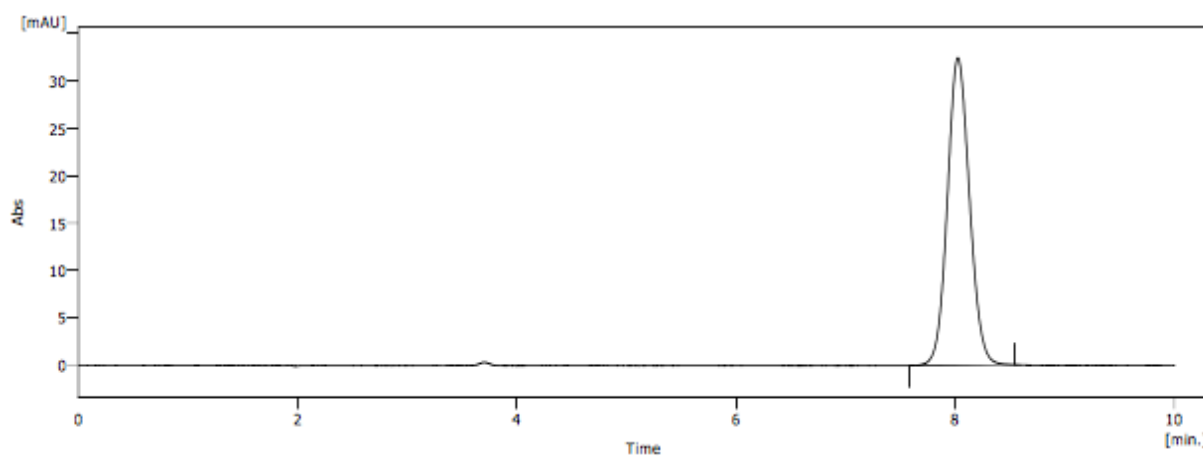
Tempo aproximado em horas	Média área-	DPR	Recuperação (%)
0,0	465,675	0,8	100,0
6,0	466,634	0,1	100,2
12,0	467,210	0,1	100,3
Critério de Aceitação		≤ 2,0%	95,0% ≤ Rc ≤ 105,0%

Os resultados obtidos com base no seu desvio padrão e recuperação demonstraram que mesmo após 12 horas de preparo da amostra esta manteve a concentração de preparo.

5.3.2. Seletividade/ especificidade

Neste ensaio não foram estudadas as possíveis interferências na região do tempo de retenção dos analitos de interesse em relação aos demais compostos presentes na amostra. A figura 10 expõe a avaliação visual do cromatograma.

Figura 14. Cromatograma da solução padrão de calibração de Fludarabina.



Como pode observar-se na figura 14 a fludadrarina apresentou um tempo de retenção de 8,1min, o aditivo presente no medicamento está sempre presente, mas foi obtida seletividade / especificidade do método para o composto testado. A pureza do pico demonstra que este é atribuído a somente um componente.

5.3.3. Linearidade

Foi estudado se o método para determinação de teor de fludarabina resultava ser linear dentro do intervalo 80% a 120% (n=5) da concentração alvo testado durante o ensaio.

Figura 15. Gráfico da curva de regressão linear- Fludarabina

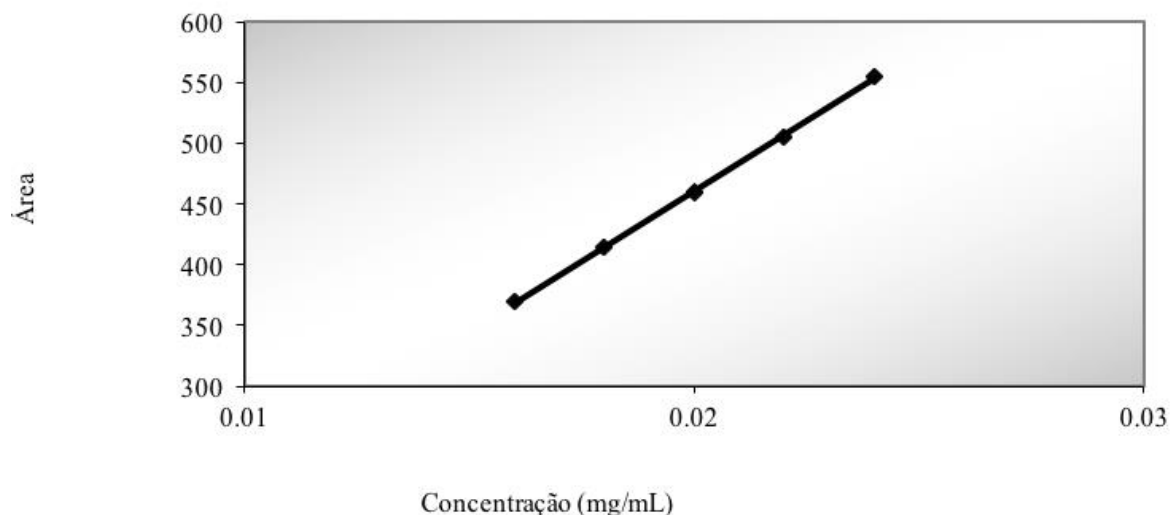


Tabela 29. Resultados de Análise Estatística da Regressão Linear de Fludarabina

Parâmetro	Resposta obtida	Critério de aceitação
Coeficiente de Correlação	0,9998	$\geq 0,99$
Intersecção com o eixo Y	-1,4485	Informativo
Coeficiente angular	23109,45	Informativo

O método para determinação de teor de fludarabina 50mg demonstrou ser linear dentro do intervalo 80% a 120% (n=5) da concentração alvo testado durante o ensaio.

Conforme mostrado na figura 15 e a tabela 29 se obteve um coeficiente de correlação de 0,9998, frente a faixa analisado não foram avaliados os limites de detecção ou quantificação pois não é exigência da ANVISA. Porém através do ponto mínimo da curva analítica construído a partir método, observa-se a sua sensibilidade em detectar e quantificar os níveis das concentrações de fludarabina presente no analito preparado.

5.3.4. Precisão

A avaliação da precisão da determinação foi estudada e os resultados da repetibilidade de diversas medições conduzidas em um dia nas mesmas condições cromatográficas e preparo pelo mesmo analista, e precisão intermediária avaliada em dois dias consecutivos é apresentada nas tabelas 30 a 32.

Tabela 30: Desvio Padrão Relativo – Padrão de Calibração de Fludarabina

Injeção	Analista 1 Área	Analista 2 Área
1	455,925	462,626
2	455,739	462,648
3	455,085	463,035
4	455,873	464,598
5	455,464	466,975
Média	455,617	463,976
DPR %	0,1	0,4
Critério de Aceitação	DPR ≤ 2,0 %	

Tabela 31: Resultado de Recuperação – Padrão de Confirmação de Fludarabiana

Injeção	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)
1	100,01	98,30
2	99,97	98,50
Média	99,99	98,40
Critério de Aceitação	98,0% ≤ Recuperação ≤ 102,0%	

Tabela 32: Resultado da repetibilidade – Fludarabina 50mg

Amostras	Analista 1	Analista 2
	Área	Área
1	471,567	473,366
2	464,109	471,473
3	474,851	471,773
4	471,261	472,290
5	465,606	471,655
6	462,630	472,491
Média	468,337	472,175
DPR_{intra-dias}(%)	1,04	0,15
Especificação	DPR ≤ 2,0%	
DPR_{inter-dias} (%)	0,7	
Especificação	DPR ≤ 2,0%	

Na determinação da precisão foram obtidos resultados de acordo com o especificado para a adequação do sistema.

Os resultados obtidos do desvio padrão para o padrão de referência, padrão de confirmação e a amostra de 50mg demonstram uma precisão aceitável para a validação de métodos analíticos uma vez que os valores se encontram abaixo de 2% considerados aceitáveis conforme ANVISA, 2003, 2017.

6. CONCLUSÕES

"We do not know a truth without knowing its cause"

Aristotle

6. CONCLUSÕES

- A determinação do fármaco Pemetrexede foi possível através da cromatográfica líquida em fase reversa com detecção UV com, especificidade, precisão, exatidão e robustez. Oferecendo resultados de acordo com os critérios de aceitação para os todos os parâmetros requisitados na análise de Ativos em medicamentos.
- A metodologia por CLAE-UV precisa ser agregada em todas as etapas da produção e controle de qualidade, junto a uma metodologia microbiológica para melhor avaliar a qualidade de Pemetrexede em pó liofilizado.
- O método desenvolvido e validado neste trabalho contribui com o meio científico servindo como fundamento para futuros trabalhos físico-químicos com o intuito de melhorar o controle de qualidade e resguardar a segurança e eficácia de Pemetrexede em líofilos.
- Com os resultados obtidos e discutidos na adequação de método para Idarrubicina infere-se que a metodologia se encontra validada e é adequada para uso em rotina nas análises de controle de qualidade.
- A adequação do método para Fludarabina, atendeu todos os critérios de aceitação por tanto o mesmo pode ser empregado no controle de qualidade do fármaco em pó liofilizado injetável.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

"Everything you can imagine is real."

Pablo Picasso

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Diversos medicamentos de alto custo precisam do desenvolvimento, adequação e/ou validação das metodologias analíticas para o controle de qualidade, procurando parcerias com a iniciativa privada. Pretende-se para continuar oferecendo possibilidades analíticas como uma forma de contrapartida com a sociedade e a população que merece medicamentos de qualidade.
- A determinação dos fármacos neste trabalho foi realizada por cromatografia líquida em fase reversa e detecção UV, pretendendo-se no futuro pesquisar a possibilidade de implementação de outras técnicas de detecção mais específicas, como a Fluorimetria ou quimiluminescência, e procurar desenvolver métodos mais econômicos, mas com especificidade, precisão, exatidão e robustez, oferecendo resultados em concordância com os critérios de aceitação para todos os parâmetros requisitados na análise de princípios ativos em medicamentos.
- No desenvolvimento desta dissertação foi seguido estritamente os protocolos de validação da ANVISA, pretendendo-se estabelecer uma comunicação direta com esta autarquia, buscando intercambiar experiências e oferecer sugestões para possíveis atualizações dos protocolos de validação.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"Never again will a single story be told as though it's the only one."

John Berger

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] AGRAWAL, S. K., RATHORE D. S., Development and validation of pemetrexed by rp-hplc method in bulk drug and pharmaceutical dosage forms, *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, v,1(4), p. 537-547, 2013.
- [2] BANU, T. VARANASI, M. B. KHAN, M.M.A. SHARMA J.V.C, TEJA B.B, KUMAR, V.S. HABIBUDDIN, M. Validated reverse phase HPLC method for the determination of pemetrexed disodium in pharmaceutical dosage forms, *Oriental J Chem*, v.26, p. 1325-1332, 2010.
- [3] BRASI, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - julho, 2017.
- [4] BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. LEI Nº 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999.
- [5] BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 2003.
- [6] BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução &. Diário Oficial da União. Brasília-DF, p. 28, 2004.
- [7] BRASIL, Farmacopeia Brasileira, volume 1 e 2, 5ª eds. / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p.546, 2010.
- [8] BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014 – 9. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 228, 2015.
- [9] BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde (SUS), Elenco oficial dos medicamentos disponibilizados gratuitamente pelo programa aqui tem farmácia popular, junho-2015 Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/01/Lista-Site-Medicamentos-SNTP- -- JUNHO-2015.pdf>.
- [10] BULGAR, A.D. et al, Targeting base excision repair suggests a new therapeutic strategy of fludarabine for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, *Leukemia*. v. 24, p. 1795-1799, 2010.
- [11] BURGIN, M., GAIRARD-DORY, A., MENNECIER, B., MOLARD, A., BERETZ, L., QUOIX, A., First-line treatment with pemetrexed in association with cisplatin in patients with non- operable malignant pleural mesothelioma, *Rev. Pneumol. Clin*. v. 65, p. 75–83, 2009.

- [12] BURRELL, R. A., BARTEK, M. J., SWANTON, Charles. 1. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. v. 50, p. 343, 2013.
- [13] CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Review Cancer*. v. 8, p.579-591, 2004.
- [14] CARNEY, D. A. et al., Myelodysplasias: Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia following fludarabine combination chemotherapy, *Leukemia* v. 24, p. 2056-2062, 2010.
- [15] DAI H, CHEN, Y. ELMQUIST, W.F. Distribution of the novel antifolate pemetrexed to the Brain, *JPET Fast Forward*, v. 315, p. 222-229, 2005.
- [16] DELANEY G, et al, The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines, *Cancer* v. 104, p. 1129-1137, 2005.
- [17] FEKETE, S. OLÁH, E., FEKETE, J. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles, *Journal of Chromatography A*. v1228, p. 57-71, 2012.
- [18] FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, v. 136, p. E359-E386, 2014.
- [19] Food and Drug Administration(FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Reviewer Guidance – Validation of chromatographic methods, November 1994.
- [20] GANDHI, V., PLUNKETT, W. Cellular and clinical pharmacology of Fludarabine *Clin. Pharmacokinet*. v. 41, p. 93-103, 2002.
- [21] GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, v.68, n.9, p. A305-a309, 1996.
- [22] HAHN, W. C.; WEIBERG, R. A. Reviews Cancer. **Nature**, Massachusetts, v.2, n. 331, 2002.
- [23] HANAUSKE A.R, CHEN V, PAOLETTI P, NIYIKIZA C, Pemetrexed disodium: A novel antifolate clinically active against multiple solid tumors, *The Oncologist*, v. 6, p. 363-373, 2001.
- [24] HC-UFTM, Protocolo de administração de quimioterápicos antineoplásicos EBSERH. Disponível em: <http://www.ebserh.gov.br/web/hc-uftm/protocolos> Acesso em: 06 de março de 2017.
- [25] INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL). Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE- 2003.

- [26] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – Rio de Janeiro (INCA), Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1> Acesso em: 11 de março de 2017.
- [27] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) WHO press, 2015, World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Advances in nutrition. v.7 p. 418-419, 2016
- [28] INTERNATIONAL AGENCY OF CANCER RESEARCH (IARC). Nutrition and Metabolism - Nutritional Epidemiology Group. Lyon, France. 2016
- [29] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Nov. de 2005.
- [30] KAMIYA, K. HUANG, P. PLUNKETT, W. Inhibition of the 3' --> 5' exonuclease of human DNA polymerase epsilon by fludarabine-terminated DNA. J. Biol. Chem. v. 271, p. 19428, 1996.
- [31] KEITH, L. H., GRON, L. U., YOUNG, J. L. Green Analytical Methodologies. Chemical Reviews. v. 107, n. 6, p. 2695-2708, 2007.
- [32] KIM CS, ALGAN O. Radiation Therapy, Breast Cancer Early Stage. [Updated 2017 Oct 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459174/>
- [33] LAKSHMI B, RAMA KRISHNA K & JAYAVEERA K N, New RP-HPLC Method for the Determination of Fludarabine in Pharmaceutical Dosage Forms, Journal of Pharmacy and Chemistry. v. 8, p. 22-25, 2014.
- [34] LI W, YAN S, Determination of pemetrexed in sprague- dawley rats by LC/MS/MS and study on its pharmacokinetics, Asian J Pharmacodynamics and Pharmacokinetics, v. 6, p. 280-288, 2006.
- [35] LIGIBEL, J. A. et al. Randomized phase III trial evaluating the role of weight loss in adjuvant treatment of overweight and obese women with early breast cancer (Alliance A011401): study design, NPJ Breast Cancer v. 37, n. 3, p. 1-7, 2017.
- [36] MARKUS, R. MEYER, et al, Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. Rapid communications in mass spectrometry. v. 24, p. 3103-3108, 2010.
- [37] MAUDENS, K., Stove, C., Cocquyt, V., Denys, H., & Lambert, W. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. Journal of Chromatography B, v. 877(30), p. 3907–3915, 2009.

- [38] MBUNA, J. et al. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for application in intracellular investigation of anthracyclines and multidrug resistance. *v. 31, p. 1127-1128, 2015.*
- [39] MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; GIANNI, L.; MINOTTI, G. Anthracycline cardiotoxicity. *Topics in Current Chemistry v. 283, p. 21-28, 2008.*
- [40] MURAD, A. M.; KATZ, A. *Oncologia bases clinicas do tratamento, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; Monografia – Indicação Geral dos Agentes Antineoplásicos, 1996.*
- [41] NAMERA, A.; SAITO, T.; *Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis, Trac-Trend. Anal. Chem., v. 45, p. 182-196, 2013.*
- [42] NOBRE, F. et al. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Rev Bras Hipertens v.17(1), p7-10, 2010.*
- [43] NOVÁKOVÁ, L.; SANTÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. CLAE methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *Trends in Analytical Chemistry, v. 27, n. 4, p. 352-367, 2008.*
- [44] PATEL, A. D., “Development and validation of high performance liquid chromatographic and UV Spectrophotometric method for estimation of Pemetrexed Disodium in bulk drug and Pharmaceutical Formulation”, *Int J. Drug Dev. & Res., April-June v. 3, n. 2, p. 301-307, 2011.*
- [45] *Protocolo de Validação de Método Analítico para Determinação de Teor e Identificação de Pemetrexede em Pemetrexede 500 mg/frasco Pó Liofilizado para Solução Injetável, Chemicaltech®, 2016.*
- [46] PUCKETT Y, CHAN O. Cancer, Leukemia, Lymphocytic, Acute (ALL) [Updated 2017 Oct 6]. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459149/>*
- [47] RIBEIRO R. L. V.; BOTTOLI C. B. G.; COLLINS K. E.; COLLINS C. H., *Reevaluation of Ethanol as Organic Modifier for Use in HPLC-RP Mobile Phases, J. Braz. Chem. Soc., v. 15, p. 300-306, 2004.*
- [48] SCHLUTER, H. Reversed-Phase Chromatography. In: KASTNER, M. *Journal of Chromatography Library (v. 61) -Protein Liquid Chromatography. Amsterdam: Elsevier Science B.V. p. 147, 1999.*
- [49] SIEGEL, R. et al. *Cancer statistics, CA: A cancer journal for Clinicians. v. 64, p. 9-29, 2014.*
- [50] SKOOG, D. A, et al. *Fundamentos de Química Analítica. Pioneira, São Paulo, 2006.*
- [51] TAKEZAWA, K. et al. Thymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer, *v.104, p.1594-1601, 2011.*
- [52] TSIMBERIDOU, A.M. KEATING, M. J. *Cancer. v. 115, p. 2824 -2836, 2009.*

- [53] USP. The United States Pharmacopeia. 38. ed. Rockville: United States Pharmacopeial 13 Convention, 2015.
- [54] USP. The United States Pharmacopeia. USP 37-NF 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention 2014.
- [55] USP. The United States Pharmacopeia. USP 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention 2016.
- [56] VEERARAGHAVAN, S. Simultaneous quantification of idelalisib, fludarabine and lenalidomide in rat plasma by using high-performance liquid chromatography coupled with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. v. 949-950, p. 63-69, 2014.
- [57] WADEKAR, K.R., MANKUMARE, S.D., MEERA, N., ADYANTH, K., CHAKRAVARTHY, T., RAVI P., Determination of Related Substances in Pemetrexed Disodium (Form-IV) in Bulk Drug Samples by HPLC, v. 38, 2014.
- [58] WANG J, YANG Y-G, ZHOU M, et al. Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials Comparing Idarubicin + Cytarabine with Daunorubicin + Cytarabine as the Induction Chemotherapy in Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukaemia. Hills RK, ed. PLoS ONE. 2013;8(4):e60699.
- [59] WEISS RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin. *Semin Oncol.* v19, p.670– 686, 1992.
- [60] WHITE, M. C. Holman D. M, Boehm J.E, Peipins L.A, Grossman M, Henley S.J, Age and Cancer Risk A Potentially Modifiable Relationship. *American Journal of Preventive Medicine.* v. 301, p.1-16, 2014.
- [61] WILSON, P. M. et al, Standing The Test Of Time: Targeting Thymidylate Biosynthesis In Cancer Therapy, v.11, p.282-298, 2014.
- [62] WONG, S., MARTIN C., XIANG, Q. L., KIN-FAI Ho, GOGGINS, W. B. & SHELLY L. A. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. *Scientific Reports.* v.7, 2017.
- [63] YANG, M.-C & GUO, Z.-F. Study on HPLC determination of idarubicin hydrochloride and related substances. 37. 945-948. 2002.
- [64] ZHANG Y, TRISSEL LA, *Oncology: Physical and chemical stability of pemetrexed solutions in plastic syringes, Ann Pharmacother,* v.39, p. 2026-2028, 2005.
- [65] ZHANG Y, TRISSEL LA, *Oncology: Physical and chemical stability of pemetrexed in infusion solutions, Ann Pharmacother,* v. 40, p. 1082-108, 2006.