



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento e validação de método analítico por  
cromatografia líquida para determinação do teor, impurezas  
orgânicas e produtos de degradação do insumo farmacêutico  
ativo Hemifumarato de Quetiapina**

**Crislaine Simão**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento e validação de método analítico por  
cromatografia líquida para determinação do teor, impurezas  
orgânicas e produtos de degradação do insumo farmacêutico  
ativo Hemifumarato de Quetiapina**

**Crislaine Simão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

**Orientador(a): Doutora Josiane Caetano Dragunski**

Toledo – PR, 2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Simão, Crislaine

Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida para determinação do teor, impurezas orgânicas e produtos de degradação do insumo farmacêutico ativo Hemifumarato de Quetiapina / Crislaine Simão; orientadora Josiane Caetano Dragunski. -- Toledo, 2024. 65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.

1. Cromatografia. 2. Estudo de degradação forçada. I. Caetano Dragunski, Josiane , orient. II. Título.

# **Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida para determinação do teor, impurezas orgânicas e produtos de degradação do insumo farmacêutico ativo Hemifumarato de Quetiapina**

**Crislaine Simão**

## **RESUMO**

O hemifumarato de quetiapina é um antipsicótico utilizado para o tratamento da esquizofrenia e transtorno bipolar. Por exigência da agência reguladora, é necessário garantir a qualidade do IFA que será empregado para a produção do medicamento. Um método seletivo e sensível de cromatografia líquida de ultra eficiência foi desenvolvido para a determinação quantitativa de impurezas orgânicas, produtos de degradação e hemifumarato de quetiapina no insumo farmacêutico ativo. A separação cromatográfica eficiente foi realizada utilizando como fase estacionária uma coluna de fase reversa Waters Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl com comprimento de 100 mm, 2,1 mm de diâmetro e 1,7 µm de tamanho de partícula. A fase móvel constituída por uma mistura de tampão acetato de amônio pH 9,0 e acetonitrila, no modo gradiente, com vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 3 µL, temperatura de 50 °C e detecção ultravioleta em 240 nm. Todos os parâmetros cromatográficos foram atendidos, com resolução superior a 1,5 entre hemifumarato de quetiapina, impurezas orgânicas e produtos de degradação. O hemifumarato de quetiapina também foi submetida a diversas condições de estresse no estudo de degradação forçada, onde comprovou-se que o método analítico é capaz de avaliar o decaimento de teor com a formação de impurezas, além de ser observado uma alta suscetibilidade do ativo a degradação por oxidação. Na sequência, o método foi validado de acordo com as diretrizes da ANVISA, avaliando seletividade, limites de quantificação, linearidade, exatidão, precisão e robustez, tanto para o ativo quanto para as impurezas orgânicas.

Palavras chave: degradação forçada, antipsicótico, gradiente, UPLC

**Development and validation of an analytical method by HUPLC-UV for the quantification of contend, organic impurities and degradation products of the active pharmaceutical ingredient Quetiapine Hemifumarate.**

**Crislaine Simão**

**ABSTRACT**

Quetiapine hemifumarate is an antipsychotic used for the treatment of schizophrenia and bipolar disorder. As required by the regulatory agency, it is necessary to guarantee the quality of the API that will be used for the production of the medicine. A selective and sensitive ultra-performance liquid chromatography method was developed for the quantitative determination of organic impurities, degradation products and quetiapine hemifumarate in the active pharmaceutical ingredient. Efficient chromatographic separation was performed using a Waters Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl reverse phase column with a length of 100 mm, 2.1 mm in diameter and 1.7  $\mu\text{m}$  particle size as a stationary phase. The mobile phase consisting of a mixture of ammonium acetate buffer pH 9.0 and acetonitrile, in gradient mode, with flow rate of 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , injection volume of 3  $\mu\text{L}$ , temperature of 50  $^{\circ}\text{C}$  and ultraviolet detection at 240 nm. All chromatographic parameters attended, with a resolution greater than 1.5 between quetiapine hemifumarate, organic impurities and degradation products. Quetiapine hemifumarate was also subjected to different stress conditions, in the forced degradation study, where it was proven that the analytical method is indicative of stability, in addition to observing a high susceptibility of the active to oxidation degradation. The method was validated according to ANVISA guidelines, evaluating selectivity, quantification limits, linearity, accuracy, precision and robustness, both for the active and for organic impurities.

Keywords: forced degradation, antipsychotic, gradient, UPLC

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

USP – Farmacopeia Americana, do inglês United States Pharmacopeia

BP – Farmacopeia Britânica, do inglês British Pharmacopeia

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

HPLC – Cromatógrafo líquido de alta eficiência, do inglês High Performance Liquid Chromatography

HUPLC – Cromatógrafo líquido de ultra eficiência, do inglês Ultra Performance Liquid Chromatography

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

EDF – Estudo de Degradação Forçada

UV – Ultravioleta

TR – Tempo de retenção

TRR - Tempo de retenção relativo

s/n – Razão Sinal ruído

LQ – Limite de quantificação

IM – Degradação por íons metálicos

SR – Substâncias Relacionadas

AU – Unidade de absorvância, do inglês Absorption Unit

DMSO – dimetilsulfóxido

ICH – International Council of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

FDA – Food and Drug Administration

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Nome, nome químico, estrutura química e limite das impurezas. [6,10].....	16
Tabela 2: Limites especificados para impurezas em fármacos. ....	18
Tabela 4: Gradiente conforme BP. ....	26
Tabela 5: Fatores avaliados na robustez do método. ....	31
Tabela 6: Gradiente. ....	31
Tabela 7: Gradiente conforme BP. ....	34
Tabela 8: Gradiente 1. ....	35
Tabela 9: Gradiente 2. ....	37
Tabela 10: Gradiente 3. ....	40
Tabela 11: Condições de estresse e tempo de exposição. ....	44
Tabela 12: Resultados obtidos para as degradações em HCl, NaOH, FeCl <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	49
Tabela 13: Resultados obtidos para as degradações físicas. ....	51
Tabela 14: Resultados do estudo da linearidade. ....	55
Tabela 15: Fator resposta relativo de cada impureza específica. ....	56
Tabela 16: Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária para a quantificação de quetiapina e impurezas inespecíficas. ....	57
Tabela 17: Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária para a quantificação das impurezas específicas. ....	58
Tabela 18: Resultados de exatidão para a quantificação de quetiapina. ....	59
Tabela 19: Sinal/ruído para hemifumarato de quetiapina e impurezas A, B, D, E, G e H no limite de quantificação (0,05%). ....	60
Tabela 20: Sinal/ruído para as impurezas I, J, N, P, Q, S e W no limite de quantificação (0,05%). ....	60
Tabela 21: Avaliação quantitativa da robustez para a quetiapina. ....	61
Tabela 22: Resultados obtidos para as soluções após período de armazenamento. ....	61

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do hemifumarato de quetiapina. [6] .....	14
Figura 2: Evidenciação dos grupamentos funcionais da molécula de hemifumarato de quetiapina.....	18
Figura 3: Representação da cromatografia clássica de coluna. [14] .....	19
Figura 4: Representação dos componentes de um cromatógrafo líquido. [14].....	21
Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas das Impurezas obtidas com o gradiente proposto pela BP.....	34
Figura 6: Cromatograma das Soluções Teste + Imp. N e da Impureza N sobrepostas com zoom para verificação da coeluição. ....	35
Figura 7: Cromatograma da solução teste fortificada com a impureza N. ....	36
Figura 8: Cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas utilizando o gradiente de eluição conforme Tabela 9. ....	38
Figura 9: A – cromatograma da solução teste na concentração de 4000 µg.mL <sup>-1</sup> fortificada com todas as impurezas na concentração de 0,10 e 0,15%. B – cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas com zoom na região de 25 a 39 minutos.....	39
Figura 10: Cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas no gradiente 3.40	
Figura 11: Cromatograma da solução mix das impurezas + ativo no LQ (0,05%).....	41
Figura 12: Cromatograma da solução padrão teor na concentração de 400 µg.mL <sup>-1</sup> no comprimento de 240 nm.....	42
Figura 13: Varredura do espectro de 200 a 400 nm para a solução padrão teor na concentração de 400 µg.mL <sup>-1</sup> .....	43
Figura 14: Cromatograma da solução teste SR na condição controle com zoom na linha de base.....	44
Figura 15: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação por íons metálicos com zoom na linha de base.....	45
Figura 16: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação alcalina com zoom na linha de base. ....	45
Figura 17: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação ácida com zoom na linha de base. ....	46
Figura 18: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação oxidativa com zoom na linha de base. ....	47
Figura 19: Possíveis impurezas decorrentes da oxidação. ....	48
Figura 20: Possíveis impurezas inespecíficas decorrentes da oxidação.....	48

Figura 21: Cromatograma da solução teste SR com zoom na linha de base: A – degradação térmica. B – degradação úmida. C – degradação fotolítica. ....	50
Figura 22: Sobreposição dos cromatograma das soluções teste SR em todas as condições de degradação.....	51
Figura 23: Avaliação da pureza espectral para o pico da quetiapina na amostra de degradação oxidativa. ....	53
Figura 24: Cromatograma da solução diluente.....	54
Figura 25: Cromatograma da solução teste fortificada para comprovar a seletividade do método.....	54
Figura 26: Perfil cromatográfico da solução teste SR no início (em preto) e final do intervalo de 56 horas (em azul).....	62

## SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO .....	12
2 -	OBJETIVOS .....	13
2.1	- Objetivo Geral.....	13
2.2	- Objetivos Específicos .....	13
3 -	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	- Insumo farmacêutico ativo .....	14
3.2	- Hemifumarato de Quetiapina .....	14
3.3	- Impurezas e Produtos de Degradação .....	15
3.4	- Cromatografia .....	19
3.5	- Validação do método analítico .....	22
3.5.1	- Seletividade .....	22
3.5.2	- Linearidade.....	23
3.5.3	- Faixa de trabalho (intervalo) .....	23
3.5.4	- Precisão .....	24
3.5.5	- Exatidão .....	24
3.5.6	- Limite de quantificação .....	25
3.5.7	- Robustez.....	25
4 -	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	25
4.1	- Equipamentos.....	25
4.2	- Reagentes, padrões e amostras .....	25
4.3	- Método da farmacopeia Britânica Substâncias Relacionadas .....	26
4.4	- Desenvolvimento do método .....	27
4.4.1	- Sistema Cromatográfico .....	27
4.4.2	- Soluções das Impurezas .....	27
4.4.3	- Estudo de degradação forçada.....	28
4.5	- Parâmetros de validação .....	29
4.5.1	- Seletividade .....	29
4.5.2	- Linearidade.....	29
4.5.3	- Precisão .....	30
4.5.4	- Exatidão .....	30
4.5.5	- Limite de quantificação .....	31
4.5.6	- Robustez.....	31
4.6	- Método final .....	31

4.6.1 - Sistema Cromatográfico .....	31
4.6.2 - Método para quantificação de Impurezas.....	32
4.6.3 - Método para quantificação de Teor.....	32
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1 - Desenvolvimento do método analítico .....	32
5.1.1 - Otimização do gradiente para separação da Impureza N e da Quetiapina ..	35
5.1.2 - Otimização do gradiente para separação das Impurezas G e Q.....	37
5.1.3 - Alteração da concentração da Solução Teste.....	38
5.1.4 - Otimização do gradiente para melhorar a seletividade do método.....	40
5.1.5 - Avaliação do LQ.....	41
5.1.6 - Definição da concentração de trabalho para quantificação de teor do ativo .....	41
5.1.7 - Estudo de Degradação Forçada .....	43
5.1.7.1- Estudo de Degradação por íons metálicos .....	44
5.1.7.2 – Estresse alcalino.....	45
5.1.7.3 – Estresse ácido.....	46
5.1.7.4 – Estresse oxidativo .....	47
5.1.7.5 – Estresses Físicos.....	49
5.1.7.6 – Avaliação da Homogeneidade Espectral .....	52
5.2 Validação do método analítico .....	53
5.2.1 - Seletividade.....	53
5.2.2 - Linearidade.....	54
5.2.3 - Determinação de Fator resposta das Impurezas Específicas.....	56
5.2.4 - Precisão.....	57
5.2.5 - Exatidão.....	59
5.2.6 - Limite de quantificação .....	60
5.2.7 - Robustez.....	60
6 - CONCLUSÃO .....	62
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## 1 - INTRODUÇÃO

O hemifumarato de quetiapina é um medicamento utilizado para tratamento de esquizofrenia e distúrbio bipolar, que apresenta pouquíssimas contra indicações e reações adversas, e com isso facilita a adesão do paciente ao tratamento.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável por garantir que um medicamento registrado para comercialização no Brasil, tenha os requisitos necessários para que o mesmo apresente qualidade, segurança e eficácia.

Dentro desse cenário, uma das exigências da ANVISA é com relação as características do insumo farmacêutico ativo (IFA), que fará parte da formulação para produção do medicamento. A empresa que irá produzir o medicamento deverá garantir que o IFA apresenta os requisitos de qualidade, inclusive após armazenamento e transporte, até que o mesmo seja utilizado, visto que uma baixa qualidade deste impacta diretamente no medicamento.

A rota de síntese de produção do IFA, por si só, já faz com que o mesmo apresente uma quantidade de impurezas, que devem ser controladas, além das impurezas que podem surgir devido a degradação da molécula do IFA.

Realizar o controle e quantificação de todas essas impurezas e produtos de degradação, que podem estar presentes em um IFA, é um grande desafio, pois o método analítico adotado deve ser indicativo de estabilidade. Isso significa que, em um único método analítico, é possível quantificar o decaimento de teor com o aumento dos produtos de degradação ao longo do tempo.

O método analítico adotado com a finalidade de identificação e quantificação podem ser as que se encontram descritas em farmacopeias nacionais e internacionais. Essas, por sua vez, são um pouco menos específicas, pois não levam em consideração todas as particularidades de cada rota de síntese possível para o IFA, o que impacta nas características finais do IFA.

O presente estudo teve como finalidade desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade, seguindo as legislações vigentes, para quantificação do teor de hemifumarato de quetiapina, 13 impurezas específicas (impurezas que são conhecidas deste IFA e descritas nos compêndios oficiais – impureza A, B, D, E, G, H, I, J, N, P, Q, S e W), e dos potenciais produtos de degradação que podem surgir no IFA, utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), de acordo com as legislações vigentes.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Desenvolver e validar um método analítico, capaz de avaliar o decaimento de teor com a formação de impurezas (indicativo de estabilidade), por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção UV (UPLC), para quantificação de hemifumarato de quetiapina, suas impurezas orgânicas e produtos de degradação.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

Desenvolver método seletivo para as principais impurezas de síntese e produtos de degradação de hemifumarato de quetiapina;

Expor o IFA a condições de estresse (hidrólise, oxidação, fotólise, calor e umidade) para verificar a seletividade do método e a capacidade de quantificação dos produtos de degradação gerados;

Identificar e quantificar, com precisão e exatidão as principais impurezas de síntese do IFA e os produtos de degradação;

Validar o método desenvolvido de acordo com as normativas vigentes da ANVISA.

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - Insumo farmacêutico ativo

Insumo farmacêutico ativo (IFA), que também pode ser denominado fármaco ou simplesmente princípio ativo, é o componente farmacologicamente ativo, podendo exercer atividade farmacológica ou efeito direto no diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de uma doença, ou ainda afetar o funcionamento do organismo humano. [1,2]

A grande maioria dos insumos farmacêuticos utilizados para a produção de medicamentos no Brasil é importada dos principais países desenvolvidos e/ou de países em desenvolvimento, como China, Índia, Israel e Coreia. [3]

A etapa de síntese do IFA é uma etapa muito importante, pois determina diretamente a qualidade, segurança e eficácia do medicamento que será produzido na sequência.

Para fabricação de um medicamento, o mesmo é produzido com o IFA e os excipientes. Os excipientes também são substâncias químicas, mas não têm função farmacológica e entram na formulação para ajudar a produzir uma determinada forma farmacêutica, como comprimido ou solução. [4]

A tecnologia utilizada na síntese química para obtenção do fármaco envolve a transformação de compostos químicos, com a alteração de suas estruturas moleculares até a obtenção da molécula de interesse (princípio ativo), enquanto a etapa de formulação exige conhecimentos farmacotécnicos. [5]

#### 3.2 - Hemifumarato de Quetiapina

O hemifumarato de quetiapina (*Bis[2-[2-[4-(dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethanol] (2E)-but-2-enedioate*) é um pó fino de branco a quase branco. Solúvel em água, etanol anidro e metanol, têm massa molecular de 883,09 g.mol<sup>-1</sup> e fórmula molecular (C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. [6] Na Figura 1 encontra-se a estrutura química do hemifumarato de quetiapina.

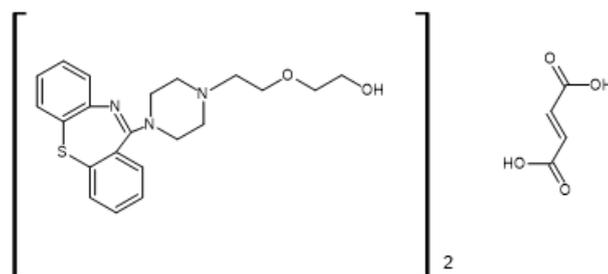


Figura 1: Estrutura química do hemifumarato de quetiapina. [6]

A quetiapina pertence a um grupo de medicamentos chamado antipsicóticos, os quais melhoram os sintomas de alguns tipos de transtornos mentais, como esquizofrenia e episódios de mania e de depressão associados ao transtorno afetivo bipolar. [7]

Segundo Oliveira embora o mecanismo de ação da quetiapina não seja totalmente compreendido, a possível ação farmacológica deste antipsicótico atípico, ocorre a partir da combinação da ação farmacológica simultânea nos receptores de serotonina (5HT<sub>2</sub>) com os dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, sendo esta a provável explicação para os efeitos antipsicóticos deste fármaco e assim, o caracteriza como um fármaco atípico sendo que o tratamento deve ser iniciado com pequenas doses e ser aumentada gradativamente, até atingir a resposta terapêutica desejada.[8]

### **3.3 - Impurezas e Produtos de Degradação**

De acordo com a RDC 359 de 27 de março de 2020, para uma empresa conseguir realizar o registro de um IFA, esta deve apresentar uma discussão detalhada das potenciais impurezas presentes neste IFA. [2]

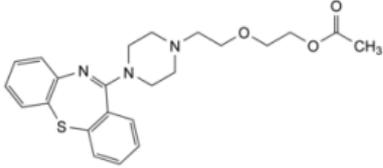
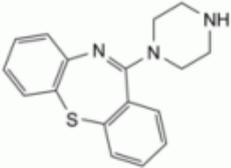
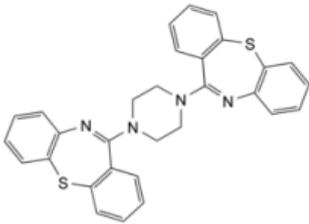
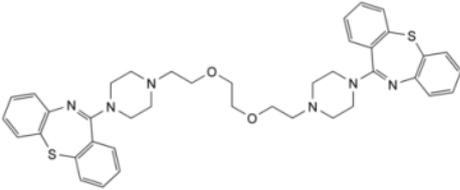
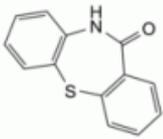
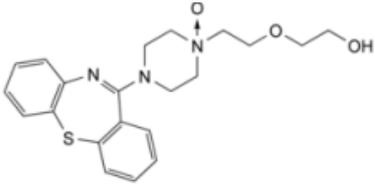
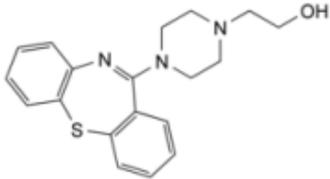
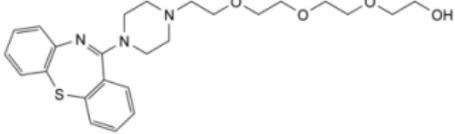
Impurezas são quaisquer componentes presentes no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s). [1]

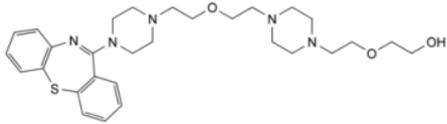
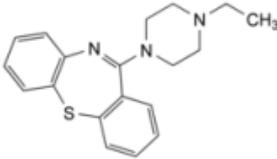
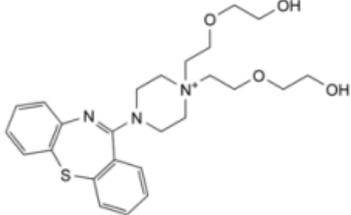
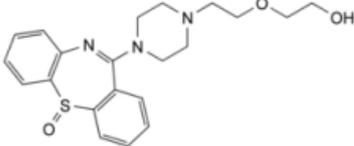
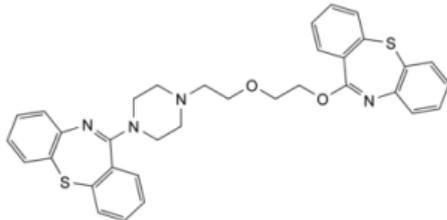
As impurezas podem ser classificadas nas seguintes categorias: a) impurezas orgânicas; b) impurezas inorgânicas; c) solventes residuais. [9]

As impurezas orgânicas podem ser formadas durante o processo de síntese e/ou durante o armazenamento do IFA. Estas podem ser específicas (a estrutura molecular foi possível de ser identificada) ou inespecíficas, voláteis ou não-voláteis. Incluem os materiais de partida, sub produtos da síntese, intermediários de reação, produtos de degradação, reagentes, ligantes e catalisadores de reação. [9]

O fabricante do IFA objeto deste estudo declara em sua documentação que o hemifumarato de quetiapina sintetizado por sua empresa, pode ter a presença de até 13 impurezas específicas, que estão apresentadas na Tabela 1, onde consta o nome, nome químico, estrutura química e limite da impureza. O nome descrito para cada impureza nesta tabela é o mesmo nome que a BP aplica na sua monografia.

Tabela 1: Nome, nome químico, estrutura química e limite das impurezas. [6,10]

Nome	Nome Químico	Estrutura Química	Limite (%)
Impureza A	2-[2-[4-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethyl acetate		≤ 0,10
Impureza B	11-(piperazin-1-yl)dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepine		≤ 0,15
Impureza D	11,11'-(piperazine-1,4-diyl)bis(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepine)		≤ 0,10
Impureza E	11,11'-[ethylenebis(oxyethylene)piperazine-4,1-diyl]]bis(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepine)		≤ 0,10
Impureza G	dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11(10 <i>H</i> )-one		≤ 0,15
Impureza H	2-[2-[4-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)-1-oxidopiperazin-1-yl]ethoxy]ethanol,		≤ 0,10
Impureza I	2-[4-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethanol,		≤ 0,15
Impureza J	2-[2-[2-[2-[4-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol,		≤ 0,10

<b>Impureza N</b>	2-[2-[4-[2-[2-[4-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethyl]piperazin-1-yl]ethoxy]etanol		≤ 0,15
<b>Impureza P</b>	11-(4-ethylpiperazin-1-yl)dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepine		≤ 0,15
<b>Impureza Q</b>	4-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)-1,1-bis[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-ium		≤ 0,15
<b>Impureza S</b>	2-[2-[4-(5-oxidodibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yl)piperazin-1-yl]ethoxy]ethano		≤ 0,10
<b>Impureza W</b>	11-(4-[2-[2-(dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepin-11-yloxy)ethoxy]ethyl]piperazin-1-yl)dibenzo[ <i>b,f</i> ][1,4]thiazepine		≤ 0,10

A especificação adotada pelo fabricante do IFA é da farmacopeia americana, que apresenta em sua monografia *Organic Impurities* o controle das impurezas conforme apresentado na tabela acima, além da especificação de 0,10% para impurezas inespecíficas, 0,50% para impurezas totais e limite de quantificação de 0,05%. [10] Essas especificações também foram adotadas nos estudos de desenvolvimento e validação do método analítico proposto neste trabalho.

Esta especificação está harmonizada, com o proposto no guia do ICH [9] e no guia do Food and Drug Administration (FDA) [11], que especificam os limites aceitáveis para as impurezas, conforme apresentado na Tabela 2.

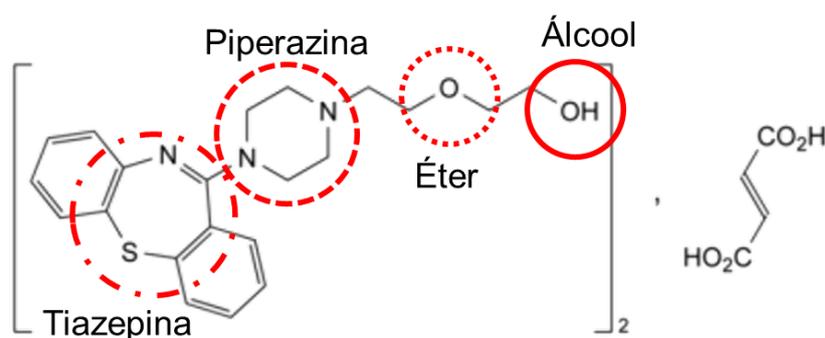
**Tabela 2: Limites especificados para impurezas em fármacos.**

Dose máxima diária	Limite de notificação	Limite de identificação	Limite de quantificação
≤ 2 g/dia	0,05%	0,10% ou 1,0 mg por ingestão diária (o que for mais baixo)	0,15% ou 1,0 mg por ingestão diária (o que for mais baixo)
≤ 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

Fonte: Guia Q3A (R2) ICH – Impurities in new drug substances.[9]

A dose máxima de consumo diária de Hemifumarato de Quetiapina é de 800 mg, por isso o limite de notificação é 0,05%, o limite de identificação é 0,10% e o limite de quantificação é de 0,15%.

Os grupos funcionais presentes na molécula de hemifumarato de quetiapina são apresentados na Figura 2, onde foram destacados quatro grupos químicos de relevância, onde podem ocorrer reações para formação dos produtos de degradação. Destaca-se que o anel aromático não foi sinalizado devido ao mesmo possuir características de alta estabilidade frente a reações e agir somente como coadjuvante com o efeito indutivo.



**Figura 2: Evidenciação dos grupamentos funcionais da molécula de hemifumarato de quetiapina.**

Para entender os possíveis produtos de degradação, é necessário compreender a reatividade química individual de cada grupamento, considerando ainda as reações cruzadas entre a própria molécula. Uma das ferramentas que pode ser utilizada para a predição destas impurezas é o estudo laboratorial com exposição a diversos agentes químicos para forçar a reação.

A agência europeia (EMA), apresenta em seu guia ICH Q1A (R2) que testes de estresse devem ser conduzidos no IFA, onde deve ser avaliado os efeitos da temperatura, umidade, oxidação, fotólise e também a avaliação da susceptibilidade do IFA a hidrólise em

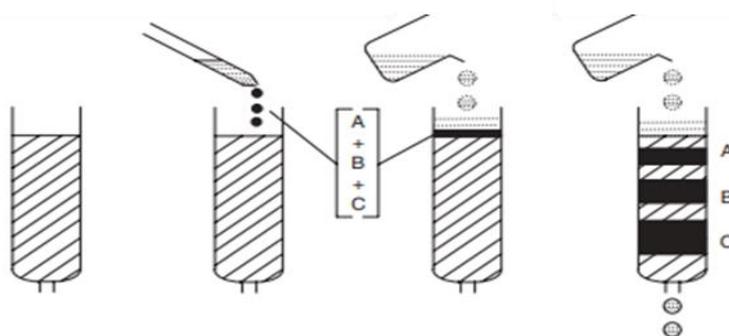
uma ampla faixa de pH. Avaliar estes produtos de degradação é útil para estabelecer as vias de degradação do IFA e, com isso, desenvolver e validar um método analítico adequado, que seja capaz de detectar esses produtos de degradação com o decaimento do teor do ativo. [12]

Esses produtos originados do estudo de degradação forçada e identificados como impurezas específicas serão controlados, para garantir a integridade do IFA após transporte e armazenamento, durante o tempo de validade do mesmo. Uma das técnicas muito utilizadas para a controle destas impurezas e produtos de degradação é a cromatografia.

### 3.4 - Cromatografia

A cromatografia é um técnica físico-química de separação, que se baseia na interação de duas fases com os componentes de uma mistura. O termo cromatografia surgiu com o botânico russo, Mikhael Semenovich Tswett, que descreveu em seus trabalhos em 1906, sobre a separação dos componentes do extrato de folhas. [13]

Esta técnica relatada por Tswett é utilizada até os dias atuais, onde continua-se realizando a separação de componentes de uma mistura, conforme apresentado na Figura 3, através da utilização de uma coluna de vidro com sólidos finamente divididos. A amostra é adicionada no topo desta coluna, e um solvente, chamado de fase móvel, é também adicionado ao topo da coluna após a adição da amostra. Ao descer por gravidade, nesta coluna, a fase móvel vai interagindo com a amostra, e à medida que vai ocorrendo a passagem pela coluna da fase móvel com a amostra, a separação dos componentes da amostra acontece. Isto se dá devido as interações que acontecem entre amostra com a fase móvel e a amostra com a fase estacionária. Quanto maior a interação do componente da amostra com a fase estacionária, maior o tempo que este componente ficará retido na coluna, da mesma forma, que quanto menor está interação, mais rápido este componente sairá da coluna. [14]



**Figura 3: Representação da cromatografia clássica de coluna. [14]**

Na década de 1930, a técnica da cromatografia foi aperfeiçoada e rendeu 2 prêmios Nobel. Em 1960, surgiu a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC). [15]

Já em 2000, foi criada a cromatografia ultra rápida (do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography* – UHPLC). [16]

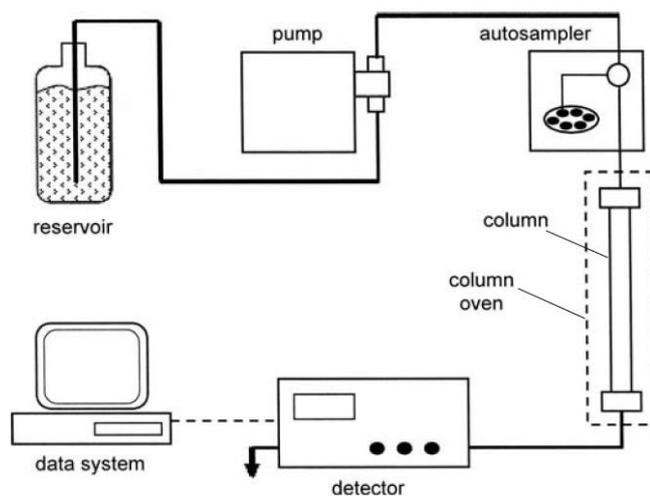
### **3.4.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência**

Como evolução da cromatografia de coluna, surgiu a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que é uma técnica analítica usada para separar e quantificar componentes numa mistura líquida.

A utilização de fase estacionária com partículas pequenas e uso de bombas de alta pressão para eluição da fase móvel é a responsável pela alta eficiência desse método de cromatografia. A fase móvel (líquida) movimenta-se continuamente através da coluna contendo a fase estacionária (sólido). A amostra que será separada interage com a fase estacionária e a fase móvel por adsorção (separação sólido-líquido), partição (separação líquido-líquido), exclusão molecular ou troca iônica. [14]

### **3.4.2 - Cromatógrafo à líquido**

Um equipamento de cromatografia líquida pode ser dividido em vários componentes, também chamados de módulos, ou então os componentes podem ser combinados em um único gabinete como um sistema “integrado”. Os principais componentes de um cromatógrafo são: reservatório de fase móvel, sistema de bombeamento, injetor, forno, coluna, detector e sistema de aquisição e controle de dados. A Figura 1 apresenta um esquema com os componentes básicos de um cromatógrafo. [17]



**Figura 4: Representação dos componentes de um cromatógrafo líquido. [14]**

No reservatório, a fase móvel e os demais solventes para a operação do cromatógrafo são armazenados. Esse módulo pode ser equipado com um sistema de degaseificação e filtros especiais para cada recipiente, a fim de evitar a entrada de particulados no sistema. A fase móvel é puxada do reservatório pela bomba, que controla e mantém um fluxo contínuo e constante para dentro da coluna. Os cromatógrafos atuais, são equipados com bombas que permitem a mistura de mais de um solvente provenientes de reservatórios diferentes. [17]

O injetor, juntamente com o auto amostrador, é responsável por inserir um determinado volume da amostra no sistema, um pouco antes da coluna, sem que o fluxo de fase móvel para a coluna seja reduzido. A separação acontece na coluna, considerada o coração da técnica. Diferentes tipos de colunas podem ser utilizados, dependendo das características dos analitos a serem separados. A coluna é fixada dentro do forno, onde a temperatura pode ser controlada. Após a separação, o detector responde as alterações na concentração dos analitos no fluxo da fase móvel, registra o sinal obtido e os dados são então armazenados no sistema. O sistema de controle de dados é o responsável por direcionar as funções dos diferentes módulos. [17,18]

### 3.4.3 - Cromatografia líquida de ultra eficiência

A cromatografia líquida de ultra eficiência (HUPLC) foi desenvolvida a fim de utilizar partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , com o máximo de desempenho cromatográfico. Esse sistema é até 20 vezes mais rápido e têm a capacidade de trabalhar com altas pressões (até 15000

psi). Para conseguir este melhor desempenho cromatográfico, foram necessárias alterações no equipamento e nas colunas cromatográficas, para que fosse possível trabalhar com pressões tão elevadas. [16]

A cromatografia líquida de ultra eficiência é uma técnica bastante recente, mas já está sendo utilizada em análises de rotina em diversas áreas, pois existem muitas vantagens atreladas a esta técnica. Entre essas vantagens temos: análises mais rápidas, menor consumo de solventes, menor geração de resíduos, maiores eficiências de separação e melhor detectabilidade (de 2 a 3 vezes maior) quando comparadas às análises realizadas usando HPLC. [16]

### **3.5 - Validação do método analítico**

De forma geral, a validação analítica consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Com isso o objetivo final de um processo de validação é fornecer evidências (documentadas) que o método proposto irá gerar resultados confiáveis durante a utilização do mesmo na rotina laboratorial. [1]

A escolha de um método adequado para cada insumo farmacêutico ou forma farmacêutica têm grande importância na confiabilidade dos dados que serão gerados nas análises de controle de qualidade. Para cada método analítico, é necessário evidenciar, por meio de resultados experimentais durante a validação analítica, a funcionalidade do mesmo, bem como realizar avaliação estatística dos resultados obtidos. [26]

De acordo com a legislação vigente da ANVISA, RDC 166 de 2017, os parâmetros mínimos que devem ser avaliados durante a validação do método analítico para quantificação de teor e impurezas são: exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), seletividade, limite de quantificação (não se aplica a método de doseamento do ativo), linearidade e intervalo.

#### **3.5.1 - Seletividade**

A seletividade de um método analítico é demonstrada através da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse inequivocamente na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. [1] Por exemplo, em um método de quantificação de impurezas, é necessário que o método analítico consiga identificar e quantificar as impurezas individualmente, independente de quantas impurezas estiverem presentes na amostra.

Em um método para quantificação de doseamento, impurezas e produtos de degradação, é necessário expor a amostra a condições de degradação em ampla faixa de pH, de oxidação, de calor e luz, para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação na quantificação. [1]

### **3.5.2 - Linearidade**

A linearidade de um método analítico deve ser comprovada pela capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa especificada para o método analítico. [1]

A legislação vigente (RDC 166 de 2017) define que, para demonstrar a linearidade do método, deve-se utilizar, no mínimo, três preparações (distintas) da substância química de referência em cinco concentrações diferentes.

A partir das respostas analíticas individuais obtidas, devem ser realizados os cálculos utilizando as concentrações reais das soluções, onde deve se construir um gráfico da concentração (eixo x) contra a resposta analítica (eixo y). O ajuste da curva de calibração é feito por meio de ferramentas estatísticas e deve ser utilizado um nível de significância de 5%. As duas variáveis (x e y) são relacionadas por meio da equação da reta  $y = a + bx$ , onde (a) é a interseção com o eixo y e (b) é o declive da curva analítica, esta equação deve ser estimada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente angular deve ter sua significância avaliada e o mesmo deve ser significativamente diferente de zero. Deve ser realizado a avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação ( $r^2$ ), onde o (r) deve estar acima de 0,990. Um gráfico de dispersão dos resíduos deve ser construído, acompanhado da sua avaliação estatística. [1].

### **3.5.3 - Faixa de trabalho (intervalo)**

A faixa de trabalho (intervalo do método analítico) deve ser determinada com base na linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão. [1]

Para métodos de teor, a faixa avaliada deve ser de 80 a 120% da concentração nominal da solução teste. Para métodos de quantificação de impurezas, a faixa deve ser do limite de quantificação à 120% da concentração no limite da especificação de cada impureza individualmente. [1]

### **3.5.4 - Precisão**

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio da análise de amostras preparadas conforme descrito no método analítico. [1]

Durante a realização de análises, existem erros que estão associados as etapas da própria análise. Na validação do método analítico, esses erros precisam ser estimados, visto que não é possível extinguir os mesmos. Caso esse erro persista durante várias análises, os valores individuais vão se localizar com maior incidência num valor médio. [27]

A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. [1]

Na repetibilidade, consideram-se as sucessivas medições realizadas por um único laboratório, com o mesmo responsável pela análise e utilizando os mesmos equipamentos, levando a uma proximidade entre os resultados realizados por nove determinações (três concentrações, baixa, média e alta, cada uma composta por três réplicas), ou seis réplicas (na concentração da solução teste) preparadas individualmente.

Na precisão intermediária, estabelece-se a precisão de resultados obtidos de análises feitas no mesmo laboratório, preparando as amostras nos mesmos níveis utilizados na repetibilidade, contudo com um intervalo de tempo, onde as análises são realizadas em dias diferentes por analistas diferentes. Por fim, a reprodutibilidade refere-se à realização da análise conforme a repetibilidade, porém realizada em laboratórios diferentes. [27]

### **3.5.5 - Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância com os resultados individuais obtidos e um valor aceito como verdadeiro. [1]

Para a avaliação da exatidão do método, são analisadas amostras em três níveis de concentrações (baixa, média e alta) em triplicata, contemplando o intervalo linear do método analítico. A exatidão será determinada a partir da relação percentual entre a concentração média experimental e a concentração teórica. [1]

As nove amostras que serão utilizadas para a avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente. [1]

### **3.5.6 - Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas. [1]

O limite de quantificação deve ser coerente com o limite de especificação da impureza, sendo que a razão sinal/ruído deve ser, no mínimo, de 10:1. [1]

Os parâmetros de precisão e exatidão devem ser testados nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação. [1]

### **3.5.7 - Robustez**

A robustez é um parâmetro que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. [1] Estas alterações possibilitaram analisar a confiança do método durante o uso na rotina laboratorial.

Para métodos quantitativos, os impactos das modificações causadas no resultado final deverão ser avaliados de acordo com mesmos critérios utilizados para a exatidão. [1]

Deve ser avaliado a robustez no preparo das amostras, onde deve-se avaliar a estabilidade das soluções analíticas, o tempo de extração e a compatibilidade dos filtros. Para métodos de cromatografia líquida, deve-se avaliar a variação do pH da fase móvel, a variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de coluna, a temperatura da coluna e fluxo da fase móvel. [1]

## **4 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 - Equipamentos**

Utilizaram-se os seguintes equipamentos: cromatógrafo líquido de ultra eficiência Acquity Hclass, do fabricante Waters; balança analítica modelo Excellence Plus XP 26, do fabricante Mettler Toledo; aparelho de ultrassom modelo Elmasonic P, do fabricante Elma; e sistema de purificação de água modelo Elix Technology Inside Integral 5, do fabricante Merck.

### **4.2- Reagentes, padrões e amostras**

Os reagentes utilizados foram acetato de amônio grau HPLC (Supelco), hidróxido de amônio grau P.A. (Synth), acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker), metanol grau HPLC (J.T.Baker), ácido clorídrico concentrado grau P.A.(Synth), hidróxido de sódio grau P.A.

(Neon), peróxido de hidrogênio grau P.A. (Neon), sulfato de cobre II grau P.A. (Synth). A matéria-prima de hemifumarato de quetiapina, lote 1374223, com validade até 08/2025, foi fabricada e fornecida por fabricante IPCA Laboratories Limited. O padrão de hemifumarato de quetiapina, lote 011-201108U, foi caracterizado pelo laboratório Labmass Laboratory. Os padrões de quetiapina para system suitability, ácido fumárico, impureza B e G, lotes R081H0, R05520, F002N0 e F00410, respectivamente, foram fornecidos pela USP. Os padrões da impureza A, D, E, I e W, lotes NW79785, ZG85541, GZ92247, OF27519 e NR6475, respectivamente, foram fornecidos pela Axios Research. Os padrões da impureza J, P, Q e N, lotes SL-YLR-122-170, SL-SHU-150-152, SP-032-168 e SP-0222-077, respectivamente, foram fornecidos pela SimSon Pharma Limited. Os padrões da impureza S e H, lotes Q0219YV e Q0208AV, respectivamente, foram fornecidos pela Olax Pharma Labs.

#### 4.3- Método da farmacopeia Britânica Substâncias Relacionadas

Para separação cromatográfica, utilizou-se a fase móvel A, que consiste de uma mistura 10 volumes de metanol e 90 volumes de solução tampão acetato de amônio, com pH ajustado para 9,0 com hidróxido de amônio. A fase móvel B foi composta de 100% acetonitrila, em um sistema gradiente, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3: Gradiente conforme BP.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Metanol:Tampão<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>
0	80	20
8	80	20
14,50	60	40
22,60	50	50
26	30	70
29	10	90
30	10	90
35	80	20
40	80	20

<sup>1</sup> – Na proporção 10:90 v/v

As condições do equipamento foram: detector de luz com arranjo de diodos no comprimento de onda de 240 nm, coluna de fase reversa Waters Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl com comprimento de 100 mm, 2,1 mm de diâmetro e 1,7 µm de tamanho de

partícula, fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 3 µL, temperatura do forno de 50 °C e tempo de corrida de 51 minutos.

Como diluente foi utilizado uma mistura de acetonitrila:água 50:50 v/v. A solução teste foi preparada na concentração de 2000 µg.mL<sup>-1</sup>. A solução padrão foi preparada diluindo a solução teste para a concentração de 2 µg.mL<sup>-1</sup>. A partir desse método que iniciou-se o desenvolvimento, utilizando o mesmo como base.

#### **4.4- Desenvolvimento do método**

##### **4.4.1 - Sistema Cromatográfico**

Baseado no método descrito na Farmacopeia Britânica, foram realizados ajustes para alcançar uma separação cromatográfica eficiente. A fase móvel foi constituída de tampão de acetato de amônio na concentração de 0,05 mol.L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 9,0 com solução de hidróxido de amônio P.A. no canal A, e acetonitrila no canal B. Foram avaliadas diferentes proporções destas soluções no sistema gradiente, para obtenção da adequada separação dos picos de interesse. Como diluente para solubilização dos padrões e amostras, foi utilizado a solução metanol:água na proporção 50:50. Foi utilizada a coluna de fase reversa Waters Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl com comprimento de 100 mm, 2,1 mm de diâmetro e 1,7 µm de tamanho de partícula. As condições de operação foram: fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 3 µL, temperatura do forno de 50 °C, tempo de corrida de 51 minutos e detecção no UV em 240 nm.

##### **4.4.2 - Soluções das Impurezas**

Para verificação da seletividade do método, foram preparadas soluções padrões de cada impureza individualmente. As soluções estoques (hemifumarato de quetiapina, ácido fumárico, impureza A, B, E, G, H, I, J, S, N, P, Q e W) foram preparadas na concentração de 200 µg.mL<sup>-1</sup> utilizando as substâncias químicas de referência e utilizando o diluente (metanol 50% v/v). A solução estoque da impureza D foi preparada na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>, utilizando como diluente DMSO. A partir destas soluções estoques, foram preparadas as soluções padrões individuais na concentração do limite da especificação das impurezas, sendo a concentração de 4 µg.mL<sup>-1</sup> para hemifumarato de quetiapina, ácido fumárico, impureza A, D, E, H, J, S e W e a concentração de 6 µg.mL<sup>-1</sup> para as impurezas B, G, I, N, P e Q utilizando o diluente (metanol 50% v/v). Foi preparada uma solução teste

fortificada com as impurezas, utilizando o IFA na concentração de 4000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e contaminando com as impurezas na concentração de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  impureza A, D, E, H, J, S e W e a concentração de 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as impurezas B, G, I, N, P e Q utilizando o diluente (metanol 50% v/v).

Para a avaliação do limite de quantificação do método, foi preparada uma solução mix com todas as impurezas e o ativo na concentração de 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (segundo o limite de quantificação proposto pela BP), utilizando o diluente (metanol 50% v/v).

#### **4.4.3 - Estudo de degradação forçada**

No estudo de degradação forçada, foram preparadas amostras na concentração de 4000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para avaliação da formação de impurezas e 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para quantificação do doseamento e avaliação da homogeneidade espectral do pico da quetiapina. Duas amostras controle foram preparadas sem a adição de agente degradante, a fim de utilizá-la como referência para o decaimento de teor e formação de impurezas nas condições estresse estudadas. As amostras com as condições de estresse foram preparadas na mesma concentração das amostras controle, e foram solubilizadas com o diluente (metanol 50% v/v). Em seguida, foi adicionado quantidade suficiente de cada agente degradante.

Para o estudo de degradação química, na hidrólise básica, as amostras foram submetidas a uma solução de NaOH 1  $\text{mol.L}^{-1}$ , por 10 dias à temperatura ambiente. Na hidrólise ácida, as amostras foram submetidas em solução a 1  $\text{mol.L}^{-1}$  de HCl, por 10 dias a temperatura ambiente. Para o estresse oxidativo, as amostras foram submetidas em solução a 3% v/v de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por 4 horas a temperatura ambiente. No estresse por íons metálicos, as amostras foram submetidas em solução a 5  $\text{mM.L}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_3$ , por 24 horas a temperatura ambiente.

Para o estudo de degradação física (estresse fotolítico, térmico e úmido) submeteu-se o pó do IFA as condições de estresse, em seguida foram preparadas amostras em solução nas mesmas concentrações das soluções controle, utilizando diluente (metanol 50%) para solubilização das amostras. Para o estresse fotolítico as amostras foram expostas a  $2,4 \times 10^6$   $\text{lux.h}^{-1}$ . Para o estresse térmico, as amostras foram submetidas a temperatura de 60 °C por 10 dias. Para o estresse úmido as amostras foram submetidas a temperatura de 40 °C com umidade relativa de 75%, por 10 dias. A homogeneidade espectral do pico de quetiapina foi avaliada em todas as condições de estresse estudadas por meio do emprego do *autothreshold* – ferramenta que determina a pureza do pico por

meio da avaliação dos ângulos de pureza e de limite – com absorção espectral inferior a 1 mAU.

## **4.5- Parâmetros de validação**

### **4.5.1 - Seletividade**

A seletividade do método foi determinada por meio do preparo de solução com a substância química de referência do ativo na concentração de  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e as impurezas conhecidas nas concentrações conforme especificação das mesmas preconizada na USP  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (ácido fumárico, impureza A, D, E, H, J, S e W) e  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (impureza B, G, I, N, P e Q) utilizando metanol 50% como diluente.

### **4.5.2 - Linearidade**

A avaliação da linearidade para o método de doseamento do ativo foi realizada mediante a obtenção de três curvas analíticas com cinco níveis cada, nas concentrações de 320, 360, 400, 440 e  $480 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , compreendendo o intervalo de 80% a 120% m/v da concentração nominal da solução amostra ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A avaliação da linearidade para as impurezas inespecíficas e impurezas A, D, E, H, J, S e W foi realizada mediante a obtenção de três curvas analíticas com cinco níveis de concentração de  $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $4,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , compreendendo o intervalo de 0,05% a 0,12% m/v da concentração nominal da solução amostra ( $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), abrangendo, desta forma, o intervalo de limite de desconsideração até 120% da especificação das impurezas (0,10%).

Para a avaliação da linearidade das impurezas B, G, I, N, P e Q foi realizada mediante a obtenção de três curvas analíticas com cinco níveis de concentração de  $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $7,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , compreendendo o intervalo de 0,05% a 0,18% m/v da concentração nominal da solução amostra ( $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), abrangendo, desta forma, o intervalo de limite de desconsideração até 120% da especificação das impurezas (0,15%).

A avaliação das linearidades foi realizada através do método dos mínimos quadrados, onde obteve-se a equação da reta e o cálculo do coeficiente de correlação linear. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), testes t e F, com nível de confiança de 95%. A avaliação estatística foi realizada por meio do Sistema *Action Stat 3.7*.

### 4.5.3 - Precisão

A repetibilidade do método de doseamento foi avaliada por meio de 6 amostras do IFA de quetiapina na concentração nominal da solução amostra ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A repetibilidade para a quantificação de impurezas inespecíficas foi avaliada por meio de 9 amostras, preparadas a partir do padrão de hemifumarato de quetiapina, em três níveis de concentrações: 2,0, 3,6 e  $4,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo, respectivamente, aos níveis 0,05%, 0,09% e 0,12% m/v em relação à concentração nominal da solução amostra ( $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A repetibilidade para a quantificação das impurezas A, D, E, H, J, S e W foi avaliada por meio de nove soluções amostras do IFA a  $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , contaminadas com alíquotas de soluções estoques padrão das impurezas em três níveis de concentração, desde o limite de desconsideração até 120% da especificação de cada impureza: 2,0, 3,6 e  $4,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo, respectivamente, aos níveis 0,05%, 0,09% e 0,12% m/v.

Para a avaliação da repetibilidade para a quantificação das impurezas B, G, I, N, P e Q foi avaliada por meio de nove soluções amostras do IFA a  $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , contaminadas com alíquotas de soluções estoques padrão das impurezas em três níveis de concentração, desde o limite de desconsideração até 120% da especificação de cada impureza: 2,0, 4,8 e  $7,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo, respectivamente, aos níveis 0,05%, 0,12% e 0,18% m/v.

A precisão intermediária foi avaliada da mesma forma que a repetibilidade, contudo, os ensaios ocorreram em dias distintos e com analistas diferentes.

### 4.5.4 - Exatidão

A exatidão para a quantificação de quetiapina foi avaliada por meio de 9 amostras preparadas a partir do padrão de hemifumarato de quetiapina, em três níveis de concentração: 320, 400 e  $480 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo, respectivamente, aos níveis 80%, 100% e 120% m/v em relação à concentração nominal da solução amostra ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com três réplicas em cada nível. A exatidão para a quantificação das impurezas inespecíficas e específicas foi avaliada concomitante ao parâmetro de precisão - repetibilidade.

#### 4.5.5 - Limite de quantificação

O limite de quantificação para este método foi de 0,05% m/v da concentração nominal da amostra ( $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para as impurezas inespecíficas e específicas, correspondente a 0,05% da concentração nominal da amostra ( $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Este parâmetro foi verificado experimentalmente, de acordo com o menor nível utilizado nas análises de linearidade (nível de limite de desconsideração).

#### 4.5.6 - Robustez

Os critérios testados na robustez foram o lote da coluna, temperatura da coluna, vazão da fase móvel, pH do tampão, composição da fase móvel, tempo de extração da solução amostra, estabilidade das soluções padrões e amostra. Desta forma, avaliou-se a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros no método analítico proposto.

**Tabela 4: Fatores avaliados na robustez do método.**

<b>Fatores</b>	<b>Original</b>	<b>Varição I</b>	<b>Varição II</b>
Tempo de ultrassom	5 minutos	3 minutos	10 minutos
Temperatura de coluna	50 °C	48 °C	52 °C
Vazão da fase móvel	$0,50 \text{ mL.min}^{-1}$	$0,45 \text{ mL.min}^{-1}$	$0,55 \text{ mL.min}^{-1}$
pH do Tampão	9,0	8,8	9,2
Composição da Fase móvel	3,85 g de acetato de amônio por litro	3,65 g de acetato de amônio por litro	4,05 g de acetato de amônio por litro

#### 4.6- Método final

##### 4.6.1 - Sistema Cromatográfico

A fase móvel foi constituída de um tampão de acetato de amônio na concentração de  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  com pH ajustado para 9,0 com solução de hidróxido de amônio P.A. no canal A e acetonitrila no canal C, em um sistema gradiente conforme Tabela 5.

**Tabela 5: Gradiente.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Tampão<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>
0	78	22
8	78	22
26	60	40

40	20	80
41	20	80
46	78	22
51	78	22

<sup>1</sup> – 100% tampão.

Como diluente para solubilização dos padrões e amostras foi utilizado uma solução de metanol:água na proporção 50:50 v/v. Foi empregada a coluna de fase reversa Waters Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl, com comprimento de 100 mm, 2,1 mm de diâmetro e 1,7 µm de tamanho de partícula. As condições de operação foram com fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 3 µL, temperatura do forno de 50 °C, tempo de corrida de 51 minutos e detecção no UV em 240 nm.

#### 4.6.2 - Método para quantificação de Impurezas

Para quantificação das impurezas, foi preparado uma solução padrão, empregando a substância química de referência caracterizada na concentração de 4 µg.mL<sup>-1</sup>, utilizando o diluente (metanol 50% v/v). A solução teste SR foi preparada com o IFA na concentração de 4000 µg.mL<sup>-1</sup>, também utilizando o diluente (metanol 50% v/v).

#### 4.6.3 - Método para quantificação de Teor

Para quantificação do doseamento de hemifumarato de quetiapina, foi preparado uma solução padrão utilizando a substância química de referência caracterizada na concentração de 400 µg.mL<sup>-1</sup>, com o diluente (metanol 50% v/v). A solução teste foi preparada a partir da solução teste SR (descrita no item acima) onde foi realizada a diluição da mesma para a concentração de 400 µg.mL<sup>-1</sup>, também utilizando o diluente (metanol 50% v/v).

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Desenvolvimento do método analítico

Atualmente compêndios oficiais descrevem nas monografias de cada IFA ensaios de quantificação e identificação.

Para o hemifumarato de quetiapina, a farmacopeia americana traz em seu compêndio o método de *Organic Impurity*, na monografia *Quetiapine Fumarate* onde está contemplado o controle de 7 impurezas de forma específica (impurezas B, D, G, I, J, P e Q). Já a farmacopeia britânica, harmonizada com a farmacopeia europeia, apresentam na monografia *Quetiapine Fumarate* o método de *Related Substances*, que controla apenas 2 impurezas de forma específica (impureza G e N). Entretanto, este IFA pode apresentar outras 19 impurezas (A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, O, P, Q, S, T, U, V, W) que podem ser detectadas neste método e devem ser controladas de forma inespecífica.

A definição de quais impurezas devem ser controladas no método analítico, procede do conhecimento sobre as potenciais impurezas que podem estar presentes no IFA, que são resultantes da síntese (materiais de partida, intermediários, reagentes), do processo de fabricação e dos produtos de degradação que podem surgir durante o armazenamento e transporte deste IFA.

O fabricante do IFA objeto desse estudo declara em sua documentação e certificado de análise que pode conter em seu IFA - Hemifumarato de Quetiapina 13 impurezas específicas (impurezas A, B, D, E, G, H, I, J, N, P, Q, S e W). Sendo assim, o objetivo deste método foi controlar estas 13 impurezas de forma específica e quantificar por meio do mesmo método analítico o teor do ativo.

Primeiramente, optou-se por testar o método descrito na farmacopeia britânica (BP), pois espera-se que esta tenha uma melhor seletividade, visto que está controla o maior número de impurezas (de forma inespecífica).

Antes de realizar as análises no cromatógrafo, foi avaliado a solubilidade das impurezas e do insumo farmacêutico ativo no diluente proposto pela BP, que é acetonitrila:água na proporção 50/50 v/v. Com este diluente, não foi possível solubilizar diversas impurezas. Assim, na sequência, realizou-se o teste de solubilidade utilizando o diluente metanol:água, mantendo a mesma proporção anterior 50:50 v/v, pois de acordo com Shasha *et al.* [19], em temperatura ambiente a quetiapina têm uma maior solubilidade em metanol e espera-se o mesmo cenário para as impurezas específicas, visto que as estruturas químicas são semelhantes à da quetiapina. Os testes de solubilidade mostraram que todas as impurezas e o ativo apresentaram solubilidade adequada no diluente metanol:água na proporção 50:50 v/v, sendo definido como o diluente para este método.

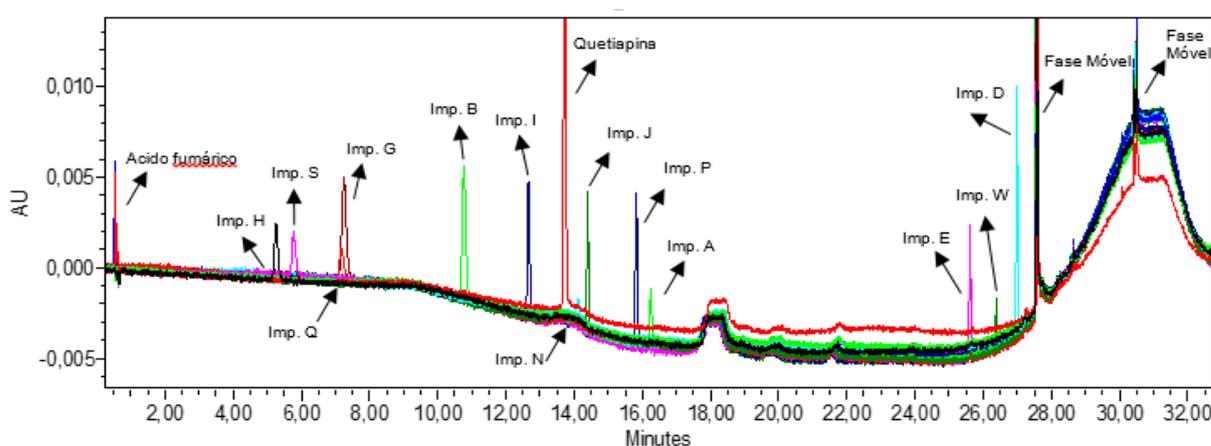
Após definir o diluente, optou-se por realizar o primeiro estudo cromatográfico utilizando o método de *Related Substances* descrito da farmacopeia britânica na íntegra (conforme descrito no item 4.3), com o gradiente descrito na Tabela 6.

**Tabela 6: Gradiente conforme BP.**

Tempo (min)	Metanol:Tampão <sup>1</sup> (%)	Acetonitrila (%)
0	80	20
8	80	20
14,50	60	40
22,60	50	50
26	30	70
29	10	90
30	10	90
35	80	20
40	80	20

<sup>1</sup> – Na proporção 10:90 v/v

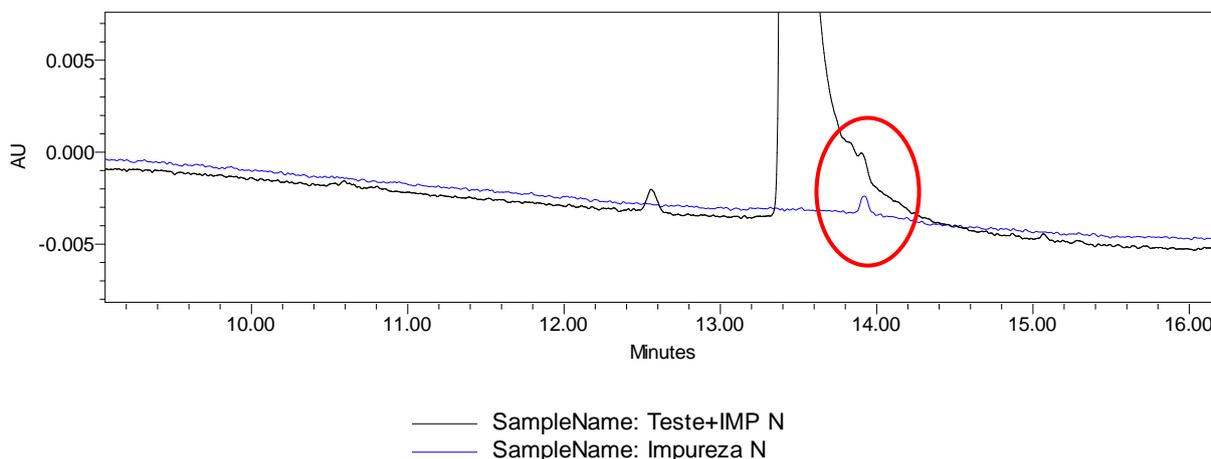
Ao injetar as soluções padrões das impurezas nas concentrações do limite da especificação (0,10% para as impurezas A, D, E, H, J, S, W e 0,15% para as impurezas B, G, I, N, P, Q e do ativo) individualmente, obteve-se o cromatograma com sobreposição das injeções, conforme Figura 5.



**Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas das Impurezas obtidas com o gradiente proposto pela BP.**

Como pode ser observado na Figura 5, ocorre a eluição do ácido fumárico em 0,5 minutos, impureza H e S em 5,2 e 5,8, respectivamente, impurezas Q e G coeluinto em 7,2 minutos, impureza B eluinto em 10,7 minutos, impureza I em 12,6 minutos, quetiapina e impureza N coeluinto em 13,5 minutos, impureza J em 14,4 minutos, impureza P e impureza A em 15,8 e 16,2 minutos, respectivamente, impureza E, impureza W, impureza D em 25,6, 26,4 e 27,0 minutos, respectivamente e também ocorreu a eluição de dois picos de fase móvel em 27,6 e 30,5 minutos.

Como a resposta analítica da impureza N foi muito baixa, ficando pouco perceptível a coeluição da quetiapina e da impureza N, foi preparada uma solução teste fortificada com a impureza N. A Figura 6 apresenta a sobreposição do cromatograma da solução teste fortificada com a impureza N e o padrão da impureza N, onde pode ser observado a coeluição da impureza N com o pico do ativo (destacado pelo círculo vermelho).



**Figura 6: Cromatograma das Soluções Teste + Imp. N e da Impureza N sobrepostas com zoom para verificação da coeluição.**

Como pode ser observado nas Figura 5 e

Figura 6, ocorreu coeluição do pico do ativo e da impureza N, e coeluição da impureza G com a impureza Q. Além disso, as impurezas N e Q também apresentaram uma baixa resposta na concentração avaliada.

Diante dos resultados obtidos, foram realizadas algumas alterações no método analítico descrito pela farmacopeia britânica visando uma melhor resolução entre os picos.

### 5.1.1 - Otimização do gradiente para separação da Impureza N e da Quetiapina

Como observado anteriormente, a impureza N e a quetiapina apresentaram o mesmo tempo de retenção. Para promover a separação, foi realizado um teste para otimização do gradiente, alterando a taxa de aumento da proporção de orgânico (acetonitrila) no eluente com relação ao tempo. Na condição inicial (conforme BP), tinha-se um aumento de 3% de acetonitrila por minuto a partir de 8 minutos de gradiente (conforme Tabela 6), essa taxa foi diminuída para 1% (conforme Tabela 7), o que resultou em um aumento de 8 minutos no tempo de corrida.

**Tabela 7: Gradiente 1.**

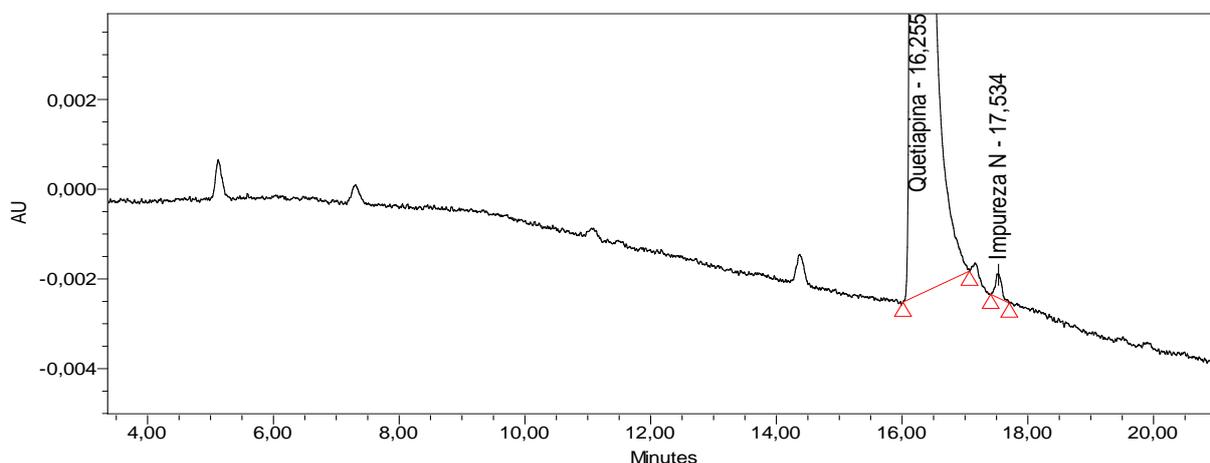
<b>Tempo (min)</b>	<b>Metanol:Tampão<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>
--------------------	---------------------------------------	-------------------------

0	80	20
8	80	20
26	60	40
40	50	50
44	30	70
47	10	90
48	10	90
53	80	20
58	80	20

<sup>1</sup> – Na proporção 10:90 v/v

Ao realizar esta mudança no gradiente, tem-se uma rampa de eluição menos inclinada e espera-se, com isso, conseguir a separação adequada da quetiapina e da impureza N, pois a molécula da impureza N têm uma menor polaridade quando comparada com a molécula de quetiapina, e ao diminuir a adição de orgânico a mesma terá maior interação com a fase estacionária (coluna).

O cromatograma apresentado na Figura 7 confirma que a alteração proposta gerou a separação adequada, onde obteve-se uma resolução de 6,8 entre os picos da Impureza N e a quetiapina, sendo que, para considerar dois picos completamente resolvidos, os mesmos devem ter resolução de no mínimo 1,5.



**Figura 7: Cromatograma da solução teste fortificada com a impureza N.**

Nesta proposta de gradiente, a modificação foi aplicada apenas após 8 minutos de corrida. Como as impurezas G e Q eluam antes desse ponto, a alteração no gradiente não influenciou a separação dessas impurezas. Assim, as impurezas G e Q continuaram coelindo, sem uma melhoria na resolução entre elas.

### 5.1.2 - Otimização do gradiente para separação das Impurezas G e Q

Visando melhorar separação entre a impureza G e Q, foi alterado a proporção de metanol no preparo da solução MeOH:Tampão (10:90 para 5:95 v/v). Essa alteração resultou na redução da concentração de metanol, diminuindo a quantidade de solvente orgânico presente no eluente.

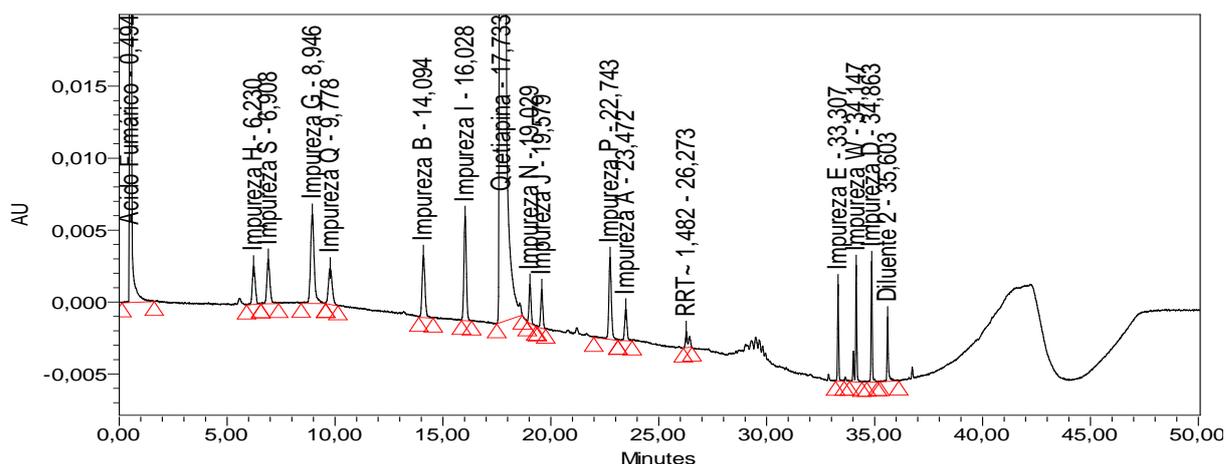
Também foi realizado a alteração no gradiente a partir de 26 minutos, conforme Tabela 8, onde mudou-se a inclinação da rampa de concentração do orgânico (acetonitrila), com o objetivo de separar de forma mais adequada os picos de diluente e impurezas que eluem em torno de 35 minutos. No gradiente testado anteriormente (Tabela 7), tinha-se uma taxa de 2,4% de aumento de acetonitrila por minuto. Neste teste, foi avaliado uma taxa de aumento de 3,6% por minuto. Com isso, o tempo total do gradiente foi reduzido em 7 minutos.

**Tabela 8: Gradiente 2.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Metanol:Tampão <sup>1</sup> (%)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>
0	80	20
8	80	20
26	60	40
40	10	90
41	10	90
46	80	20
51	80	20

<sup>1</sup> – Na proporção 5:95 v/v

A Figura 8 apresenta o cromatograma obtido para a solução teste fortificada com as impurezas injetada com o gradiente 2, onde pode-se observar que as impurezas G e Q eluíram com tempo de retenção de 8,946 minutos e 9,778 minutos, respectivamente, e obteve-se resolução de 2,7 entre elas, mostrando-se adequado, pois está acima de 1,5. Também ocorreu separação adequada entre os picos das impurezas E, W, D e os picos provenientes do diluente e/ou fase móvel.



**Figura 8: Cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas utilizando o gradiente de eluição conforme Tabela 9.**

Neste teste, observou-se que as impurezas Q e N apresentavam baixos sinais analíticos, o que pode dificultar sua identificação e quantificação, especialmente quando a concentração destas impurezas na amostra está próxima ao limite de quantificação do método, que é de 0,05%. Desta forma, foi necessário aumentar a concentração da solução teste, para melhorar a intensidade dos sinais e facilitar a análise precisa das impurezas e produtos de degradação.

### 5.1.3 - Alteração da concentração da Solução Teste

Este estudo foi realizado, pois as impurezas Q e N apresentam baixa resposta analítica, podendo gerar problemas de quantificação, pois os picos destas impurezas poderiam ser confundidos com o ruído da linha de base. Desta forma, realizou-se um estudo de alteração da concentração de trabalho da solução teste, de  $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

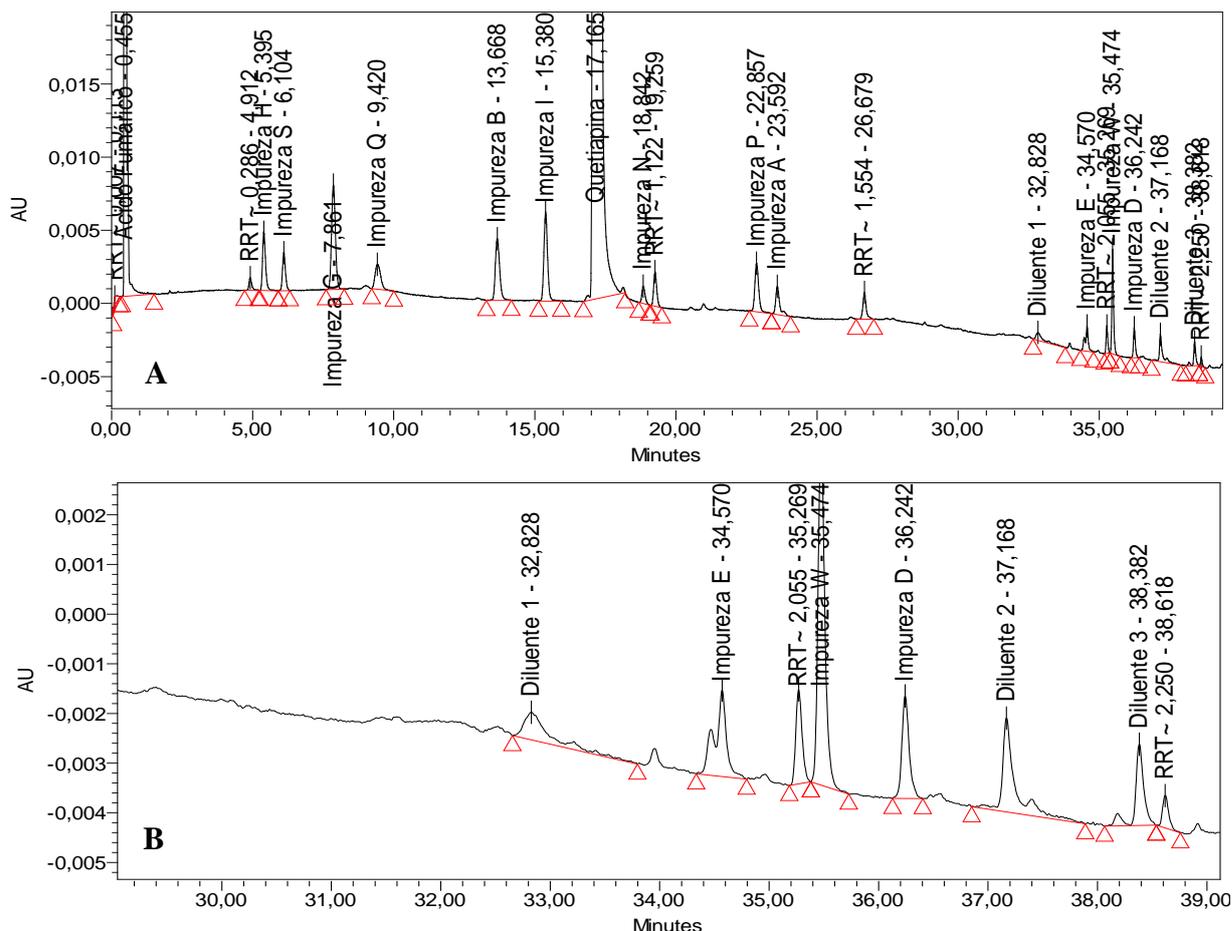
Tendo como premissa que tais impurezas têm especificação de 0,15%, a elevação da concentração da solução teste ocasiona a respectiva elevação da concentração das impurezas, melhorando o sinal analítico.

Em valores numéricos, a concentração real das impurezas Q e N, à 0,15% em uma solução teste de concentração de  $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , corresponderia a  $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ao dobrar a concentração de trabalho da solução teste para  $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , as concentrações das impurezas também dobram, melhorando sua quantificação.

Sendo assim, realizou-se o preparo de uma solução teste dobrando a concentração de trabalho ( $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), contaminada com as impurezas específicas na concentração

de 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (impurezas com especificação de 0,10% - A, D, E, H, J, S e W) e 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (impurezas com especificação de 0,15% - B, G, I, N, P e Q).

A partir da injeção desta solução, obteve-se resposta analítica adequada para as impurezas Q e N, no entanto, foram observados alguns outros problemas que não haviam sido percebidos quando estava se trabalhando com a concentração mais baixa. O cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas encontram-se na Figura 9.



**Figura 9: A – cromatograma da solução teste na concentração de 4000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  fortificada com todas as impurezas na concentração de 0,10 e 0,15%. B – cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas com zoom na região de 25 a 39 minutos.**

Após a alteração da concentração da solução teste, ocorreu a coeluição entre a impureza E e o pico da fase móvel, além de uma baixa resolução entre a impureza W e a impureza inespecífica com tempo de retenção relativo de 2,055 minutos.

Devido a essas coeluições identificadas, foi necessário realizar uma nova otimização no gradiente de eluição para melhorar a seletividade do método.

### 5.1.4 - Otimização do gradiente para melhorar a seletividade do método

Com o objetivo de promover uma maior interação das impurezas com a coluna e, por consequência, melhorar a separação dos pares críticos citados anteriormente, foi realizado a diminuição da concentração inicial de orgânico e, com isso, a força de eluição da fase móvel. Neste estudo, realizou-se o teste utilizando 100% tampão no canal A (anteriormente tinha-se uma solução metanol:tampão na proporção 5:95 v/v), além da diminuição da concentração inicial do canal A de 80% para 78%. A

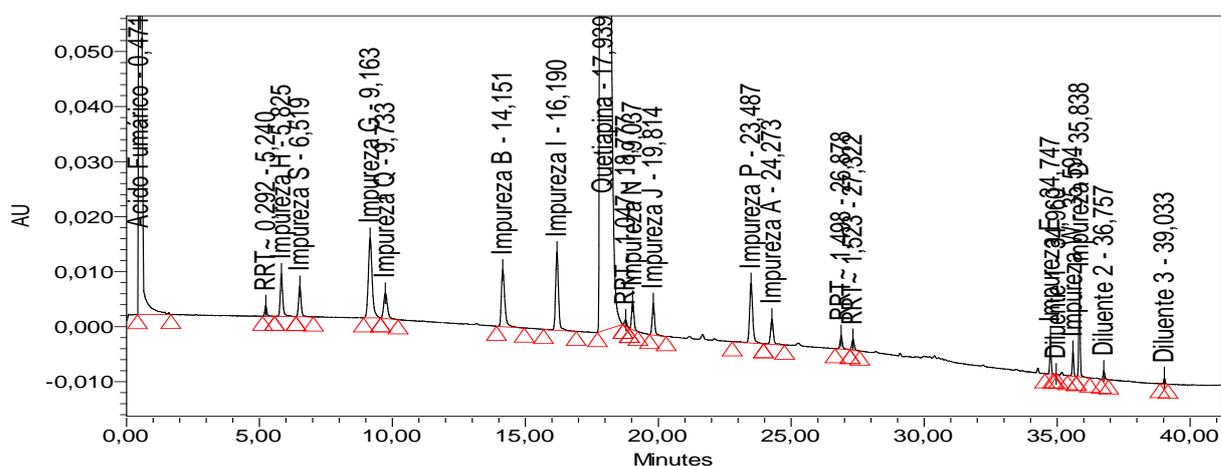
Tabela 9 apresenta a condição proposta para este teste, onde alterou-se a proporção de tampão e metanol no gradiente.

Tabela 9: Gradiente 3.

Tempo (min)	Tampão <sup>1</sup> (%)	Acetonitrila (%)
0	78	22
8	78	22
26	60	40
40	20	80
41	20	80
46	78	22
51	78	22

<sup>1</sup> – 100% tampão.

A Figura 10 mostra o cromatograma obtido para a solução teste na concentração de (4000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), contaminada com as impurezas específicas na concentração de 4  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (impurezas com especificação de 0,10% - A, D, E, H, J, S e W) e 6  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (impurezas com especificação de 0,15% - B, G, I, N, P e Q), injetada com o gradiente 3. Foi obtida a separação entre o pico da impureza E e o pico de fase móvel, além de uma separação adequada da impureza inespecífica com RRT 2,055 com o pico da impureza W.



### Figura 10: Cromatograma da solução teste fortificada com as impurezas no gradiente 3.

Desta forma, este gradiente foi o que apresentou melhor seletividade para as impurezas e picos de fase móvel e será utilizado nas próximas etapas desse estudo.

#### 5.1.5 - Avaliação do LQ

Para confirmar que todas as impurezas apresentam resposta adequada na concentração proposta para a solução teste de  $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , realizou-se o preparo de uma solução mix contendo todas as impurezas na concentração de 0,05% (limite de quantificação proposto para o método) equivalente a  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Utilizando o gradiente otimizado (item 5.4.1), injetou-se a solução mix com o ativo e as impurezas específicas, para verificação da razão sinal/ruído. O cromatograma desta solução está apresentado na Figura 11.

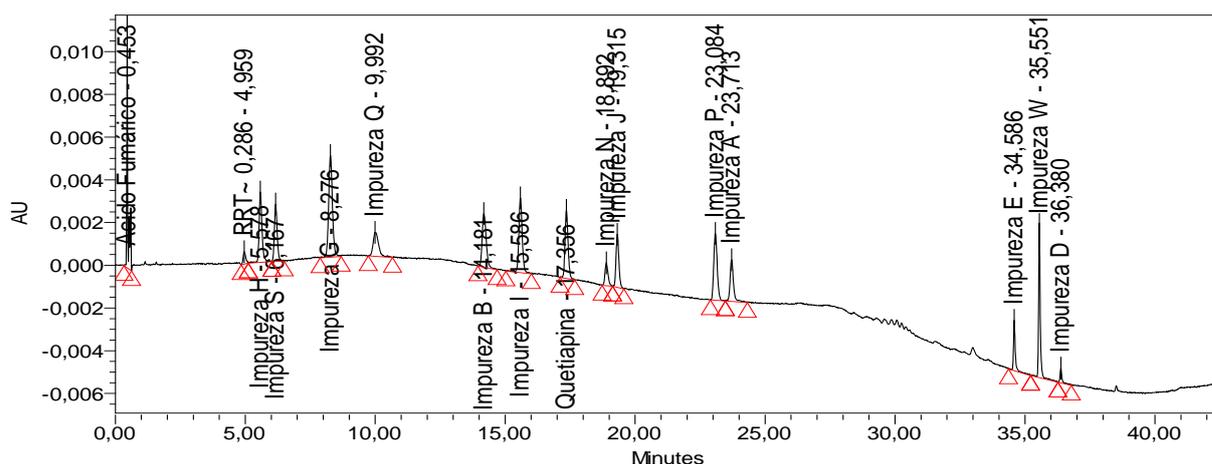


Figura 11: Cromatograma da solução mix das impurezas + ativo no LQ (0,05%).

Obeve-se sinal ruído adequado para todas as impurezas no limite de quantificação, conforme pode ser verificado na figura acima, pois para o LQ a relação sinal ruído deve ser superior a 10 e as impurezas que apresentaram menor resposta foram as impurezas N com  $s/n = 28$  e impureza Q com  $s/n = 24$ . Esses valores demonstram que o método é adequado para a quantificação das impurezas.

#### 5.1.6 - Definição da concentração de trabalho para quantificação de teor do ativo

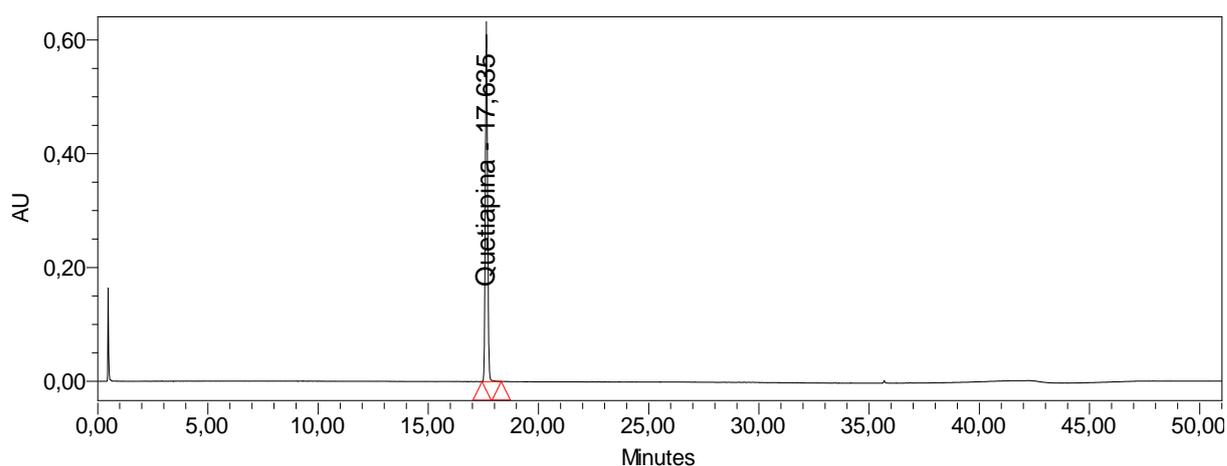
O método proposto pela farmacopeia britânica para quantificação do teor do ativo é por titulação, e não há um método relatado em compêndios oficiais para quantificação do teor por cromatografia líquida. Com o intuito de manter em um mesmo método a

quantificação das impurezas e o ativo, foi avaliado e definido a concentração de trabalho ideal para a correta quantificação do ativo no mesmo método cromatográfico.

A solução teste utilizada para quantificação das impurezas deve ter uma concentração que favoreça a detecção das impurezas. Portanto, a mesma apresenta uma concentração de  $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e absorvância próxima a 3 AU. Embora essa absorvância esteja quase no limite da capacidade de detecção do equipamento, uma absorvância elevada do ativo é aceitável, pois o interesse nesta solução está na quantificação das impurezas e não no pico do ativo.

No entanto para a quantificação do teor do ativo, foi necessário incluir um padrão e uma amostra de teor na faixa de absorvância mais segura para quantificação.

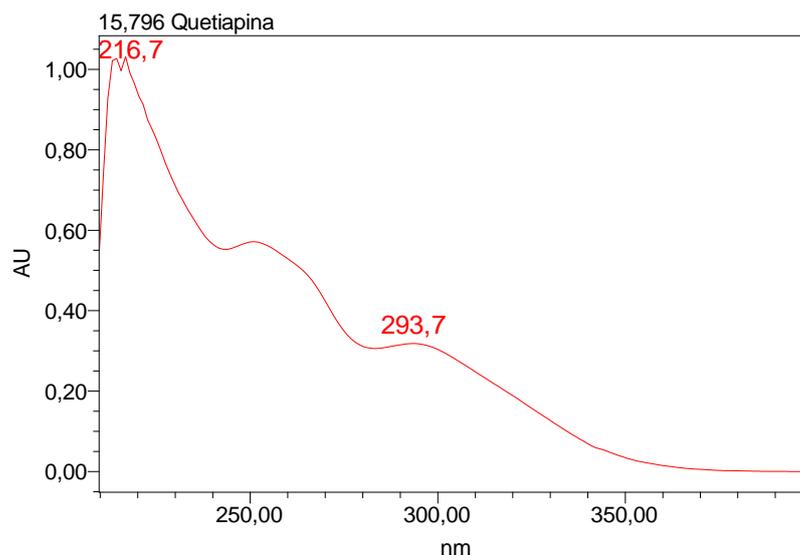
Assim, realizou-se a injeção de uma solução padrão na concentração de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , obtendo absorvância em torno de 0,6 AU no comprimento de onda de 240 nm (este é o comprimento de onda definido pela farmacopeia britânica e será aplicado em todo este estudo). O cromatograma pode ser visto na Figura 12.



**Figura 12: Cromatograma da solução padrão teor na concentração de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  no comprimento de 240 nm.**

Na amostra de teor, também foi avaliado a homogeneidade espectral do pico, para confirmação que o mesmo se encontra puro em toda a sua extensão, sem coeluições. Para realizar essa avaliação o manual do software (*Empower*) indica a utilização de absorvância máxima de 1 AU no Maxplot, que é a varredura deste pico em todos os comprimentos de onda do UV (200 a 400 nm).

Para isso, foi realizado a injeção de uma solução na concentração de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e avaliou-se a varredura do espectro (de 200 a 400 nm) para o pico do ativo e o perfil pode ser observado na Figura 13.



**Figura 13: Varredura do espectro de 200 a 400 nm para a solução padrão teor na concentração de 400 µg.mL<sup>-1</sup>.**

Conforme pode ser observado na figura acima, ao realizar a varredura do pico em todos os comprimentos de onda do UV, obteve-se uma absorbância de até 1 AU, o que está de acordo com o preconizado pelo *software*.

Desta forma, é possível a avaliação da quantificação do teor do ativo no mesmo método empregado para a quantificação das impurezas. Para isso, a solução de teste SR, com concentração de 4000 µg.mL<sup>-1</sup>, foi diluída para obter a solução teste teor com concentração de 400 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 5.1.7 - Estudo de Degradação Forçada

Com o intuito de comprovar a seletividade do método com relação aos produtos de degradação do ativo, foi realizado o estudo de degradação forçada, onde se obteve o perfil de degradação potencial do IFA. Este perfil permite prever o comportamento do IFA, quando exposto a determinada condição, como temperatura, variações de pH e umidade.

O método proposto deve ser capaz de quantificar tanto o decaimento de teor quanto a formação de produtos de degradação durante o tempo de validade do IFA.

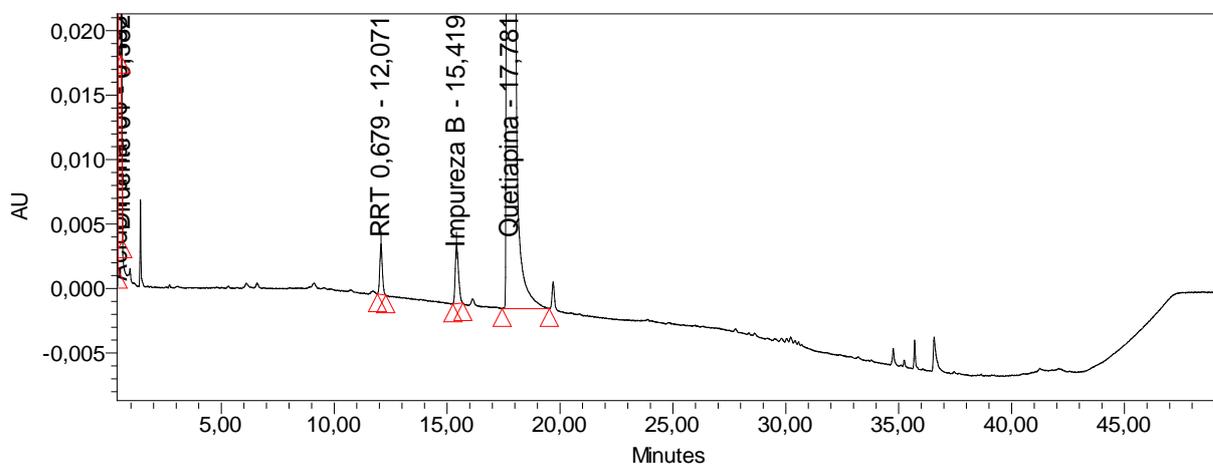
Portanto, o estudo de degradação forçada é a ferramenta utilizada para se obter um perfil de degradação potencial e garantir que o método mantenha a seletividade adequada para a correta quantificação de produtos de degradação. Para isso, o IFA foi exposto a diversas condições de degradação, conforme descrito na

Tabela 10.

**Tabela 10: Condições de estresse e tempo de exposição.**

<b>Amostra</b>	<b>Condição de estresse</b>	<b>Tempo total de exposição</b>
Controle	-	-
Estresse Ácido	HCl 1,0 M	10 dias
Estresse Alcalino	NaOH 1,0 M	10 dias
Estresse Oxidativo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3,0%	4 horas
Estresse Íons Metálicos	FeCl <sub>3</sub> 5 mM	24 horas
Estresse Fotolítico	2,4 milhões lux/h	2 ciclos de fotoestabilidade
Estresse Umidade	75% U.R. / 40 °C	10 dias
Estresse Térmico	60 °C	10 dias

A Figura 14 apresenta o cromatograma da solução teste SR controle na concentração nominal do método (4000 µg.mL<sup>-1</sup>). Esta solução foi empregada como controle para comparação com os resultados obtidos de impurezas e produtos de degradação nas demais condições de estresse. Na condição controle, têm-se a impureza B com teor de 0,09% e a impureza inespecífica com RRT 0,679 com teor de 0,06%.

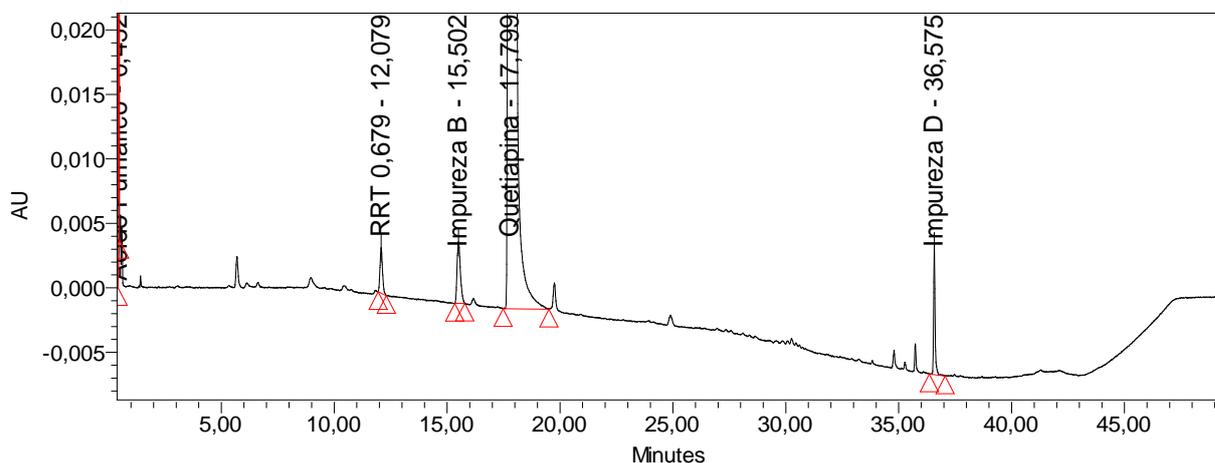


**Figura 14: Cromatograma da solução teste SR na condição controle com zoom na linha de base.**

#### **5.1.7.1- Estudo de Degradação por íons metálicos**

A exposição do ativo a íons metálicos de transição visa observar se estes são capazes de agir como catalisadores de reações de oxidação. [20] No presente estudo, a exposição do hemifumarato de quetiapina ao cloreto férrico 5 mM por 24 horas não resultou em degradação do ativo, nem formação de impurezas. Assim, o hemifumarato de

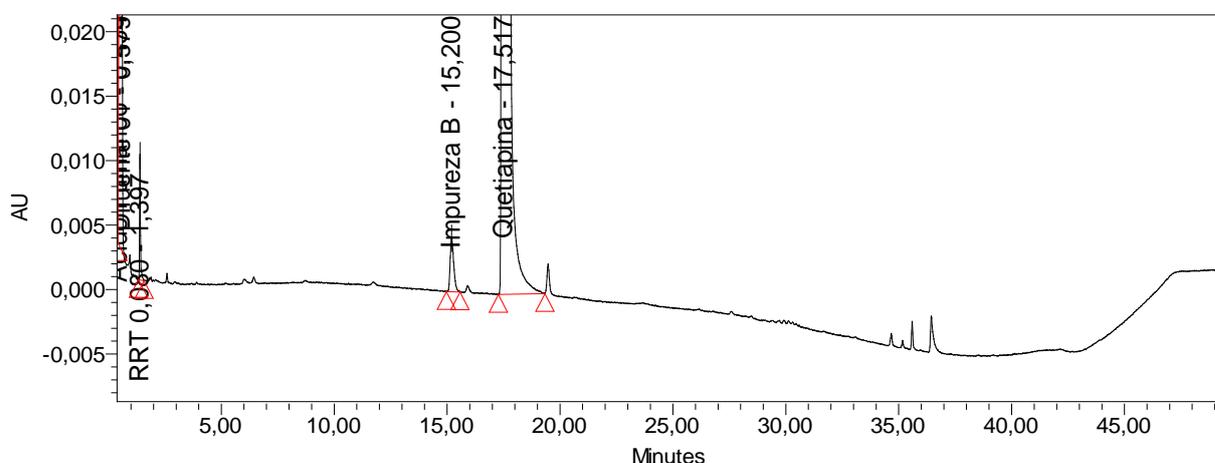
quetiapina pode ser considerada estável nessa condição. A Figura 15 apresenta o cromatograma da solução teste SR estressada por íons metálicos, onde pode-se observar que o perfil cromatográfico se encontra similar a amostra controle, com leve incremento no teor da impureza D (0,06%), que na condição controle estava com teor abaixo do LQ e, portanto, não foi quantificada.



**Figura 15: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação por íons metálicos com zoom na linha de base.**

### 5.1.7.2 – Estresse alcalino

Na condição de estresse alcalino, não houve decaimento no teor do ativo nem formação de impurezas após exposição do ativo a NaOH 1,0 M pelo período de 10 dias. Na Figura 16 está apresentado o perfil cromatográfico da solução teste SR após degradação alcalina.

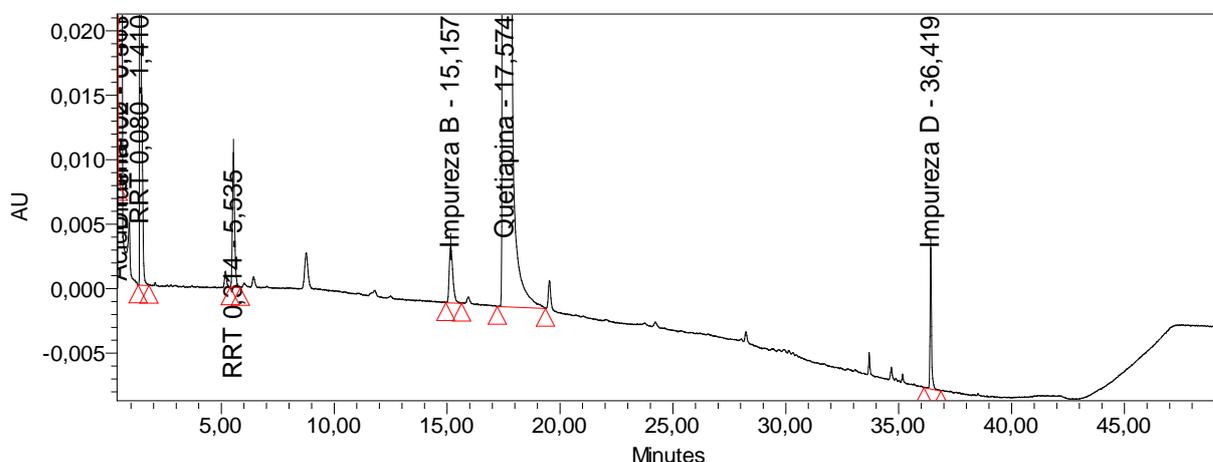


**Figura 16: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação alcalina com zoom na linha de base.**

A hidrólise básica não é prevista para a quetiapina, devido a não existirem posições eletrofílicas para que desencadeie a reação. De maneira geral, o anel de tiazepina possui diversas regiões pontuais onde há ressonância, ou seja, existe uma repulsão eletrostática impedindo os ataques nessa região e nos átomos vizinhos a estes. Para o anel de piperazina segue a mesma ideia, os pontos mais reativos são sobre os nitrogênios, que repelem o ataque ao hidróxido. Quanto a parte final da molécula, onde são encontrados o álcool e o éter, os mesmos não tem reações relatadas em tais condições. Portanto, considerando estas informações e os dados obtidos no estudo prático conduzido, a molécula foi considerada estável para a condição de degradação básica.

### 5.1.7.3 – Estresse ácido

Já a hidrólise ácida tende a prever o comportamento do medicamento frente a condição de umidade adsorvida ao longo do armazenamento, bem como o pH da formulação. Nesta condição de degradação, houve formação significativa da impureza RRT 0,080 com teor em torno de 1%, o cromatograma da solução teste SR exposta a degradação ácida está apresentado na Figura 17.

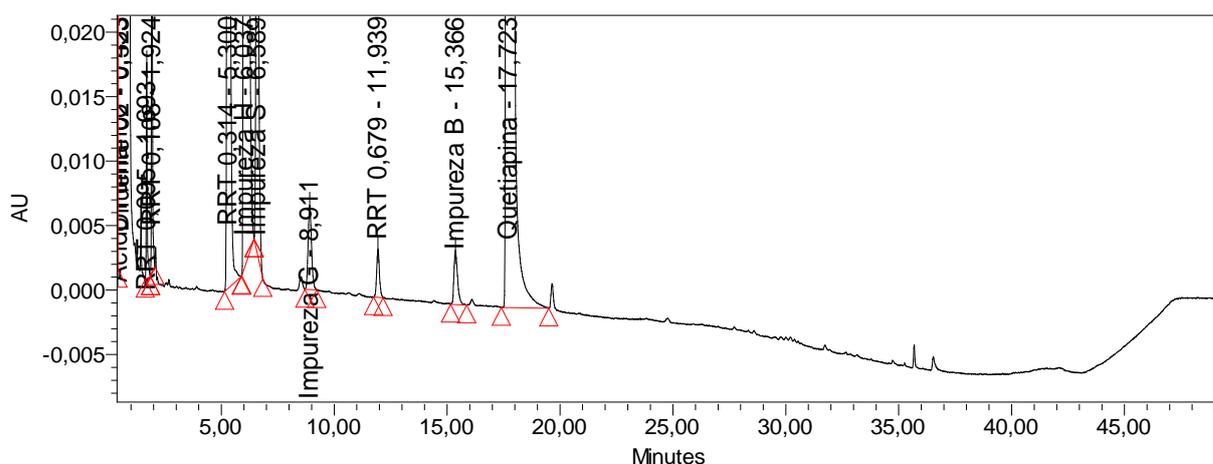


**Figura 17: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação ácida com zoom na linha de base.**

Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Stolarczyk *et al.* [21] observaram o mesmo comportamento, onde o Hemifumarato de Quetiapina apresentou-se lábil a degradação ácida.

#### 5.1.7.4 – Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi a condição avaliada onde ocorreu a formação de maior número de produtos de degradação (RRT 0,095, RRT 0,108, RRT 0,314, Imp. H, Imp. S e Imp. G), conforme observado no cromatograma da solução teste SR – degradação oxidativa apresentado na Figura 18. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura, que descreve esta condição de degradação como a que mais favorece a formação de produtos de degradação.



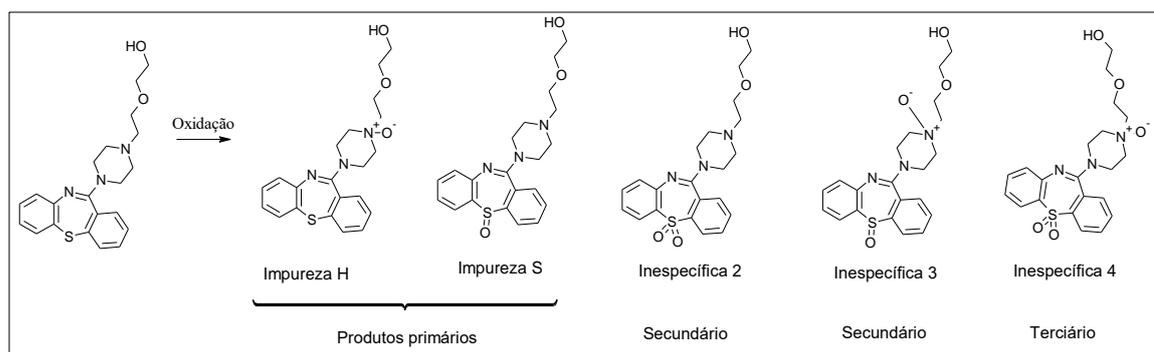
**Figura 18: Cromatograma da solução teste SR na condição de degradação oxidativa com zoom na linha de base.**

As oxidações são muito comuns em compostos farmacêuticos, em especial os que possuem nitrogênio e enxofre em sua formulação. Isso ocorre devido aos mesmos possuírem par de elétrons não ligantes disponíveis para interagir via nucleofílica e/ou radical (peróxido inorgânico – autooxidação e transferência de par de elétron) ou por transferência eletrônica - superóxido (íons metálicos).

Considerando as reações de autooxidação e transferência de par eletrônico, onde serão conduzidos os estudos com o peróxido, foi considerado estável a fração da molécula com os grupamentos álcool e éter. Para a piperazina, pode-se extrapolar o descrito por Baertschi *et al.* [22], considerando que somente o nitrogênio ligado ao grupo hidroxi-éter irá sofrer a N-oxidação via transferência de par de elétrons. No nitrogênio da piperazina ligado ao núcleo tiazepínico não ocorre oxidação devido ao impedimento eletrônico de deslocalização parcial de carga, o que o desativa frente a esse tipo de reação.

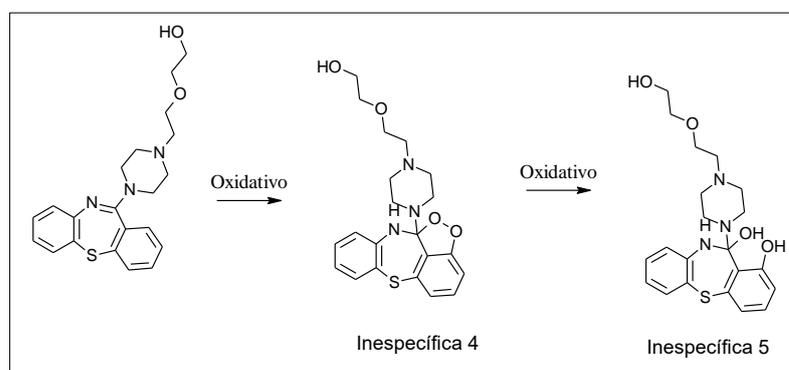
Para o anel tiazepina, são esperadas a formação primária do sulfóxido (S-óxido que é a impureza S) e da sulfona (S-dióxido) seguindo de mesmo racional que para o N-óxido (impureza H).

Conforme relatado por Baertschi *et al.* [22], em um caso de estudo de degradação forçada pode ser observado a quetiapina sulfona N-óxido, um composto tri-oxidado formado em menor quantidade que os demais por ser um produto terciário. Os principais compostos relacionados, que podem ser formados na condição de estresse oxidativo estão compilados na Figura 19.



**Figura 19: Possíveis impurezas decorrentes da oxidação.**

A quetiapina também pode sofrer reações com os peróxidos residuais em outra região da tiazepina, onde também é considerado as vizinhanças do anel aromático. Em meio oxidativo, pode ser esperado um produto minoritário que vai estar competindo juntamente com as demais oxidações: a formação do hidroperóxido com a posterior hidroxilação. A conformação e o alinhamento estérico da molécula faz com que seja possível a formação de um ciclo com ligações de baixa energia, que podem romper e dar origem a produtos inespecíficos.



**Figura 20: Possíveis impurezas inespecíficas decorrentes da oxidação.**

Confirmando os resultados alcançados neste estudo e as previsões teóricas, Trivedi *et al.*[23] obtiveram formação das impurezas H e S no estresse oxidativo e consideram o Hemifumarato de Quetiapina lábil a esta condição de degradação. Do mesmo modo, Sharma *et al.* [24] obtiveram uma redução drástica na concentração de Hemifumarato de Quetiapina, quando o ativo foi exposto a peróxido de hidrogênio 30% à temperatura ambiente por 2 horas.

Na Tabela 11 estão compilados os dados quantitativos do estudo de degradação forçada (ácido, básico, oxidativo e por íons metálicos) da matéria-prima de hemifumarato de quetiapina. A quantificação do teor e dos produtos de degradação foi realizado usando um padrão externo nas concentrações de 4000 µg.mL<sup>-1</sup> (padrão SR) e 400 µg.mL<sup>-1</sup> (padrão teor).

**Tabela 11: Resultados obtidos para as degradações em HCl, NaOH, FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

<b>Amostra</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Total Impureza (%)</b>	<b>Teor + Impurezas (%)</b>	<b>Balanco de massas<sup>1</sup></b>
Controle	99,69	0,13	99,82	-
Alcalina	101,19	0,12	101,31	101
Ácida	100,42	1,65	102,07	102
IM	100,37	0,20	100,57	101
Oxidativo	88,85	13,00	101,85	102

<sup>1</sup> Soma da recuperação (%) com a (%) dos produtos de degradação do pico, comparada com a solução controle, considerada 100%.

Para todas as condições de degradação química avaliadas, o balanço de massas apresentou valores próximos de 100%, comprovando que o método foi capaz de separar, identificar e quantificar os analitos.

#### **5.1.7.5 – Estresses Físicos**

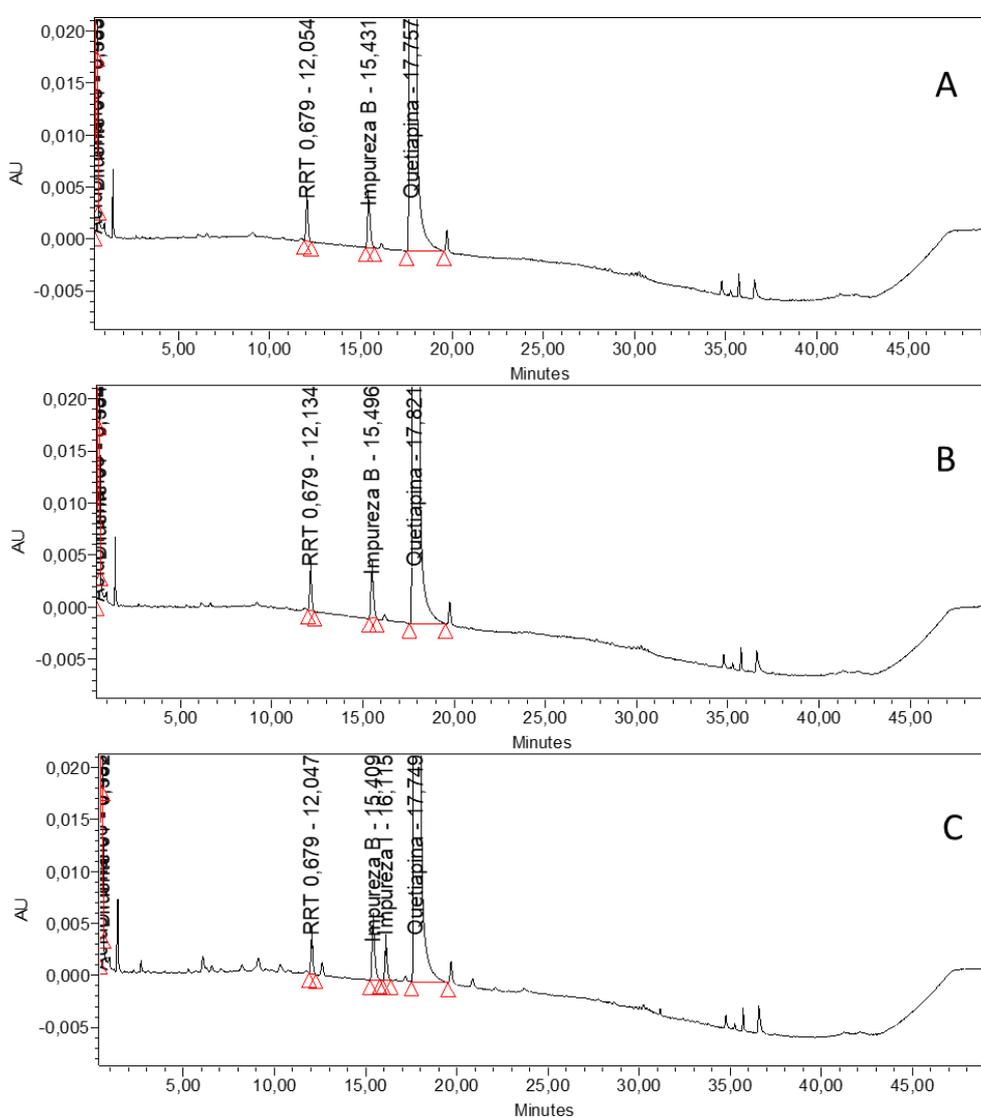
Para os estresses físicos de umidade e temperatura, não foram encontrados produtos de degradação acima do limite de quantificação, nem decaimento significativo no teor de Hemifumarato de Quetiapina, mesmo após dez dias de exposição a condição de degradação, conforme apresentado na Tabela 12.

Tais resultados estão de acordo com a literatura, segundo Trivedi *et al.* [23] que avaliou a suscetibilidade de degradação da Quetiapina as condições de degradação térmica

e úmida e observou que a amostra não apresentou decaimento significativo do teor do ativo, sendo considerado estável à essas condições.

Nas Figura 21 estão apresentados os cromatogramas das soluções teste SR expostas a degradação térmica, umidade e fotolítica, onde não ocorreu formação de produtos de degradação com teor relevante e que se encontram com o perfil cromatográfico similar a solução teste SR controle apresenta na Figura 14.

Trivedi *et al.* [23] e Dhaneshwar *et al.* [25] observaram a estabilidade da molécula de quetiapina quando exposta a degradação fotolítica, corroborando com os dados obtidos neste estudo.



**Figura 21: Cromatograma da solução teste SR com zoom na linha de base: A – degradação térmica. B – degradação úmida. C – degradação fotolítica.**

Na Tabela 12, estão compilados os dados quantitativos do estudo de degradação forçada dos estresses físicos (fotolítico, temperatura e umidade) da matéria-prima de hemifumarato de quetiapina.

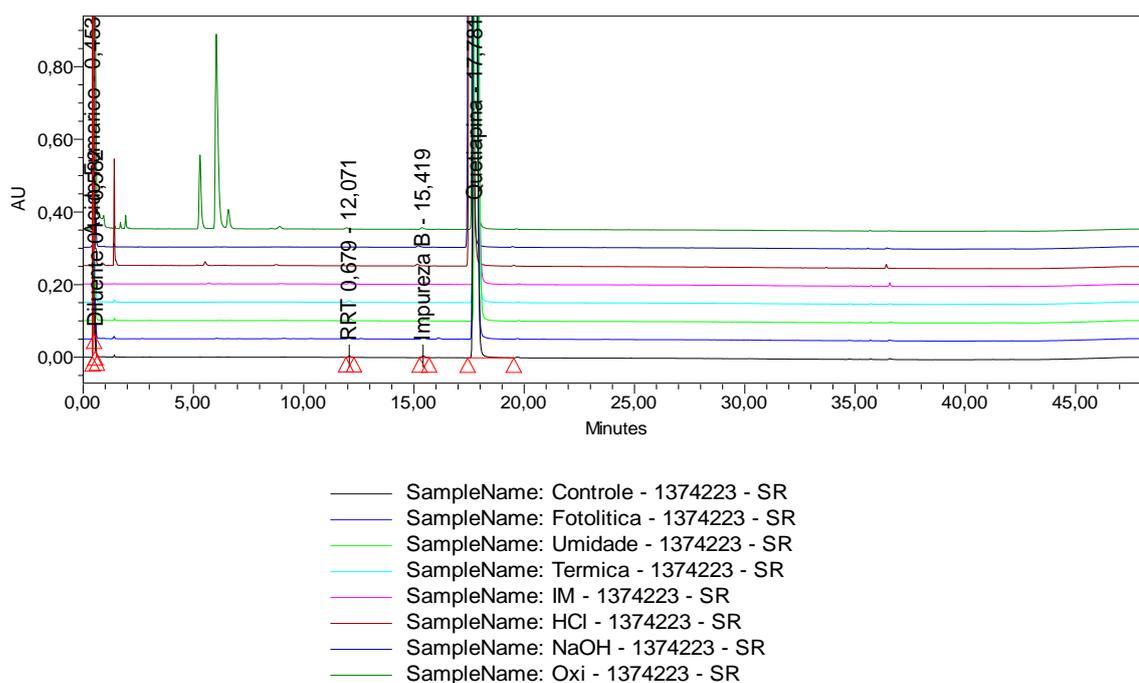
**Tabela 12: Resultados obtidos para as degradações físicas.**

Amostra	Teor (%)	Total Impureza (%)	Teor + Impurezas (%)	Balanco de massas <sup>1</sup>
Controle	99,69	0,13	99,82	-
Fotolítica	98,98	0,21	99,19	99
Térmica	100,16	0,15	100,31	100
Umidade	99,91	0,13	100,04	100

<sup>1</sup> Soma da recuperação (%) com a (%) dos produtos de degradação do pico, comparada com a solução controle, considerada 100%.

Para todas as condições avaliadas, o balanço de massas apresentou valores próximos de 100%, comprovando que o método foi capaz de separar, identificar e quantificar os analitos.

Na Figura 22 apresenta-se a sobreposição do cromatograma das soluções teste SR na condição controle e em todas as condições de degradação, onde pode ser observado que o método apresentou seletividade adequada para todos os produtos de degradação que foram obtidos neste estudo.



**Figura 22: Sobreposição dos cromatograma das soluções teste SR em todas as condições de degradação.**

A partir dos dados apresentados do estudo de degradação forçada, comprovou-se que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada e é capaz de quantificar o teor do ativo, as impurezas orgânicas e os produtos de degradação que podem ser formados durante o armazenamento e transporte do IFA hemifumarato de quetiapina.

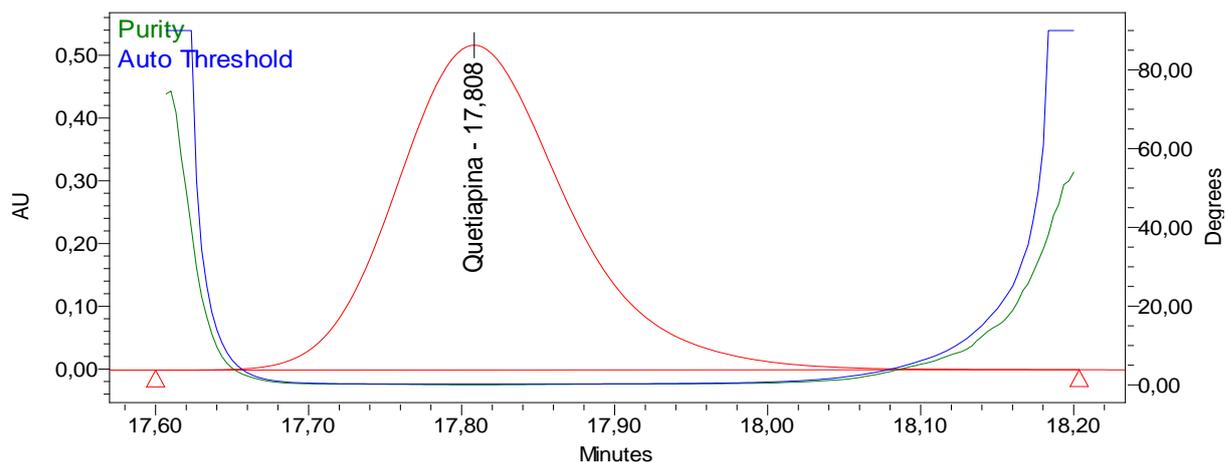
O hemifumarato de quetiapina se mostrou estável frente as condições de estresse alcalino, por íons metálicos, térmico, umidade e fotolítica. No entanto, é susceptível a degradação por meio oxidativo e hidrólise ácida.

Vale ressaltar que a presença dos produtos de degradação, não comprometeram a capacidade do método de separar e quantificar os diferentes produtos formados, uma vez que nenhum produto de degradação coeluiu com a quetiapina e/ou com as impurezas específicas.

#### **5.1.7.6 – Avaliação da Homogeneidade Espectral**

Com relação a pureza espectral do pico do ativo, esta foi avaliada a partir do *software Empower* com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos, capazes de demonstrar a homogeneidade do pico principal. Seguindo o recomendado no manual do *Empower*, a pureza do pico foi calculada empregando-se o parâmetro de “Autothreshold”, o qual computa automaticamente os ângulos de ruído e de solvente à partir do intervalo selecionado. Analisou-se a linha do *purity angle* e a linha *purity threshold* no *purity plot*, e estas não devem se cruzar em nenhum ponto. Esta avaliação foi realizada para todas as condições de estresse que o ativo foi exposto no estudo de degradação forçada, e em todas estas condições o pico do ativo se mostrou puro.

O gráfico da avaliação da homogeneidade espectral para a condição de maior degradação (condição oxidativa), ou seja, a condição mais crítica, encontra-se na Figura 23.



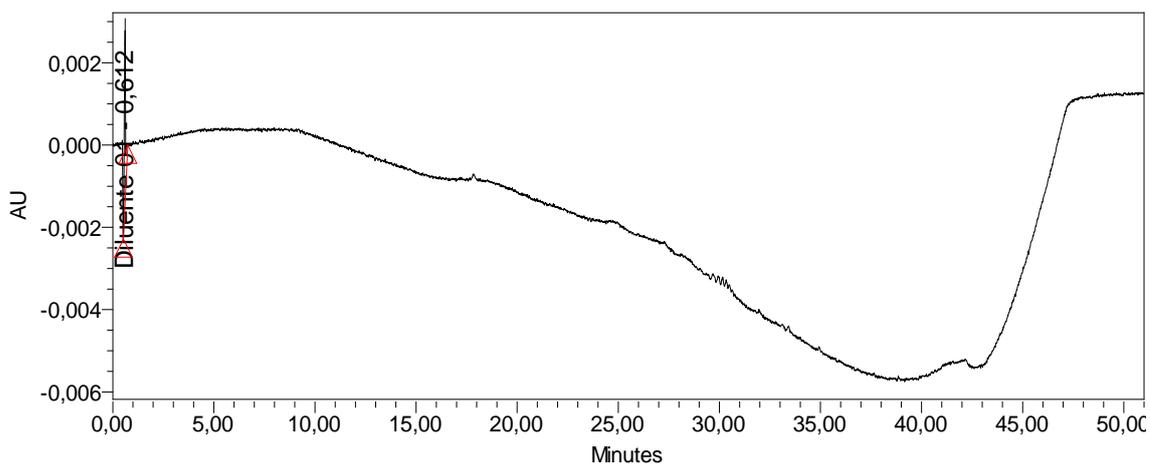
**Figura 23: Avaliação da pureza espectral para o pico da quetiapina na amostra de degradação oxidativa.**

Como pode ser observado, não há cruzamento em nenhum ponto entre as linhas do *purity angle* e a linha *purity threshold* no *purity plot*, comprovando assim a pureza espectral do pico do ativo e confirmando que não há nenhuma coeluição.

## 5.2 Validação do método analítico

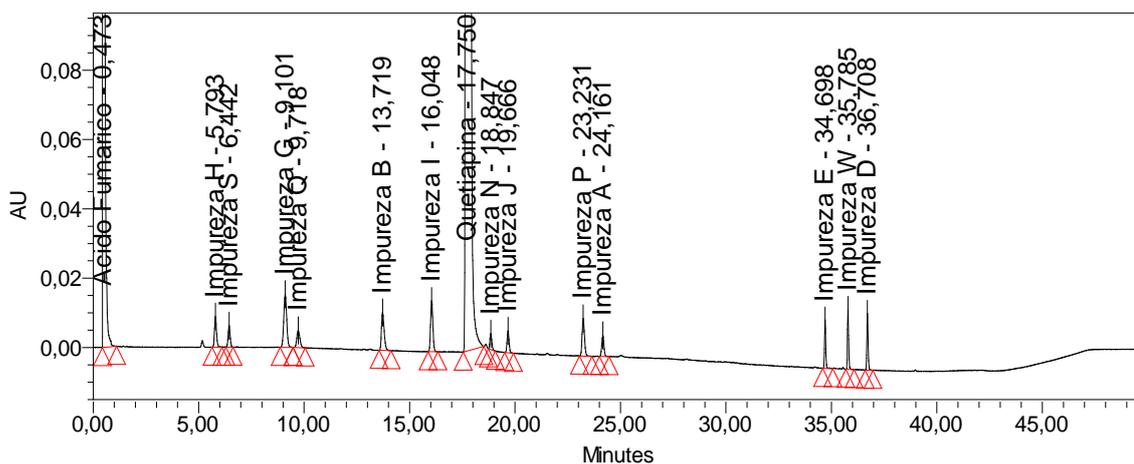
### 5.2.1 - Seletividade

Para comprovar a seletividade do método com relação as impurezas específicas, diluente e fase móvel foi injetado o diluente e a solução teste fortificada contemplando todas as impurezas. Na Figura 24 encontra-se o cromatograma do diluente, onde pode-se notar a eluição de apenas um pico no início do cromatograma, eluindo em 0,612 minutos. Isso confirma que o método é seletivo com relação aos componentes da fase móvel e diluente, uma vez que a presença de apenas um pico, com tempo de retenção diferente do obtido para as impurezas e o ativo, indica que o diluente não interfere na análise dos componentes da amostra.



**Figura 24: Cromatograma da solução diluente.**

Na Figura 25 está apresentado o cromatograma da solução teste fortificada (impurezas específicas e o ativo).



**Figura 25: Cromatograma da solução teste fortificada para comprovar a seletividade do método.**

Nesta imagem, pode-se observar que o método apresenta seletividade adequada, onde todos os analitos de interesse apresentaram separação satisfatória entre eles, com resolução superior a 1,5. A menor resolução ótima foi de 2,3 entre as impurezas G e Q.

### 5.2.2 - Linearidade

O estudo da linearidade para o método de doseamento do ativo foi realizado mediante a obtenção de três curvas analíticas, com cinco níveis cada, compreendendo o intervalo de 80% a 120% m/v da concentração nominal da solução amostra.

Para a avaliação da linearidade das impurezas inespecíficas e impurezas A, B, D, E, G, H, I, J, N, P, Q, S e W foi realizada mediante a obtenção de três curvas analíticas, com

cinco níveis de concentração, compreendendo o intervalo do limite de desconsideração até 120% da especificação das impurezas.

Os resultados obtidos para as curvas de linearidade, nos intervalos de concentração estabelecidos, foram avaliados estatisticamente. O resumo do estudo da linearidade para o ativo e as impurezas está apresentado na Tabela 13.

**Tabela 13: Resultados do estudo da linearidade.**

Teste	p-valor					R
	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Teste de Normalidade de Resíduos	Teste de Homocedasticidade	Teste de independência das observações	
Quetiapina (Teor)	0,0000	0,2072	0,3741	0,9326	0,6207	0,9999
Impureza Inespecífica	0,0000	0,2682	0,6889	0,1109	0,5536	0,9989
Impureza A	0,0000	0,7800	0,3033	0,1372	0,0655	0,9999
Impureza B	0,0000	0,9143	0,5642	0,5650	0,9001	0,9997
Impureza D	0,0000	0,2574	0,2811	0,3486	0,1367	0,9995
Impureza E	0,0000	0,1090	0,2181	0,5501	0,7497	0,9992
Impureza G	0,0000	0,3829	0,8771	0,2305	0,8191	0,9997
Impureza H	0,0000	0,5500	0,8835	0,7786	0,5689	0,9984
Impureza I	0,0000	0,1123	0,0998	0,7596	0,1753	0,9997
Impureza J	0,0000	0,1399	0,4032	0,9275	0,8831	0,9993
Impureza N	0,0000	0,1001	0,7008	0,8422	0,4691	0,9984
Impureza P	0,0000	0,9555	0,2668	0,6485	0,3249	0,9994
Impureza Q	0,0000	0,2024	0,4500	0,3766	0,7501	0,9987
Impureza S	0,0000	0,3453	0,9846	0,2137	0,6243	0,9994
Impureza W	0,0000	0,3701	0,4608	0,5162	0,1507	0,9993

Conforme demonstrado na Tabela 13, para todos os analitos avaliados, no teste do coeficiente angular, o p-valor do teste F da ANOVA obtido foi menor que 0,05. Portanto, a significância do modelo linear não foi rejeitada (coeficiente angular igual a zero).

No teste do coeficiente linear (teste do intercepto), o p-valor foi maior que 0,05, portanto, o intercepto foi considerado igual a zero. A avaliação do intercepto foi realizada com intuito de garantir que o padrão empregado cruza o ponto (0,0), para que, na rotina laboratorial possa se utilizar um padrão em ponto único em substituição de uma curva de calibração.

Para a avaliação do teste de normalidade dos resíduos (Teste de Anderson-Darling), como o p-valor foi maior que 0,05, a distribuição dos resíduos foi considerada normal.

No teste de homocedasticidade (Teste de Breusch Pagan), o p-valor foi maior que 0,05 (conforme proposto). Assim, não se rejeita a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%, sugerindo modelo homocedástico.

Para o teste de independência das observações (Teste de Durbin-Watson) foi obtido p-valor maior que 0,05, logo a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5% não foi rejeitada.

Ao avaliar o coeficiente de correlação de Pearson (R), os valores obtidos foram maiores que 0,990, o que demonstra relação linear adequada. Além disto, não foram detectados valores extremos ou pontos de alavanca.

Desta forma, a análise estatística demonstrou cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade, tanto para a quetiapina quanto para as impurezas inespecíficas e específicas. O método pode ser considerado linear, homocedástico, normal, independente nas observações e sem valores extremos (outliers). Portanto, o método é adequado para quantificação do teor de quetiapina na faixa de 320 a 480  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para quantificação das impurezas inespecíficas e as impurezas A, D, E, H, J, S e W na faixa de 2,0 a 4,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e para quantificação das impurezas específicas B, G, I, P e Q na faixa de 2,0 a 7,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 5.2.3 - Determinação de Fator resposta das Impurezas Específicas

O fator resposta relativo das impurezas foi calculado como sendo a razão entre os coeficientes angulares do padrão de hemifumarato de quetiapina frente ao padrão da impureza em questão ( $a_{\text{ativo}}/a_{\text{imp}}$ ), obtidos a partir do parâmetro de linearidade, conforme relatório do *Action*. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14: Fator resposta relativo de cada impureza específica.**

Identificação	Coeficiente angular	Fator resposta experimental
Hemifumarato de Quetiapina	12037,61	-
Impureza A	10475,83	1,15
Impureza D	18326,79	0,66
Impureza E	13455,68	0,89
Impureza H	12058,27	1,00
Impureza J	9886,62	1,22
Impureza W	15867,86	0,76
Hemifumarato de Quetiapina	11606,32	-
Impureza S	11290,08	1,03

Hemifumarato de Quetiapina	11511,57	-
Impureza B	14828,00	0,78
Impureza G	22806,40	0,50
Impureza I	15354,21	0,75
Impureza P	14225,13	0,81
Impureza Q	7989,00	1,44
Hemifumarato de Quetiapina	11734,56	-
Impureza N	5976,66	1,96

Os fatores resposta relativos encontrados acima foram utilizados nos cálculos das impurezas nos demais parâmetros da validação.

#### 5.2.4 - Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas por meio de amostras contendo quetiapina na concentração nominal da solução amostra ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a avaliação do teor) e nas concentrações 2,0, 3,6 e  $4,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo, respectivamente, aos níveis 0,05%, 0,09% e 0,12% m/v em relação à concentração nominal da solução amostra ( $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a avaliação das impurezas inespecíficas). Os ensaios ocorreram em dias distintos e com analistas diferentes.

Os resultados obtidos na repetibilidade e precisão intermediária para a quantificação de doseamento e das impurezas inespecíficas estão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15: Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária para a quantificação de quetiapina e impurezas inespecíficas.**

Composto	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Repetibilidade		Precisão Intermediária		DPR (%)
		Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	
Quetiapina (Teor)	400	99,16	0,5	101,36	0,6	1,3
Imp. Inespecíficas	2,0	99	0,8	99	2,1	1,4
	3,6	99	1,4	101	0,9	1,2
	4,8	100	1,7	101	2,8	2,3

A repetibilidade e a precisão intermediária para as impurezas específicas foram avaliadas na concentração nominal da solução amostra, contaminado com as impurezas em três níveis de concentração diferentes, desde o limite de desconsideração até 120% da especificação de cada impureza. Os ensaios ocorreram em dias distintos e com analistas diferentes.

Os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária para a quantificação das impurezas específicas estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16: Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária para a quantificação das impurezas específicas.**

Composto	Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Repetibilidade		Precisão Intermediária		DPR (%)
		Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)	
Impureza A	2,0	102	0,9	105	0,4	1,4
	3,6	102	0,8	105	0,8	1,9
	4,8	102	0,7	106	0,6	2,3
Impureza B	2,0	106	1,1	97	1,5	5,0
	4,8	104	0,9	98	0,9	3,3
	7,2	104	0,2	99	0,5	2,7
Impureza D	2,0	104	6,9	97	1,6	6,1
	3,6	86	6,1	98	4,7	8,2
	4,8	96	5,7	106	1,5	6,3
Impureza E	2,0	98	2,0	106	1,0	4,4
	3,6	98	0,4	102	1,7	2,3
	4,8	99	1,5	102	0,5	2,2
Impureza G	2,0	108	1,6	104	0,3	2,3
	4,8	103	0,9	100	1,1	1,6
	7,2	101	0,9	98	0,6	1,7
Impureza H	2,0	100	2,5	107	2,9	4,5
	3,6	98	0,8	103	1,3	2,9
	4,8	97	1,3	98	2,1	1,9
Impureza I	2,0	104	0,9	99	1,0	2,8
	4,8	102	0,3	99	0,4	2,1
	7,2	102	0,6	98	0,3	1,8
Impureza J	2,0	99	1,8	103	1,6	2,7
	3,6	99	1,0	104	0,6	2,9
	4,8	98	0,3	104	0,6	3,5
Impureza N	2,0	92	7,6	85	2,5	7,0
	4,8	97	1,3	92	2,4	3,5
	7,2	98	2,8	98	3,4	2,8
Impureza P	2,0	103	0,9	101	1,0	1,5
	4,8	101	0,9	101	0,8	0,7
	7,2	101	0,5	101	0,3	0,6
Impureza Q	2,0	104	2,5	92	4,6	7,6
	4,8	97	3,3	94	3,9	3,7
	7,2	97	3,0	93	5,6	4,6
Impureza S	2,0	103	1,4	110	2,0	4,2

	3,6	98	0,6	104	0,3	3,3
	4,8	96	0,9	102	0,5	2,9
Impureza W	2,0	100	1,0	98	1,2	1,3
	3,6	99	0,7	99	0,4	0,6
	4,8	100	1,3	100	0,3	0,9

Conforme os resultados apresentados nas Tabela 15 e Tabela 16, o método proposto é preciso, pois obtiveram-se valores de desvio padrão relativo (DPR) de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela *Association of Official Analytical Colaboration* (AOAC), que são de 1,3% (repetibilidade) e 2,0% (precisão intermediária) para o método de quantificação do doseamento  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e 11% para (repetibilidade e precisão intermediária) para o método de quantificação de impurezas específicas e inespecíficas.

### 5.2.5 - Exatidão

A exatidão para a quantificação de quetiapina foi avaliada por meio de 9 amostras preparadas a partir do padrão de hemifumarato de quetiapina, em três níveis de concentração: 320, 400 e  $480 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo, respectivamente, aos níveis 80%, 100% e 120% m/v em relação à concentração nominal da solução amostra ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com três réplicas em cada nível. A exatidão para a quantificação das impurezas inespecíficas e específicas foi avaliada concomitante ao parâmetro de precisão - repetibilidade.

A exatidão do método para quantificação de doseamento foi avaliada em três níveis de concentração: 80%, 100% e 120% da concentração nominal da amostra, em três réplicas. Os resultados da exatidão são mostrados na Tabela 17.

Os resultados de exatidão para as impurezas específicas e inespecíficas estão demonstrados nas Tabela 15 e Tabela 16, uma vez que o parâmetro foi avaliado juntamente com a repetibilidade.

**Tabela 17: Resultados de exatidão para a quantificação de quetiapina.**

<u>Composto</u>	<u>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</u>	<u>Média (%)</u>	<u>DPR (%)</u>
Quetiapina	320	100	0,1
	400	99	0,2
	480	98	0,5

Conforme os resultados apresentados na Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17, o método foi considerado com alta exatidão, visto que todos os resultados estão de acordo

com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC que é de 98% a 102% para a quantificação de doseamento e 80% a 110% para a quantificação das impurezas inespecíficas e específicas.

### 5.2.6 - Limite de quantificação

O limite de quantificação para este método foi de 0,05% (2,0 µg/mL) para as impurezas inespecíficas e específicas. As Tabela 18 e Tabela 19 apresentam os valores de sinal/ruído para o pico de hemifumarato de quetiapina e para as Impurezas A, B, D, E, G, H, I, J, N, P, Q, S e W, adquiridos no parâmetro de linearidade. Todos os valores obtidos são superiores à 10, indicando que a intensidade do sinal dos analitos é significativamente maior do que o ruído da linha, e isto permite a correta detecção dos picos de interesse.

**Tabela 18: Sinal/ruído para hemifumarato de quetiapina e impurezas A, B, D, E, G e H no limite de quantificação (0,05%).**

Identificação	Hemifumarato de quetiapina	Imp. A	Imp. B	Imp. D	Imp. E	Imp. G	Imp. H
1	53	40	68	132	82	107	42
2	55	42	60	141	94	101	46
3	57	45	70	145	97	110	48

**Tabela 19: Sinal/ruído para as impurezas I, J, N, P, Q, S e W no limite de quantificação (0,05%).**

Identificação	Imp. I	Imp. J	Imp. N	Imp. P	Imp. Q	Imp. S	Imp. W
1	89	41	27	81	30	60	110
2	78	42	33	68	26	51	120
3	91	45	28	81	27	44	125

### 5.2.7 - Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir da solução teste teor. Em todas as variações os resultados obtidos cumpriram com os critérios definidos para a exatidão na quantificação do ativo. A Tabela 20 apresenta os resultados quantitativos das modificações propostas na robustez.

**Tabela 20: Avaliação quantitativa da robustez para a quetiapina.**

Condição	Variação	Solução Teste Teor	
		Teor (%)	Rec. (%)
Sem alteração	-	101	-
Coluna	Outro lote	100	99
Tempo de ultrassom	3 minutos	99	98
	10 minutos	99	98
Temperatura de coluna	48 °C	101	100
	52 °C	100	99
Vazão da fase móvel	0,45 mL.min <sup>-1</sup>	100	99
	0,55 mL.min <sup>-1</sup>	100	99
pH do Tampão	8,8	101	100
	9,2	101	100
Composição da Fase móvel	3,65 g de acetato de amônio por litro	100	99
	4,05 g de acetato de amônio por litro	101	100
Critério de aceitação		98 – 102%	

A estabilidade das soluções padrões e teste foram avaliadas para garantir que, mesmo que as soluções não sejam injetadas imediatamente após o preparo, as mesmas continuam adequadas para a quantificação.

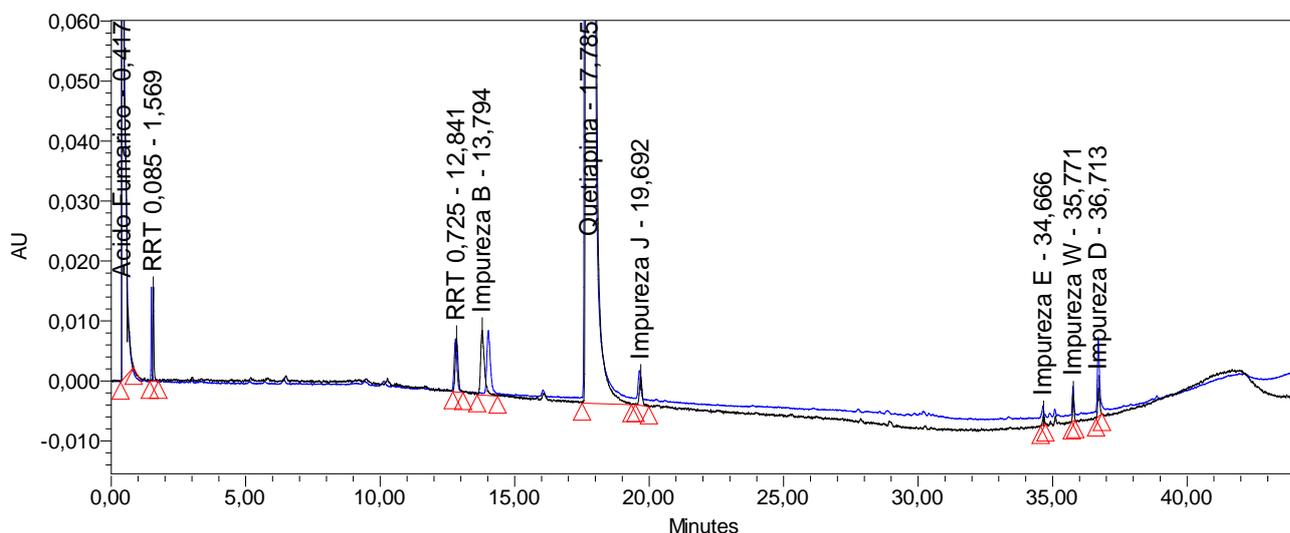
A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para a avaliação da estabilidade das soluções padrão SR, solução padrão teor e solução teste teor.

**Tabela 21: Resultados obtidos para as soluções após período de armazenamento.**

Solução	Tempo de armazenamento	Recuperação(%)	Critério de aceitação(%)
<b>Padrão SR</b>	74 horas	103	95 - 105
<b>Padrão Teor</b>	67 horas	98	98 - 102
<b>Teste Teor</b>	56 horas	98	

Verifica-se que não houve incremento e/ou decaimento do teor de quetiapina no período de armazenamento para as soluções avaliadas, uma vez que as recuperações obtidas estão dentro dos critérios de aceitação. Comprovou-se que a solução padrão SR mostra-se estável por até 74 horas, a solução padrão teor por até 67 horas e a solução teste teor por até 56 horas após o seu preparo, isso para as soluções acondicionadas no rack do equipamento em temperatura ambiente.

A solução teste SR também foi analisada após o preparo e depois de transcorridas 56 horas, na Figura 26 observa-se o mesmo perfil cromatográfico durante o intervalo de tempo avaliado. Desta forma, comprovou-se que a solução teste SR apresentou estabilidade por até 56 horas após o seu preparo, isso quando as soluções estiverem acondicionadas no rack do equipamento, em temperatura ambiente.



**Figura 26: Perfil cromatográfico da solução teste SR no início (em preto) e final do intervalo de 56 horas (em azul).**

## 6 - CONCLUSÃO

O método desenvolvido no presente estudo foi capaz de separar, identificar e quantificar o hemifumarato de quetiapina e suas potenciais impurezas orgânicas e produtos de degradação, comprovado nos estudos de degradação forçada, que é um dos critérios de aceitação na seletividade. Além disso a validação do método analítico mostrou que o mesmo apresenta resposta linear, precisão, exatidão e robustez para o ativo, impurezas e produtos de degradação, de acordo com as diretrizes do ICH, da RDC nº 166 de 2017 e RDC nº 53 de 2015.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº. 166 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, 24 de julho de 2017.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 359 - Institui o Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (DIFA) e a Carta de Adequação de Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (CADIFA), 1 de abril de 2020.
3. Calixto JB, Siqueira Júnior JM. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta médica da Bahia*. 2008; 78 (suplemento 1): 98-106.
4. Roy J. *An Introduction to Pharmaceutical Sciences - Production, Chemistry, Techniques and Technology*. 1ª edição. New York: Biohealthcare; 2011.
5. Mitidieri TL, Pimentel VP, Braga CDA, Pieroni JP. Há espaços competitivos para a indústria farmoquímica brasileira? Reflexões e propostas para políticas públicas. *Complexo Industrial da Saúde*. 2015; (Setorial 41): 43-78.
6. British Pharmacopeia. Quetiapine Fumarates. *Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances, BP 2023 (Ph. Eur. 2541)*.
7. Bula Seroquel, disponível em <http://www.seroquel.com/index.aspx.html> (acessado em 22/08/2023)
8. Oliveira I. R. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2000; volume 22 (supl I): 38-40
9. ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Impurities in new drug substances – Q3A (R2). 2006.
10. The United States Pharmacopeia. Quetiapine Fumarate. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M72415\\_02\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M72415_02_01)
11. United States Food and Drug Administration (US-FDA). *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, 2001.
12. ICH. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. *Stability Testing Of New Drug Substances And Products Q1A (R2)*. 2003.
13. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. 9ª edição. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

14. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern Liquid Chromatography. 3ª edição. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.
15. Collins C, Braga G, Bonato P. Introdução a métodos cromatográficos. 7ª edição. Campinas: Unicamp; 1997.
16. Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Química Nova. 2009; vol. 32: 214-222.
17. Fanali S, Haddad P, Poole C, Schoenmakers P, Lloyd D. Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation. Oxford: Elsevier; 2013.
18. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.
19. Shasha J, Shichao D, Yumin L, Dandan H, Zhenfang L, Kangli L, Gong J. Determination and Correlation of Solubility of Quetiapine Fumarate in Nine Pure Solvents and Two Aqueous Binary Solvents. Journal of Chemical & Engineering Data. 2017; volume 62 (12), A-J.
20. Klick S, Muijselaar PG, Waterval J, Eichinger T, Korn C, Gerding TK, Debets AJ, De Griend CS, Somsen GW, De Jong GJ. Towards a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. Pharmaceutical Technology. 2005; volume 29: 48-66.
21. Stolarczyk EU, Kutner A. Use of hyphenated LC-MS/MS technique for characterization of impurity profile of quetiapine during drug development. Polish Pharmaceutical Society - Drug Research. 2010; volume 67: 599-608.
22. Baertschi SW, Alsante KM, Reed RA. Pharmaceutical stress testing predicting drug degradation. 2ª edição. Londres; 2011.
23. Trivedi RK, Patel MC. Development and Validation of a Stability Indicating RP-UPLC Method for Determination of Quetiapine in Pharmaceutical Dosage Form. Sci Pharm. 2011; vol. 79: 97-111.
24. Sharma D, Srinivas KS, Gupta P, Dwivedi DP, Dureja H, Nagpal M, Rakha P, Goyal S. Simultaneous estimation of risperidone, olanzapine and quetiapine and their degradation products by HPLC. ACTA Pharmaceutica Scientia. 2010; vol. 52, nº 3: 345-352.
25. Dhaneshwar SR, Patre NG, Mahadik MV. Stability-Indicating HPTLC Method for Quantitation of Quetiapine Fumarate in the Pharmaceutical Dosage Form. Acta Chromatographica. 2009; vol 21: 83-93.

26. Valentinil, Sóstenes Rosa, Sommer, Willy Arno, Matioli, Graciette. Validação de métodos analíticos. Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.
27. Garfield, F. M. Quality assurance principles for analytical laboratories. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International, p. 220. 1994
28. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia nº 10 – Guia para tratamento estatístico da validação analítica versão 1 de 30 de agosto de 2017.