



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

JÉSSICA ALVES

**VALIDAÇÃO PARCIAL DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE PARACETAMOL EM UM FARMACO POR
ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA**

Tubarão

2021

JÉSSICA ALVES

**VALIDAÇÃO PARCIAL DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE PARACETAMOL EM UM FARMACO POR
ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA**

Relatório de Estágio apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Alessandro de Oliveira Limas, Ms.

Tubarão

2021

JÉSSICA ALVES

**VALIDAÇÃO PARCIAL DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE PARACETAMOL EM UM FARMACO POR
ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA**

Este Relatório de Estágio foi julgado adequado à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química e aprovado em sua forma final pelo curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 13 de julho 2021.

Professor e orientador Alessandro de Oliveira Limas, Ms.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Cesar Renato Alves da Rosa, Ms.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Jair Juarez João, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Aos meus amigos e colegas, pelo incentivo e pela caminhada até aqui, compartilhando dificuldades e muitas risadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me dar a oportunidade de estudar, pela saúde, e coragem para enfrentar os desafios no caminho. A mim mesma por não desistir, aos meus amigos e familiares que me apoiaram diante das dificuldades.

“Persistência é a irmã gêmea da excelência. Uma é mãe da qualidade, a outra é a mãe do tempo” (MORGAN, 1980).

RESUMO

O paracetamol ou acetaminofeno é um dos fármacos mais consumidos pela população em geral, incluindo crianças, gestantes e idosos, devido suas propriedades analgésicas e antipiréticas. Diante de tal relevância para população, o registro do medicamento junto ao órgão regulador é um processo indispensável para sua comercialização e consumo. Nesse contexto, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 200 de 26 de dezembro de 2017 estabelece os requisitos mínimos para o registro do medicamento junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. De acordo com a mesma resolução, deve ser apresentado no momento do registro o chamado relatório de validação analítica, que é desenvolvido com orientação da Resolução RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Esta RDC estabelece os parâmetros para a validação do método analítico responsável pela quantificação do ativo no insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos, para que dessa forma seja demonstrado que os resultados apresentados pelo método são adequados a finalidade a que se destina. Portanto, a quantificação do paracetamol foi executada através de um método por espectrofotometria no ultravioleta no comprimento de onda de 249 nm e avaliado conforme os parâmetros de seletividade, exatidão e precisão especificados pela legislação. O parâmetro de seletividade demonstrou ausência de interferência através da verificação dos espectros. A precisão atendeu ao sistema dentro de intervalos estatísticos estipulados e atendeu as especificações de Desvio Padrão Relativo (DPR) de $\leq 1,3$. Por meio do parâmetro de exatidão verificou-se ótima recuperação do analito em concentrações de 80%, 100% e 120% do ativo, com ausência de interferências. Dessa forma, afirma-se que a metodologia avaliada mostrou ser seletiva, precisa e exata, podendo assim ser declarada validada, atendendo as RDC nº 166/2017 e o DOQ CGCRE 008 de 04/2020 (INMETRO).

Palavras-chave: Registro de medicamentos. Validação analítica. Espectrofotometria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Componentes do equipamento UV	18
Figura 2 – Espectrofotômetro.....	20
Figura 3 - Espectro do padrão	24
Figura 4 - Espectro da amostra	25
Figura 5 - Espectro do placebo.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critério de aceitação DPR	15
Tabela 2 - Critério de aceitação - Recuperação	16
Tabela 3 - Região x comprimento de onda.....	17
Tabela 4 - Preparo das amostras - Exatidão.....	23
Tabela 5 - Resultado system suitability - Repetibilidade	27
Tabela 6 - Resultado da análise de Repetibilidade – Analista A	27
Tabela 7 - Resultado da análise de Precisão Intermediária – Analista B.....	28
Tabela 8 - Resultado geral de Precisão	28
Tabela 9 – Dados do teste T entre variâncias equivalentes	29
Tabela 10 – Dados do teste F entre variâncias	30
Tabela 11 – Resultados – Ponto 80%	31
Tabela 12 – Resultados – Ponto 100%.....	31
Tabela 13 – Resultados – Ponto 120%.....	32
Tabela 14 – Resumo de resultados para a Exatidão	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	PROBLEMA.....	9
1.2	JUSTIFICATIVA.....	9
1.3	OBJETIVOS	9
1.3.1	Objetivo Geral	9
1.3.2	Objetivos Específicos	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	REGISTRO DE MEDICAMENTOS	11
2.1.1	Boas práticas de fabricação	11
2.1.2	Boas práticas de laboratório	12
2.1.3	Validação de métodos analíticos	12
2.1.3.1	Parâmetros da validação analítica	13
2.1.3.1.1	<i>Seletividade</i>	13
2.1.3.1.2	<i>Precisão</i>	13
2.1.3.1.3	<i>Exatidão</i>	15
2.1.4	Espectrometria de absorção no UV-VIS	16
2.2	DETERMINAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO ATIVO	18
2.2.1	Equação para cálculo da concentração do padrão	18
2.2.2	Equação para cálculo da concentração da amostra	19
2.2.3	Equação para cálculo do teor de paracetamol	19
3	MÉTODOS	20
3.1	SELETIVIDADE	21
3.2	PRECISÃO	21
3.2.1	Repetibilidade	21
3.2.2	Precisão intermediária	21
3.2.3	Critério de aceitação para Precisão	21
3.3	EXATIDÃO.....	22
3.3.1	Preparo das amostras	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	SELETIVIDADE	24
4.2	PRECISÃO	26
4.2.1	System suitability	26

4.2.2	Repetibilidade.....	27
4.2.3	Precisão Intermediária	28
4.2.4	Comparação entre analistas.....	28
4.2.5	Teste t	29
4.2.6	Teste F.....	30
4.3	EXATIDÃO.....	30
4.3.1	Ponto 80%.....	30
4.3.2	Ponto 100%	31
4.3.3	Ponto 120%	31
4.3.4	Resumo de resultados:.....	32
5	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXOS	37
	ANEXO 1 – MONOGRAFIA FARMACOPEICA.....	38

1 INTRODUÇÃO

Os analgésicos naturais para alívio das dores, com uso de plantas, são utilizados a cerca de 3.000 a.C. Posteriormente, com os avanços científicos ocorreu o desenvolvimento e síntese dos analgésicos (LOURENÇÃO, 2009).

Desde 1949, quando houve a identificação do paracetamol como principal metabólito ativo da fenacetina e acetanilida, ele é um dos principais ingredientes ativos para alívio da dor e febre, sendo utilizado para diferentes formas farmacêuticas (LOURENÇÃO, 2009).

Devido sua elevada importância e consumo, é um dos medicamentos indispensáveis na gama de produtos de uma indústria farmacêutica. Visto isso, para sua fabricação é necessário seu registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A Resolução da Diretoria Colegiada nº 200 de 26 de dezembro de 2017 dispõe da documentação e critérios mínimos para o registro de medicamentos sintéticos e semissintéticos, classificados como genéricos, similares ou novos. Logo, nessa mesma resolução, é exigido o relatório de validação analítica, que inclui todos os parâmetros avaliados referentes a metodologia analítica que quantificará o ativo do produto a ser registrado.

A validação analítica garante que o método utilizado identifica o princípio ativo do fármaco de forma precisa e sensível com o objetivo de gerar resultados confiáveis para o controle de qualidade, possibilitando a identificação imediata de uma falha no sistema de produção, e conseqüentemente trazendo segurança para os consumidores.

A resolução que orienta a validação de métodos analíticos é a RDC nº166 de 24 de julho de 2017 e é ela que determina os parâmetros a serem avaliados para métodos descritos em compêndios oficiais ou métodos desenvolvidos internamente.

Para a quantificação do paracetamol em formulações farmacêuticas de solução oral, a Farmacopeia Brasileira 6ª edição de 2019 descreve um método utilizando espectrofotometria no UV/VIS.

Sendo a farmacopeia um compêndio oficial, segundo a RDC nº 166, deve-se avaliar o método descrito por meio de parâmetros como seletividade, precisão e exatidão, que compreende uma validação parcial.

Portanto, pretende-se avaliar se o método oficial tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida pela legislação, nas condições em que é praticado.

1.1 PROBLEMA

O método analítico descrito na Farmacopeia Brasileira para quantificação de paracetamol em uma solução oral é considerado seletivo, preciso e exato, segundo a resolução da diretoria colegiada nº166/2017, nas condições que é praticado?

1.2 JUSTIFICATIVA

Uma indústria farmacêutica do sul de Santa Catarina deseja registrar um novo produto com ação antipirética e analgésica para tratar doenças que provocam febre ou dor. Dessa forma, é necessário a avaliação de alguns parâmetros exigidos pela legislação para que ocorra o registro do medicamento em questão.

No ato do protocolo de pedido de registro de um medicamento, de acordo com a RDC Nº 200 de 26 de dezembro de 2017, o solicitante do registro deverá apresentar um relatório técnico contendo, no que diz respeito ao produto acabado, a validação do método analítico utilizado para quantificação do ativo.

Os parâmetros exigidos para realização da validação de um método analítico são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC nº 166 de 24 de julho de 2017.

Por meio de um estudo de validação parcial, os métodos analíticos presentes em compêndios oficiais, como na Farmacopeia Brasileira, devem ter sua adequabilidade demonstrada ao uso pretendido, nas condições de formulação e equipamentos disponíveis no laboratório.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Validar parcialmente um método analítico para a quantificação de paracetamol em um fármaco por espectrofotometria no ultravioleta.

1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se o método analítico é capaz de quantificar o analito na presença de componentes que podem estar presentes na amostra;
- b) Analisar se os limites calculados no parâmetro de Precisão atendem as especificações de teor;
- c) Tratar estatisticamente a Precisão e verificar se os resultados atendem as especificações de DPR;
- d) Verificar se parâmetro de exatidão apresentou recuperação da amostra dentro da faixa estabelecida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 REGISTRO DE MEDICAMENTOS

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 200, de 26 de dezembro de 2017 dispõe dos requisitos mínimos para o registro de medicamentos, sendo eles sintéticos ou semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares.

Entre os documentos exigidos para a aprovação do registro de medicamentos inclui o certificado de boas práticas de fabricação emitido pela Anvisa e o relatório de validação analítica do método utilizado para a quantificação do ativo do produto a ser registrado.

2.1.1 Boas práticas de fabricação

A resolução RDC nº 301, de 21 de agosto de 2019 dispõe sobre diretrizes gerais de boas práticas de fabricação como requisitos mínimos a serem seguidos a todos os fabricantes e medicamentos.

As boas práticas de fabricação (BPF) assegura que os produtos são produzidos de acordo com padrão de qualidades controlados.

Do sistema da qualidade farmacêutica, de acordo com a seção I da RDC nº 301:

Art. 4. O detentor de uma autorização para fabricação deve fabricar medicamentos, de forma a garantir que correspondam à finalidade pretendida, satisfaçam os requisitos do registro ou da autorização para uso em ensaio clínico, conforme apropriado, de forma a não colocar os pacientes em risco devido à segurança, qualidade ou eficácia inadequadas. (RDC Nº 301/19).

De acordo com o capítulo II, artigo 14 da seção III que diz respeito aos requerimentos básicos do controle de qualidade, os métodos analíticos devem ser validados.

Visto isso, o capítulo I, seção II da RDC Nº301, define a validação como:

Art. 3. Validação: ação de provar, de acordo com os princípios das Boas Práticas de Fabricação, que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva aos resultados esperados. (RDC Nº 301/19).

2.1.2 Boas práticas de laboratório

A resolução RDC N°11 de 16 de fevereiro de 2012 define princípios e requisitos para realização das análises laboratoriais com qualidade, segurança e confiabilidade.

Segundo a mesma resolução, o método analítico empregado deve atender pelo menos um dos seguintes critérios: ser métodos prescritos ou validados conforme regulamento técnico oficial, métodos descritos em compêndios oficiais com aceitação nacional ou internacional, métodos validados por estudos colaborativos e métodos desenvolvidos ou modificados pelo próprio laboratório.

Segundo o Artigo 33, Seção III do Capítulo II (RDC n°11 de 2012), os métodos provenientes de regulamentos técnicos oficiais, compêndios e os métodos validados por estudos colaborativos devem ser verificados nas condições do laboratório.

Já os métodos modificados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório devem ser validados para demonstrar a adequação ao seu propósito (BRASIL, 2012).

2.1.3 Validação de métodos analíticos

O método analítico introduzido na rotina de um laboratório deve estar validado de acordo com os órgãos fiscalizadores, mostrando sua confiabilidade. Dessa forma, garante-se que o produto está sendo fabricado sempre com a mesma qualidade e de acordo com os limites de tolerância permitidos pelos órgãos responsáveis e farmacopeicos (MORETTO L.D, SHIB M. 2000).

No Brasil, os órgãos reguladores dos procedimentos utilizados na validação analítica são a ANVISA (Agência nacional de vigilância sanitária) e o INMETRO (Instituto nacional de metrologia, normatização e qualidade industrial).

Segundo a RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), “a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos”.

Os métodos analíticos são divididos em compendiais, que são aqueles descritos em documentos oficiais, como as farmacopeias. E os não compendiais.

“A utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial reconhecido pela Anvisa requer a realização de uma validação analítica, conforme

parâmetros estabelecidos nesta resolução, levando-se em consideração as condições técnico-operacionais.” (BRASIL, 2017).

Os parâmetros a serem considerados para os métodos analíticos que não são descritos em compêndio oficial são Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão e Robustez.

Os métodos analíticos compendiais devem ter sua adequabilidade demonstrada por meio da apresentação de um estudo de validação parcial que deverá avaliar os parâmetros de precisão, exatidão, seletividade.

2.1.3.1 Parâmetros da validação analítica

O método em estudo está descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, 2019 como “Paracetamol Solução Oral” e devem ser avaliados os parâmetros correspondentes à validação parcial.

2.1.3.1.1 Seletividade

A Seletividade do método analítico deve ser capaz de quantificar o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra como diluentes, impurezas ou componentes da matriz. (BRASIL, 2017).

Uma maneira comum de se avaliar a seletividade do método é adicionando um padrão da substância de interesse no diluente, se o método detectar somente o ativo, não havendo interferências, ele é considerado seletivo.

2.1.3.1.2 Precisão

O parâmetro de Precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos da amostra descrita no método analítico. (BRASIL, 2017).

A Precisão é expressa por meio da repetitividade e reprodutibilidade, sendo determinado pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo.

Portanto, um método é considerado preciso quando os resultados de ensaios repetidos com a mesma amostra ou padrões e que foram preparados de maneira independente apresentar valores muito próximos.

A repetibilidade deve ser avaliada por meio de seis determinações na faixa de 100% da amostra conforme descrito no método analítico realizado no mesmo dia pelo mesmo analista.

A precisão intermediária é avaliada por meio da proximidade dos resultados da análise de amostras com as mesmas quantidades de repetições e concentrações que as da repetibilidade, porém realizadas por operador e dias distintos.

Em relação ao cálculo necessário, a RDC N° 166, artigo 35 da seção V orienta:

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula "DPR= (DP/CMD) X 100", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. (RDC N° 166/17).

Portanto, o cálculo é expresso:

$$\text{Desvio padrão relativo} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100 \quad (1)$$

Fonte: Adaptado de ANVISA, RDC 166/17.

Os limites para DPR são baseados no guia do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Revisão 08 – Abril/2020) que descreve os critérios de aceitação de repetibilidade baseado na concentração da amostra, conforme tabela abaixo:

Tabela 1 - Critério de aceitação DPR

ANALITO (%)	FRAÇÃO MÁSSICA	UNIDADE	DPR (%)
100	1	100%	1,3
10	10 ⁻¹	10%	1,9
1	10 ⁻²	1%	2,7
0,1	10 ⁻³	0,1%	3,7
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	30

Fonte: Adaptado do INMETRO, DOQ-CGCRE-008.

Posteriormente, o teste F e o teste t (student) são aplicados para avaliar se as variâncias são estatisticamente iguais.

2.1.3.1.3 Exatidão

Segundo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), “A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro.”.

A exatidão deverá ser avaliada a partir de nove amostras com três concentrações distintas, sendo baixa, alta, média, com três réplicas de cada.

Para avaliação de método de produto acabado, a amostra poderá ser preparada utilizando quantidades conhecidas de uma substância química de referência do ativo a ser analisado.

A exatidão pode ser calculada pela taxa de recuperação que relaciona a concentração real obtida experimentalmente pela concentração teórica. Conforme abaixo:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Fonte: Adaptado de ANVISA, RDC 166/17.

Os limites para recuperação são baseados no guia do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Revisão 08 – Abril/2020) que descreve os critérios de aceitação baseado na concentração da amostra, conforme tabela abaixo:

Tabela 2 - Critério de aceitação - Recuperação

ANALITO (%)	FRAÇÃO MÁSSICA	UNIDADE	RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)
100	1	100%	98 – 102
10	10 ⁻¹	10%	98 – 102
1	10 ⁻²	1%	97 – 103
0,1	10 ⁻³	0,1%	95 – 105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Fonte: Adaptado do INMETRO, DOQ-CGCRE-008.

O desvio padrão relativo deverá ser calculado para todas as recuperações obtidas e deverá atender os limites da tabela 1.

2.1.4 Espectrometria de absorção no UV-VIS

A espectrometria de absorção no UV/VIS possui grande utilidade na determinação de fármacos, principalmente por ser uma técnica robusta, com custo relativamente baixo e com possibilidades de aplicações variadas. Além da rapidez e simplicidade de sua utilização. Sendo uma alternativa aos métodos cromatográficos que utilizam maior quantidade de solventes, além de levarem mais tempo no preparo das amostras e possuírem instrumentação mais dispendiosa, elevando o custo final da análise (WEINERT; PEZZA; PEZZA, 2008).

A espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível (UV-VIS) e infravermelho, de acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada. A utilização desta técnica vai desde a identificação até a quantificação de substâncias, conforme tabela abaixo (ANVISA, 2019).

Tabela 3 - Região x comprimento de onda

REGIÃO	FAIXA DE COMPRIMENTO DE ONDA
Ultravioleta (UV)	190 – 380 nm
Visível (VIS)	380 – 780 nm
Infravermelho próximo (NIR)	780 – 2500 nm (12800 – 4000 cm ⁻¹)
Infravermelho médio (MIR)	4 – 25 nm (2500 – 400 cm ⁻¹)
Infravermelho distante	25 – 300 nm (400 – 33 cm ⁻¹)

Fonte: ANVISA, 2019.

As transições eletrônicas são passagem de natureza não contínua das moléculas quando absorvem energia e transitam para um estado maior de energia. Na região do ultravioleta e visível ocorrem transições eletrônicas em porções da molécula chamadas de cromóforos. Essas transições fazem com que os elétrons migrem de orbitais moleculares ocupados para orbitais de energias superiores (ANVISA, 2019).

No UV/VIS os espectros são obtidos utilizando o modo de transmissão, que é a medida da diminuição da intensidade da radiação em determinados comprimentos de onda quando a radiação passa através da amostra (ANVISA, 2019). A transmissão pode ser calculada conforme abaixo:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Eq. 01})$$

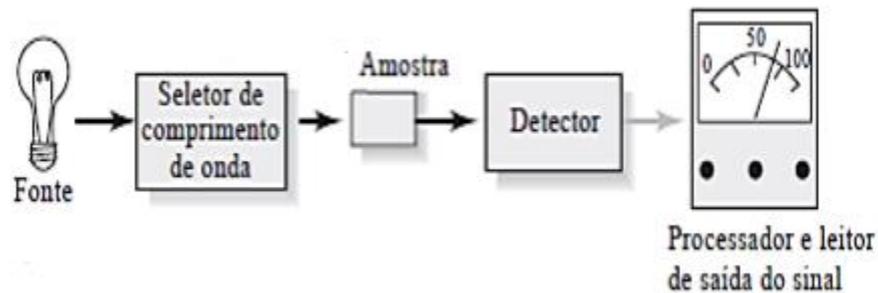
Onde, I_0 é a intensidade da radiação incidente e I a intensidade da radiação transmitida.

A absorbância e a transmitância são grandezas complementares. Sendo a lei de Lambert-Beer a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostra nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. O fundamento dessa lei nos diz que a absorbância, quantidade de energia radiante absorvida por uma solução, é diretamente proporcional à concentração da mesma. Sendo expressa:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \quad (\text{Eq. 02})$$

O instrumento utilizado para medir a quantidade de luz absorvida por uma determinada solução é chamado de espectrofotômetro. É composto pela fonte de luz (lâmpada de tungstênio ou deutério), dispositivo monocromador ou dispersor de luz equipado com seletor de comprimento de onda, compartimento de cubetas, fotodetector de luz acoplado a um amplificador e instrumento de medida pela amostra (MOURA, 2009).

Figura 1 - Componentes do equipamento UV



Fonte: SKOOG, 2006.

As cubetas são recipientes que armazenam a amostra e que possuem janelas transparentes na região espectral de interesse. Na região do visível utiliza-se cubetas de sílica fundida, já no ultravioleta cubetas de quartzo (SKOOG, 2002).

2.2 DETERMINAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO ATIVO

Os cálculos desenvolvidos são referentes ao método para a quantificação de paracetamol em solução oral, com concentração de 0,01 mg/ mL do ativo na solução, conforme descrito na monografia EF 198-00 da Farmacopeia Brasileira 6ª edição de 2019 (Anexo 1).

2.2.1 Equação para cálculo da concentração do padrão

A concentração da solução do padrão pode ser quantificada através da equação 3.

$$C_p = P_p \times P \times 0,0004 \times 0,1 \quad (3)$$

Fonte: Da autora, 2021.

Sendo:

C_p = concentração da preparação padrão, em g/100mL;

P_p = peso do padrão, em mg;

P = pureza do padrão, em mg/mg;

0,0004 = fator de diluição;

0,1 = fator para transformar para g/ em 100 mL.

2.2.2 Equação para cálculo da concentração da amostra

A concentração da solução da amostra pode ser quantificada através da equação 4:

$$Ca = \frac{Pa}{d} \times 0,20 \times 0,0004 \times 0,1 \quad (4)$$

Fonte: Da autora, 2021.

Sendo:

Ca = concentração da preparação amostra, em g/100mL;

Pa = peso da amostra, em mg;

0,20 = porcentagem de paracetamol no produto;

0,0004 = fator de diluição;

0,1 = fator para transformar para g/ em 100 mL;

d = densidade do produto, em g/mL.

2.2.3 Equação para cálculo do teor de paracetamol

O teor de paracetamol no produto pode ser calculado através da equação 5:

$$C_8H_9N_4NO_2 (\%) = \frac{Abs_A \times C_p}{Abs_p \times C_a} \times 100 \quad (5)$$

Fonte: Da autora, 2021.

Sendo:

Ca = concentração da preparação amostra, em g/100mL;

Abs_A = absorvância da preparação amostra;

Cp = concentração da preparação padrão, em mg/mL;

Abs_p = absorvância da preparação padrão.

3 MÉTODOS

O método de doseamento de paracetamol está descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, 2019, monografia “Paracetamol solução oral” (EF198-00) disponível no Anexo 1.

O equipamento utilizado é o espectrofotometro Uv-visível (mono-feixe) 190 a 1000 nm Modelo UV-M51 BEL. Conforme figura 1.

Figura 2 – Espectrofotômetro



Fonte: Da autora, 2021.

Para a realização do método prepara-se as soluções distintas contendo o produto e o padrão. As duas soluções possuem concentrações de 0,01 mg/mL do ativo paracetamol. Prepara-se também uma solução contendo apenas o diluente, chamada de solução branco, para zerar o equipamento.

Antes de realizar a análise utiliza-se a solução branco para zerar o equipamento.

Realiza-se duas leituras das soluções padrão e amostra no comprimento de onda de 249 nm.

Para avaliar a adequabilidade do sistema é realizada em sextuplicata da leitura da solução padrão. O Desvio padrão relativo (DPR) não deverá ser maior que 2%.

O cálculo de teor é realizado de acordo com as equações 3, 4 e 5 apresentadas no referencial teórico.

3.1 SELETIVIDADE

No parâmetro de seletividade foi avaliado a resposta analítica no placebo, na amostra e no padrão. Realizou-se a análise por meio da varredura num intervalo de absorbâncias de 200 a 300 nm.

O sinal analítico da amostra do produto deve ser similar a solução amostra contendo o padrão de paracetamol. O placebo não deve apresentar máximos de absorbância na faixa de quantificação do paracetamol

3.2 PRECISÃO

A precisão é o parâmetro que expressa a proximidade entre os resultados analíticos obtidos por diferentes analistas em diferentes dias, com objetivo de avaliar o método sob execução numa rotina laboratorial.

Nesse parâmetro é considerado a repetibilidade e a precisão intermediária.

3.2.1 Repetibilidade

Realizou-se o ensaio de seis amostras a 100% de concentração executadas por um mesmo analista e no mesmo dia, com o objetivo de expressar a variabilidade analítica do método.

3.2.2 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária foi realizada através de seis amostras com as mesmas concentrações realizadas na repetibilidade, porém executada por analista e dia distintos. Dessa forma foi possível avaliar o método quando ocorre alguma alteração intralaboratorial.

3.2.3 Critério de aceitação para Precisão

Os limites são baseados no guia do INMETRO DOQ-CGCRE-008 e descreve a aceitação de acordo com a concentração de ativo na amostra.

Sabendo que a formulação do fármaco paracetamol solução oral possui 20% de ativo, considera-se o limite mais restritivo de 10% que corresponde ao DPR de $\leq 1,9\%$ conforme tabela 1 apresentada no referencial teórico.

A avaliação ocorreu entre os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária através da média das leituras de cada uma e depois da média das médias obtidas e comparação entre os analistas, considerando DPR $\leq 1,9\%$. E aplicação do teste t e teste F com 95% de confiança.

3.3 EXATIDÃO

O parâmetro de exatidão foi determinado transferindo alíquotas de uma amostra sem o ativo (placebo) e alíquotas de uma amostra contendo o ativo utilizando uma substância química de referência (padrão). Verificou-se por meio de 9 amostras com 3 níveis de concentração: baixa, média e alta da concentração descrita.

3.3.1 Preparo das amostras

Realizou-se a preparação de uma solução estoque contendo o padrão de paracetamol referente a concentração de 1 mg/mL.

Preparou-se uma solução estoque de placebo contendo 125 mg em um balão de 25 mL diluído em álcool metílico.

A concentração da solução amostra do ativo para concentração de 100% é de 0,01 mg/mL de paracetamol, portanto, pipetou-se 1 mL da solução estoque de placebo seguido de uma alíquota da solução estoque do padrão* em um balão de 10 mL, completou-se o volume com álcool metílico e homogeneizou-se. Pipetou 1 mL da solução para um balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com álcool metílico e homogeneizou-se. Realizou-se o preparo das soluções com 80, 100 e 120% conforme tabela abaixo:

Tabela 4 - Preparo das amostras - Exatidão

PONTO	ALÍQUOTA DA SOLUÇÃO PLACEBO (mL)	ALÍQUOTA DA SOLUÇÃO ESTOQUE PADRÃO* (mL)	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (mg/mL)
80%	1,00	0,80	0,008
100%	1,00	1,00	0,010
120%	1,00	1,20	0,012

A especificação de recuperação é definida conforme DOQ-CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO, expressa na Tabela 2 apresentada no referencial teórico.

Visto que o teor do ativo no produto é 20%, adota-se a faixa de especificação mais restritiva de 98 a 102%.

O critério de aceitação do desvio padrão relativo deverá ser o mesmo do parâmetro de Precisão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

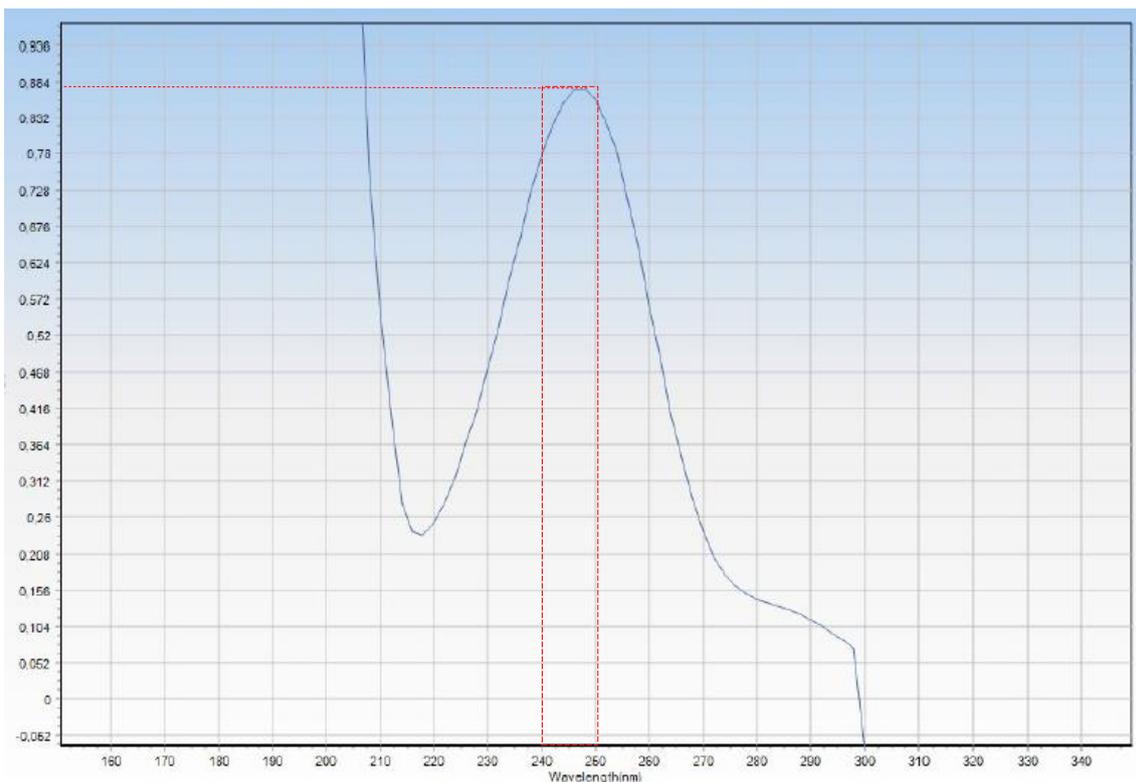
4.1 SELETIVIDADE

Foi executado uma varredura nos comprimentos de onda de 300 a 200 nm para amostra de padrão, produto e placebo.

A Figura 3 apresenta o espectro de varredura do padrão de paracetamol. Onde observa-se que a região do pico principal está entre os comprimentos de onda de 240 a 250 nm característico ao paracetamol. Confirmando a identidade da substância química de referência utilizada.

A absorbância encontrada foi aproximadamente de 0,884 e é utilizada para fins de comparação com a solução amostra.

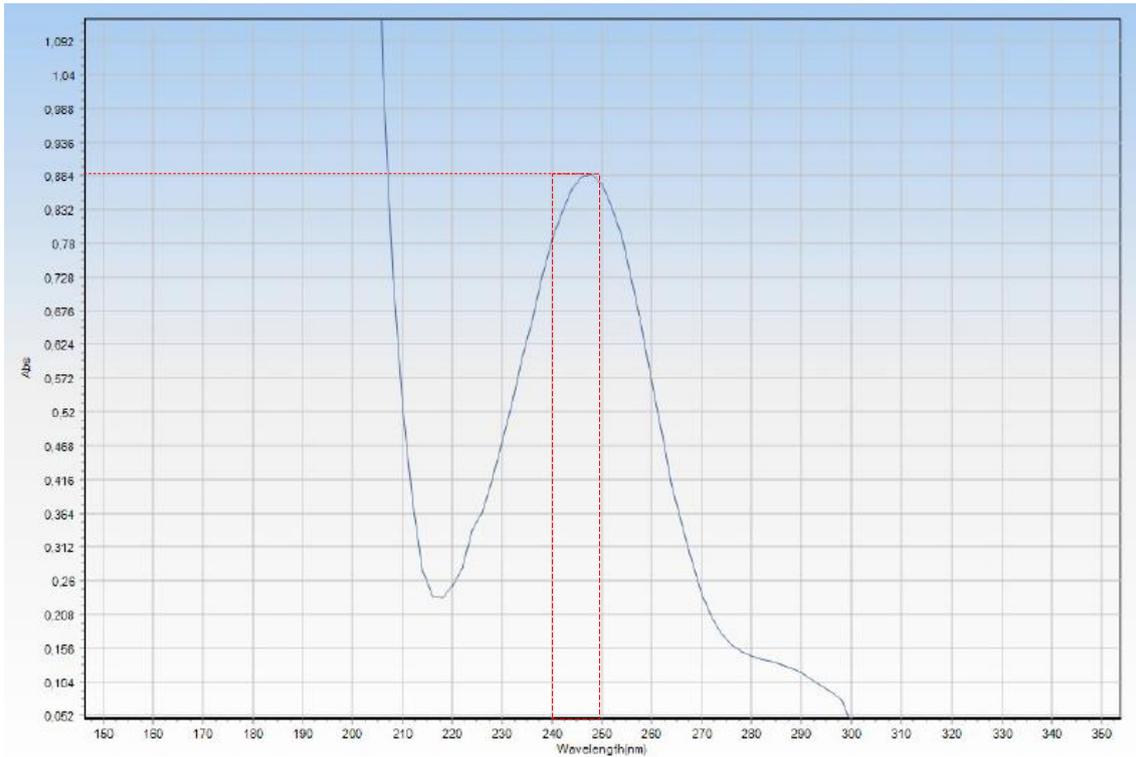
Figura 3 - Espectro do padrão



Fonte: Da autora, 2021.

Apartir da Figura 4 é possível visualizar o espectro de varredura da amostra do produto, sendo observável sua faixa de quantificação, entre 240 e 250 nm, através das linhas pontilhadas abaixo. Além disso, obteve-se uma absorbância de aproximadamente 0,884.

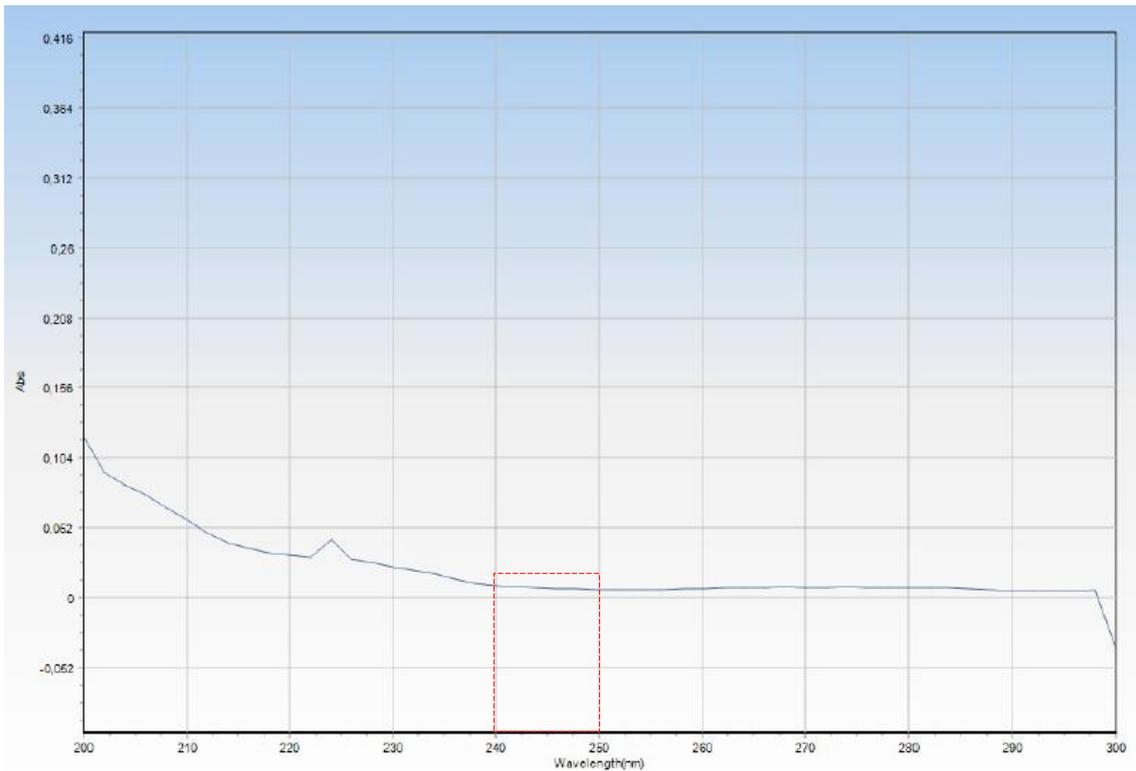
Figura 4 - Espectro da amostra



Fonte: Da autora, 2021.

Na figura 5 encontra-se o espectro de varredura da solução contendo o placebo do produto. Na região de absorção da solução amostra e padrão obteve-se absorbância próxima de zero.

Figura 5 - Espectro do placebo



Fonte: Da autora, 2021.

A partir dos espectros apresentados observa-se uma região de absorção próximo de 250 nm no padrão que se apresenta de forma muito similar no espectro da amostra de paracetamol. Além disso, nos dois espectros foi obtido absorvâncias muito próximas de 0,884.

No espectro de varredura do placebo, não se observa qualquer oscilação ou níveis de absorvância que possam representar qualquer grau de interferência analítico, além das oscilações naturais do ruído de linha de base entre as regiões de 220 e 230 nm.

O método é considerado seletivo já que não foi observado nenhum potencial interferente ou alterações significativas.

4.2 PRECISÃO

4.2.1 System suitability

Para a realização da repetibilidade o parâmetro de system suitability foi realizado e obtiveram-se os seguintes dados demonstrados abaixo:

Tabela 5 - Resultado system suitability - Repetibilidade

PESO DO PADRÃO (mg)	RÉPLICAS	LEITURA	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (DPR)	RESULTADO (%)
25,86	1	0,9517	≤ 2%	0,1070
	2	0,9513		
	3	0,9498		
	4	0,9500		
	5	0,9480		
	6	0,9491		

Fonte: Da autora, 2021.

O Desvio padrão relativo (DPR) entre as as réplicas foi de 0,107%, sendo inferior ao critério de aceitação de até 2%. Portanto, o sistema é considerado adequado para ser utilizado.

4.2.2 Repetibilidade

Os resultados do analista A pode ser expressos através da tabela abaixo:

Tabela 6 - Resultado da análise de Repetibilidade – Analista A

AMOSTRA	DENSIDADE DO PRODUTO (g/mL)	PESO DA AMOSTRA (mg)	ABS 01	ABS 02	MÉDIA	TEOR (%)
1	1,128	131,00	0,8153	0,8124	0,8139	99,51
2	1,128	113,65	0,7113	0,7095	0,7104	100,15
3	1,128	130,12	0,8154	0,8120	0,8137	100,20
4	1,128	129,62	0,8199	0,8218	0,8209	101,47
5	1,128	120,31	0,7499	0,7538	0,7519	100,14
6	1,128	136,81	0,8387	0,8367	0,8377	98,11
					MÉDIA	99,93
					DPR (%)	0,7473

Fonte: Da autora, 2021.

Pode ser observado que o DPR obtido de 0,7473%, encontra-se dentro da especificação de ≤ 1,9%, a metodologia atende, portanto, o primeiro parâmetro de repetibilidade.

4.2.3 Precisão Intermediária

Os resultados do analista B pode ser expressos através da tabela abaixo:

Tabela 7 - Resultado da análise de Precisão Intermediária – Analista B

AMOSTRA	DENSIDAD E DO PRODUTO (g/mL)	PESO DA AMOSTRA (mg)	ABS 01	ABS 02	MÉDIA	TEOR (%)
1	1,128	134,06	0,8335	0,8345	0,8340	99,68
2	1,128	132,04	0,8195	0,8205	0,8200	99,50
3	1,128	126,81	0,7764	0,7788	0,776	98,25
4	1,128	130,12	0,8019	0,8036	0,8028	98,86
5	1,128	142,69	0,8915	0,8939	0,8327	100,24
6	1,128	126,07	0,7632	0,7615	0,7624	96,90
MÉDIA						98,90
DPR (%)						0,9137

Fonte: Da autora, 2021.

O DPR de 0,9137% encontra-se dentro da especificação de $\leq 1,9\%$, a metodologia atende o parâmetro de precisão intermediária.

4.2.4 Comparação entre analistas

Os resultados obtidos pelos dois analistas que participaram da determinação da Precisão podem ser resumidos conforme a tabela 7.

Tabela 8 - Resultado geral de Precisão

SOLUÇÕES TESTE	ANALISTA 1	ANALISTA 2	MÉDIA GERAL	DPR (%) GERAL
1	99,51	99,68	99,42	0,9319
2	100,15	99,50		
3	100,20	98,25		
4	101,47	98,86		
5	100,14	100,24		
6	98,11	96,90		
MÉDIA INDIVIDUAL (%)	99,93	98,90		
DPR INDIVIDUAL (%)	0,7473	0,9137		

Fonte: Da autora, 2021.

O Desvio padrão relativo entre as réplicas de ambos os analistas foi de 0,9319 considerado aceitável frente à especificação de $\leq 1,9\%$ discutida no capítulo de métodos.

A baixa dispersão dos valores de teor de paracetamol associadas a considerável quantidade de repetições realizadas durante o ensaio de Repetibilidade e Precisão Intermediária, comprovam que os resultados são confiáveis para quantificação do princípio ativo no produto acabado Paracetamol Solução Oral utilizando o método avaliado.

4.2.5 Teste t

Através da Tabela 8 é apresentado o resultado para uma das ferramentas estatísticas utilizadas, o teste T entre variâncias equivalentes.

Tabela 9 – Dados do teste T entre variâncias equivalentes

	VARIÁVEL 1	VARIÁVEL 2
Média	99,930603	98,90479
Variância	1,2081369	1,441949
Observações	6	6
Variância agrupada	1,3250431	
Hipótese da diferença de média	0	
GI	10	
Stat t	1,5435306	
P(T<=t) uni-caudal	0,0768664	
t crítico uni-caudal	1,8124611	
P(T<=t) bi-caudal	0,1537327	
t crítico bi-caudal	2,2281389	

Fonte: Da autora, 2021.

O teste T considera o nível de similaridade existente entre as médias das observações dos dois grupos de dados. Como o $T_{\text{calculado}}$ 1,5435 é menor que o valor de $T_{\text{crítico}}$ de 2,228 para $n=10$ graus de liberdade e 5% de significância, aceita-se o fato de que a similaridade entre as médias amostrais é consistente e dependente da concentração real do analito.

4.2.6 Teste F

Os resultados do Teste F entre variâncias é apresentado através da tabela 10.

Tabela 10 – Dados do teste F entre variâncias

	VARIÁVEL 1	VARIÁVEL 2
Média	98,90479	99,9306
Variância	1,441949	1,208137
Observações	6	6
gl	5	5
F	1,193531	
P(F<=f) uni-caudal	0,425401	
F crítico uni-caudal	5,050329	

Fonte: Da autora, 2021.

O teste F avalia-se o nível de dispersão dos dados entres os grupos amostrais e verifica-se que 1,1935 como $F_{\text{calculado}}$ é menor que 5,0503 de F_{tabelado} para $n=5$ graus de liberdade e 5% de significância. Isso significa que os resultados obtidos pelos dois analistas são estatisticamente similares e quaisquer níveis de variação observados são intrínsecos do método, pois esse mesmo nível de erro foi refletido em ambos os grupos, não havendo, portanto, níveis significativos de erro que possam representar um risco para a confiabilidade dos resultados gerados pelo procedimento analítico em questão.

4.3 EXATIDÃO

A seguir serão apresentados os resultados referentes ao parâmetro de Exatidão nos pontos de concentração de 80, 100 e 120%.

4.3.1 Ponto 80%

A tabela 11 apresenta os resultados relativos ao ponto de concentração de 80%.

Tabela 11 – Resultados – Ponto 80%

RÉPLICA	PESO PADRÃO (mg)	ALÍQUOTA (mL)	CONCENT. (mg/mL)	ABS 1	ABS 2	MÉDIA	RECUPERAÇÃO (%)
1	25,54	0,800	0,008173	0,7019	0,7030	0,7025	99,96
2	26,75	0,800	0,008560	0,7436	0,7470	0,7453	101,26
3	25,68	0,800	0,008218	0,7166	0,7163	0,7165	101,40
DPR (%)							0,6029

Fonte: Da autora, 2021.

Pode-se observar que a recuperação do ativo foi satisfatória, atendendo os limites de 98 a 102% e o resultado de DPR de 0,6029% atende a especificação de $\leq 1,9\%$.

4.3.2 Ponto 100%

A tabela 12 apresenta os resultados referentes ao ponto de concentração de 100%.

Tabela 12 – Resultados – Ponto 100%

RÉPLICA	PESO PADRÃO (mg)	ALÍQUOTA (mL)	CONCENT. (mg/mL)	ABS 1	ABS 2	MÉDIA	RECUPERAÇÃO (%)
1	25,54	1,000	0,01028	0,8701	0,8739	0,8720	99,27
2	26,75	1,000	0,01070	0,9240	0,9277	0,9259	100,63
3	25,68	1,000	0,01027	0,8656	0,8658	0,8657	98,02
DPR (%)							0,8906

Fonte: Da autora, 2021.

Pode-se observar que a recuperação atendeu os limites de 98 a 102% e o resultado de DPR de 0,8906% atende a especificação de $\leq 1,9\%$.

4.3.3 Ponto 120%

Através da tabela 13 observa-se os resultados obtidos no ponto de 120%.

Tabela 13 – Resultados – Ponto 120%

RÉPLIC A	PESO PADRÃO (mg)	ALÍQUOT A (mL)	CONCEN T. (mg/mL)	ABS 1	ABS 2	MÉDI A	RECUPERAÇÃO (%)
1	25,54	1,200	0,01223	1,0486	1,0499	1,0493	99,54
2	26,75	1,200	0,01284	1,0983	1,1068	1,1026	99,87
3	25,68	1,200	0,01233	1,0711	1,0749	1,0730	101,24
DPR (%)							0,6810

Fonte: Da autora, 2021.

A recuperação obtidas das réplicas estão dentro dos limites de 98 a 102% e o resultado do Desvio Padrão Relativo de 0,6810% atende a especificação de $\leq 1,9\%$.

4.3.4 Resumo de resultados:

A tabela 14 abaixo apresenta o resumo dos resultados dos três pontos de concentração do ativo no produto acabado.

Tabela 14 – Resumo de resultados para a Exatidão

PONTO	RÉPLICA	RESULTADO (%)	MÉDIA (%)	DPR (%)
80	1	99,96	100,87	0,6029
	2	101,26		
	3	101,40		
100	1	99,27	99,31	0,8906
	2	100,63		
	3	98,02		
120	1	99,54	100,22	0,6810
	2	99,87		
	3	101,24		

Fonte: Da autora, 2021.

Mediante análise dos resultados, observa-se que as médias da recuperação dos três pontos encontram-se dentro da faixa de especificação descrita para a exatidão de 98 a 102%. O Desvio Padrão Relativo para os três pontos de concentração 80%, 100% e 120% foram 0,6029, 0,8906 e 0,6810 respectivamente, sendo abaixo da especificação de $\leq 1,9\%$.

O método, portanto, comprova a sua eficiência em recuperar, medir e quantificar o composto de interesse em diferentes concentrações sem que existam fatores que influenciem no processo.

5 CONCLUSÃO

O método analítico mostrou-se seletivo em todos os aspectos ensaiados demonstrando que não ocorrem interferências na observação da resposta do teor de paracetamol no produto acabado decorrentes de outros compostos que possam ficar sobrepostos no mesmo espectro.

Quanto à precisão, os resultados foram reprodutíveis, comprovados pela concordância entre os teores obtidos entre as amostras da repetibilidade, sendo a média de 99,93% e estes comparados com o da precisão intermediária de 98,90%, o que descarta o fator de influência do analista. A exatidão comprovou que houve concordância e aceitabilidade dos dados obtidos através de testes de adição de padrão de paracetamol no placebo para diferentes teores propostos.

Por fim, de acordo com os parâmetros de seletividade, precisão e exatidão, descritos na RDC 166 de 25 de julho de 2017 e o DOQ-CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO, e em consonância com os resultados apresentados e discutidos, o método em estudo pode ser considerado validado, possui um alto grau de confiança quanto aos resultados gerados em sua aplicação nas análises de rotina para determinação de substância ativa em formulação farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª ed. Brasília, 2019.

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. 2017.**

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 200. 2017.**

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 301. 2019.**

DOQ-CGCRE-008 - REVISÃO 08. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos.** INMETRO, Rio de Janeiro, ABR/2020.

LOURENÇÃO, Bruna Cláudia. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro.** 2009. 139p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MORETTO L.D., SHIB M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology.** 4:4- 48. 2000.

MOURA, J.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicável ao desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos de olanzapina.** 2009. Dissertação (Pós-graduação em ciências farmacêuticas) - Universidade federal de Goiás, Goiânia.

NETO, Alex Malavazi dos Santos. **Pesquisa e desenvolvimento na indústria farmacêutica brasileira.** 2005. 60 f. (Mestrado em Trabalho de Conclusão de Curso - TCC) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2005.

ROCHA, F. R. P; TEIXEIRA, L; S. G. **Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS.** Química Nova, v. 27, p. 807-812, 2004.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8ª Edição Norte Americana. São Paulo: Thomson, 2006.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 5^o edição. Porto Alegre, 2002.

WEINERT, P. L; PEZZA, L; PEZZA, H. R. **Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas**. Química Nova, p. 1112-1116, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 – MONOGRAFIA FARMACOPEICA

Farmacopeia Brasileira, 6ª edição EF198-00

PARACETAMOL SOLUÇÃO ORAL

Contém, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da quantidade declarada de $C_8H_9NO_2$.

IDENTIFICAÇÃO

O teste de identificação A. pode ser omitido se forem realizados os testes B. e C. O teste de identificação C. pode ser omitido se forem realizados os testes A. e B.

A. No espectro de absorção no ultravioleta (5.2.14), na faixa de 200 nm a 400 nm, da solução amostra obtida no método A. de *Doseamento*, há máximo de absorção em 249 nm, idêntico ao observado no espectro da solução padrão.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1), utilizando sílica-gel GF₂₅₄, como suporte, e mistura de cloreto de metileno e álcool metílico (4:1), como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 20 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir:

Solução (1): diluir a solução oral em álcool metílico até concentração de 1 mg/mL.

Solução (2): dissolver 10 mg de paracetamol SQR em álcool metílico e completar o volume para 10 mL com o mesmo solvente.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Examinar sob luz ultravioleta. A mancha principal obtida com a *Solução (1)* corresponde em posição àquela obtida com a *Solução (2)*.

C. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método B. de *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

Teste de gotejamento (5.1.8). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 3,8 a 6,5.

ENSAIOS DE PUREZA

Limite de 4-Aminofenol. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 272 nm; coluna de 200 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (10 µm), mantida à temperatura de 25 °C; fluxo da *Fase móvel* de 2,0 mL/minuto.

Fase móvel: preparar solução de butanossulfonato de sódio 0,01 M, utilizando como solvente mistura de água, álcool metílico e ácido fórmico (85:15:0,4).

Solução (1): preparar solução a 4,8 mg/mL da amostra em *Fase móvel*. Filtrar se necessário.

Solução (2): preparar solução a 24 µg/mL de 4-aminofenol SQR em *Fase móvel*.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução (1)* e da *Solução (2)*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. A área sob o pico correspondente ao 4-aminofenol obtido no cromatograma com a *Solução (1)* não é maior que a área sob o pico principal obtido no cromatograma com a *Solução (2)* (0,5%). No cromatograma obtido com a *Solução (1)*, picos com um longo tempo de retenção podem ocorrer devido à presença de conservantes na formulação.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Transferir volume da solução oral para balão volumétrico e diluir em álcool metílico de modo a obter solução a 1 mg/mL. Transferir 1 mL da solução resultante para balão volumétrico de 100 mL, adicionar 1 mL de ácido clorídrico 0,1 M, completar o volume com álcool metílico e homogeneizar. Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando os mesmos solventes. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 249 nm, utilizando solução metanólica de ácido clorídrico 0,1 M para ajuste do zero. Calcular a quantidade de $C_8H_9NO_2$ na solução oral a partir das leituras obtidas. Alternativamente, realizar os cálculos considerando $A(1\%, 1\text{cm}) = 880$, em 249 nm.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 243 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm), mantida à temperatura de 25 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de água e álcool metílico (75:25).

Solução amostra: transferir volume, medido com exatidão, de solução oral equivalente a 200 mg de paracetamol para balão volumétrico de 200 mL, completar o volume com *Fase móvel* e homogeneizar. Transferir 1 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com *Fase móvel*, homogeneizar e filtrar.

Solução padrão: dissolver quantidade, pesada com exatidão, de paracetamol SQR em *Fase móvel*, de modo a obter concentração final de 0,01 mg/mL.

Injetar replicatas de 10 µL da *Solução padrão*. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas sob os picos registrados é, no máximo, 2,0%.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular a quantidade de $C_8H_9NO_2$ na solução oral a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.