

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL
ÉRIC WESLEY PINHEIRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO QUÍMICA DE
TRABALHO ATENOLOL POR HPLC**

TOLEDO

2019

ÉRIC WESLEY PINHEIRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES QUÍMICAS
DE TRABALHO ATENOLOL POR HPLC**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção do Título de Especialista em Análise Instrumental.

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Figueira Marins Coutinho.

TOLEDO

2019



Ministério da Educação
Universidade Federal Tecnológica do Paraná
Diretoria de Pesquisa e Pós-graduação
Especialização em Análise Instrumental

TERMO DE APROVAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL

Por

Éric Wesley Pinheiro dos Santos

Esta monografia foi apresentada às 16:00 h do dia 06 de junho de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista no Curso de Especialização em Análise Instrumental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____

Prof. Dr Lincoln Figueira Marins Coutinho
UTFPR – Campus Toledo (orientador)

Prof.^a Dr.^a. Viviane da Silva Lobo
UTFPR – Campus Toledo

Prof. Dr. Douglas Dragunski
UTFPR – Campus Toledo

Dedico este trabalho à minha família, minha estrutura mais firme, e a todos aqueles que se empenham de forma direta ou indireta pelo progresso da Ciência e da Saúde, junto a processos químicos de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Todo Poderoso Deus, que me concedeu oportunidade e força para desenvolver o projeto, finalizando mais um desafio de crescimento em minha carreira.

À Prati-Donaduzzi, por disponibilizar espaço, equipamentos, compostos e material de registro fotográfico; entre outros recursos materiais e humanos.

Aos Mestres e Orientador, pelo substancial compartilhamento de saberes, ante o aprendizado e ajuste da pesquisa.

Com grande apreço, deixo registrada a gratidão a meus pais Ataíde e Edy, que foram pilar de respeito e integridade pra que eu chegasse até aqui.

Em especial agradeço à Nádia, minha amada esposa, pelo apoio e compreensão durante meus momentos de ausência em virtude da imprescindível dedicação às horas de estudo.

Às minhas filhotas Brunna e Heloisa, motivo de busca por crescimento e sem dúvida, minha fonte de inspiração.

RESUMO

O funcionamento corporal depende do bom fluxo sanguíneo, que circula vários componentes vitais e trabalha integradamente exercendo certa pressão sobre os vasos sanguíneos, a qual pode ser alterada por fatores diversos. Assim, a hipertensão, também conhecida como *pressão alta*, é uma enfermidade crônica e silenciosa cujo tratamento o Sistema Único de Saúde oferece gratuitamente alguns medicamentos. Entre tais medicamentos se encontra o atenolol, que faz parte deste estudo, cujo objetivo consiste em avaliar a estabilidade das soluções químicas utilizadas na rotina laboratorial de análise do controle de qualidade da empresa Prati-Donaduzzi através da elaboração de um protocolo de estudo de estabilidade para soluções química de trabalho, avaliação da estabilidade desta solução em horas e a melhor forma de armazenamento após o preparo, evitando desperdícios. Após a avaliação de custos, levantamento literário, preparo das amostras, realização dos testes cromatográficos e a interpretação dos seus resultados, pôde-se observar uma estabilidade para solução maior que 148 horas.

Palavras chave: Soluções padrão. Atenolol. Cromatografia. Estabilidade. Avaliação.

ABSTRACT

The bodily functioning depends on the good blood flow, which circulates several vital components and works integrally exerting some pressure on the blood vessels, which can be altered by several factors. Thus, hypertension, also known as high blood pressure, is a chronic and silent disease whose treatment the Unified Health System offers some medicines for free. Among these drugs is atenolol, which is part of this study, whose objective is to evaluate the stability of the chemical solutions used in the routine laboratory of analysis of quality control of the company Prati-Donaduzzi through the elaboration of a stability study protocol for chemical solutions of work, evaluation of the stability of this solution in hours and the best form of storage after the preparation, avoiding wastes. After cost evaluation, literary survey, preparation of samples, performance of the chromatographic tests and the interpretation of its results, a stability for solution greater than 148 hours could be observed.

Keywords: Standard solutions. Atenolol. Chromatography. Stability. Evaluation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural do atenolol.....	14
Figura 2 – Composto do estudo em questão.....	22
Figura 3 – Cromatógrafo Líquido com amostrador automático sem refrigeração modelo <i>Shimadzu</i> série 20.....	23
Figura 4 – Coluna cromatográfica utilizada no procedimento marca Akzo Nobel C-18	25
Figura 5 – Representação gráfica do Experimento 1 (estabilidade de soluções padrão de atenolol em estufa).....	28
Figura 6 – Representação gráfica do Experimento 2 (estabilidade de soluções padrão de atenolol em geladeira).....	30
Figura 7 – Análise cromatográfica pelo software Empower® 3.....	32
Figura 8 – Informações sobre a curva de calibração da solução.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da avaliação da estabilidade de soluções padrão de atenolol em estufa	27
Tabela 2 – Resumo da avaliação da estabilidade de soluções padrão de atenolol em geladeira	29
Tabela 3 - System Inicial P1.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUS Sistema Único de Saúde

RE Resolução

HPLC *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EMA *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (Agência Europeia de avaliação dos medicamentos)

ICH *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (Conferência Internacional de harmonização dos requisitos técnicos para registro de produtos farmacêuticos para uso humano)

LISTA DE SÍMBOLOS

mg	Miligramma
mL	Mililitro
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO LITERÁRIA	15
2.1 A CROMATOGRAFIA E SUA RELEVÂNCIA PARA AS TECNOLOGIAS EM FARMACÊUTICA	15
2.2 O ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA	17
3 OBJETIVOS	21
3.1 GERAL	21
3.2 ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	22
4.2 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS	22
4.3 A INSTRUMENTAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC)	23
4.4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	24
4.4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	24
4.4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA	25
4.4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	40
ANEXO A - PROTOCOLO DE ESTUDO DE ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO DE SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO NA ROTINA LABORATORIAL DO CONTROLE DE QUALIDADE PRATI-DONADUZZI	40
ANEXO B - FICHA DO PRODUTO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO ATENOLOL DO LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE PRATI-DONADUZZI	45

1 INTRODUÇÃO

O funcionamento corporal depende do bom fluxo do sangue, que circula nutrientes, gases respiratórios, hormônios e outros componentes, trabalhando integradamente. Profissionais da saúde indicam que a pressão arterial normal corresponde a 120/60 mmHg, isto é, 120 por 60 milímetros de mercúrio, apontando a força do sangue contra a parede dos vasos sanguíneos, a qual pode sofrer alteração por vários fatores socioambientais como má alimentação, estresse, tabagismo, sedentarismo e consumo de álcool, originando a hipertensão, doença crônica e silenciosa. Conforme Lima et al. (2011), exigindo tratamento contínuo e meticuloso essa doença passou a ter destaque na saúde pública e segundo o Ministério da Saúde (2019) no ano de 2017 já afetava 60,9% entre adultos maiores de 65 anos.

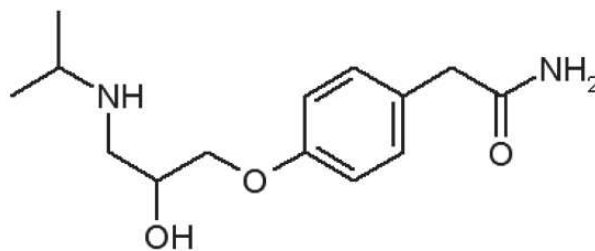
O Sistema Único de Saúde (SUS) oferece gratuitamente alguns medicamentos para o tratamento da hipertensão e desde 2018 o atenolol (em composições de 25 a 100 mg) consta na lista. Assim, Rempel et al. (2015, p.243) expõe o caráter imprescindível da análise na busca pela garantia de um tratamento assertivo e que evite efeitos adversos graves devido o consumo de dada composição. Nas tecnologias em saúde e farmacêutica, os procedimentos envolvem a análise quantitativa e qualitativa de medicamentos, sua estabilidade química e atuação no organismo. Porém, como infere Remondi et al. (2017, p.217), é comum aos governos a necessidade de encontrar o equilíbrio entre a inserção de novas tecnologias, aumento de custos e segurança efetiva.

Na conjuntura entre as necessidades e as perspectivas tecnológicas para saúde, a legislação brasileira estabelece parâmetros para a validação analítica, conforme a RE nº 166/2017 e acerca de quantificação de produtos e degradação na RE nº 53/2005, em estudos de estabilidade de medicamentos (CARDOSO FREITAS; PERARO NASCIMENTO 2014, p.285).

Na indústria farmacêutica a cromatografia vem evoluindo para maior precisão, com análises mais rápidas e eficientes (Maldaner; Jardim, 2009, p.214), e a cromatografia líquida de alta performance, HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica instrumental confiável que pode ser utilizada em vários estágios de pesquisa, separando, identificando e quantificando

substâncias nas composições (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2006). Logo, é uma ferramenta utilizada na avaliação do atenolol, um β bloqueador cardiosseletivo, quimicamente descrito como 4-(2-hidroxi-3- isopropilaminopropoxi) fenilacetamida e que se trata de um composto com massa molar de 266,34 g/mol, fórmula molecular $C_{14}H_{22}N_2O_3$ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2004).

Figura 1 - Fórmula estrutural do Atenolol



Fonte: Cardoso Freitas; Peraro Nascimento (2014, p. 286).

Durante a execução de análises de doseamento de produto acabado na Prati-Donaduzzi, foi observado que, grande parte das soluções químicas de trabalho destinadas à análise, era fracionada em frascos de vidro e o restante dessas soluções era descartado; gerando a necessidade de avaliar por quanto tempo essas soluções poderiam ser utilizadas sem perda da estabilidade química, que conforme Dotse (2017, p.25), avalia a manutenção das respostas das soluções analíticas preparadas com diluente dentro de um determinado intervalo de tempo, pois sem avaliação não se pode garantir a qualidade nem a efetividade:

O objetivo principal da validação de um método analítico consiste na demonstração que o mesmo é adequado para o seu propósito, pretendendo-se confirmar que quando utilizado em rotina, nas diversas fases do ciclo de vida do produto, é capaz de manter resultados fiáveis e reprodutíveis (SOUSA 2018, p.09).

Os estudos de estabilidade então permitem aprimorar processos pertinentes na produção de fármacos, afinal, a estabilidade dos medicamentos é definida como o tempo durante o qual o insumo farmacêutico ativo mantém suas características dentro dos limites especificados (SILVA et al., 2009.).

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 A CROMATOGRAFIA E SUA RELEVÂNCIA PARA AS TECNOLOGIAS EM FARMACÊUTICA

Com o surgimento de doenças de longo ou contínuo tratamento no decorrer do tempo, a indústria farmacêutica se viu compelida a desenvolver tecnologias de alta resolução para análise e certificação qualitativa de seus produtos e insumos, que evidentemente remete ao tratamento adequado dos pacientes consumidores de seus medicamentos.

Contudo, respeitar o princípio da individualidade biológica e mesmo assim produzir medicamentos eficientes no tratamento de doenças que acometem grande parte da população é certamente um aspecto de signo desafiador. Nesse quadro Guedes e Paganini (2017, p.08) comentam que entre outros avanços para a promoção da saúde, o desenvolvimento, o emprego e a validação da metodologia de análise de fármacos amplamente utilizados pela população, com o uso da cromatografia líquida é importantíssimo.

O botânico russo Mikhail Tswett logo após a virada do século XX, inventou a cromatografia, ele empregou a técnica para separar vários pigmentos de plantas, como as clorofilas e xantofilas, passando estas soluções através de colunas de vidro recheadas com carbonato de cálcio finamente compactado.

Segundo Skoog, et.al. (2006) as espécies separadas apareceram como bandas coloridas na coluna, o que explica o nome que ele escolheu para a técnica de separação (do grego *chroma*, que significa “cor”, e *graphein*, que significa “escrever”). “Os métodos de separação têm sido empregados durante quase toda a história da humanidade, através de experiências com separações sólidas e líquidas, como consequência consagrou-se a cromatografia” (Gasperin et al. 2017, p.01), a qual consiste num método físico-químico de separação de componentes de uma mistura por diferença de afinidade entre as fases estacionária e móvel.

A fase estacionária costuma ser sólida, porosa, e na forma de pequenas partículas. A tecnologia de fabricação de partículas esféricas de tamanho e porosidade controlados está bem desenvolvida, já que segundo Kazakevich e

LoBrutto (2006), há alguns anos as propriedades da sílica vêm sendo estudadas. Em adição, a fase estacionária pode ser a sílica descoberta (na cromatografia por adsorção) ou a fase estacionária pode estar ligada covalentemente ao seu suporte (na cromatografia por partição).

É interessante destacar que “os primeiros materiais empregados como suporte foram os óxidos inorgânicos de silício (SiO_2 – sílica) e de alumínio (Al_2O_3 – alumina) ... sendo a sílica o melhor material utilizado como suporte cromatográfico na preparação de fases estacionárias” (CARVALHO, 2017, p.19-20). Dentre as fases estacionárias mais comuns podemos citar as polares: amino, ciano, diol e as apolares: octadecil (C-18), octil (C-8) e fenil (C-PH).

Por sua vez, a fase móvel é composta por solventes de diferentes polaridades e o sistema composto de fase estacionária mais apolar em relação à fase móvel é classificado como cromatografia líquida em fase reversa, mais usualmente utilizada para separação de substâncias, onde a separação das moléculas ocorre pela sua diferença de hidrofobicidade (MAKAROV et al., 2008). Moléculas hidrofílicas ficam menos retidas em uma coluna de fase reversa comparadas a moléculas hidrofóbicas, quanto mais tempo o soluto fica retido na fase estacionária, maior o fator de retenção em relação ao tempo total de análise.

A cromatografia constitui-se num aparato metodológico de boa precisão, onde conforme as fases, componentes vão sendo observados e podem ser descritos de forma seccionada, porém sem perder o *status* de integração entre si. Essa análise possui inúmeras justificativas, entre as quais está o conhecimento mais aprofundado do composto e seus componentes essenciais, pois conforme Rempel et al (2015, p.241-242), os medicamentos, nos últimos anos não se configuram somente como um instrumento terapêutico, mas na verdade um elemento complexo na sociedade moderna, podendo desencadear a perigosa ocorrência do processo de interações medicamentosas. Assim, Oriqui e Mori (2013, p.340) explanam que junto à estabilidade e os fatores que a influenciam, estão a confiabilidade do produto e sua concernente aceitação ao mesmo:

O propósito do teste de estabilidade é fornecer evidências de como a qualidade de um produto varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, e estabelecer um prazo de validade para os produtos além de recomendar condições de armazenamento adequadas. O prazo de

validade fica então definido como o tempo, desde sua fabricação, em que um produto mantém suas características de qualidade dentro de padrões estabelecidos por lei e/ou aceitáveis por parte do consumidor.

Sendo o atenolol um medicamento de vasta utilização e demanda populacional, faz-se imprescindível o cuidado na análise de seu estado físico-químico, suas propriedades e proporções. Dentro desse contexto existe a necessidade pungente da canalização de recursos dentro do SUS para a melhoria da saúde da população brasileira e esse processo sem dúvida passa pelo advento de novas metodologias e processos científicos, absorvendo os anseios e as perspectivas mais específicas da indústria farmacêutica com relação à qualidade produtiva.

A qualidade da cadeia produtiva precisa ser encarada com alta responsabilidade visto que a distribuição e o armazenamento constituem-se, então, em responsabilidades compartilhadas com outras esferas sociais (unidades hospitalares e/ou básicas de saúde, redes de farmácia, transportadoras, pacientes, etc.) e o consumo de responsabilidade do próprio paciente; e mesmo assim a soma de todos esses fatores interfere de modo positivo ou não na ação medicamentosa e por subseqüência, no tratamento do indivíduo.

Assim, segundo explana Schmidt et al (2011, p.70), “para racionalizar os gastos, diretrizes e protocolos tem sido progressivamente produzidos, especialmente para orientar o uso de procedimentos de alta complexidade, e foi criado um arcabouço para a avaliação e a incorporação de tecnologias em saúde.”

2.2 O ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA

A estabilidade é uma condição fundamental para a eficácia dos componentes químicos, fruto da estruturação de suas ligações, o que pode sofrer influência de fatores abióticos como luz, umidade e choques mecânicos ou térmicos, por exemplo. Conhecer e analisar a validação de compostos químicos remete ao resultado

esperado pelos mesmos, buscando cada vez mais qualidade de vida para seus usuários.

Os medicamentos podem coexistir em diversos formatos, conforme o que for melhor a fins de utilização. Por exemplo, no caso de crianças, os medicamentos em geral são apresentados em estrutura líquida ou pastosa, com cor e aroma de frutas vermelhas, cítricas ou adocicadas, para facilitar o consumo por esse público. Silva et al (2013) afirma que os comprimidos são compostos em forma sólida, drogas lícitas de estabilidade físico-química e composição precisa, além de manuseio mais prático.

As agências regulamentadoras internacionais, como EMEA (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*), ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) trouxeram vários alinhamentos para melhor delimitar os parâmetros analíticos de estabilidade de produtos farmacêuticos de uso humano. São relevantes as informações e alinhamentos provenientes dessas agências e instituições referência em estudos de estabilidade e na área de atuação farmacêutica (ORIQUI, 2012).

Validar as condições de estabilidade dos medicamentos utilizando tecnologias analíticas em prol da saúde, a fim de minimizar efeitos indesejáveis e potencializar o tratamento adequado aos pacientes, bem como compreender seus mecanismos de ação, são diretrizes preconizadas pelo Ministério da Saúde junto à oferta dos medicamentos pelo SUS e conseqüentemente melhorar as condições de vida da população.

Sem estes procedimentos necessários a fabricação de medicamentos, seria no mínimo irresponsabilidade permitir o acesso de produtos farmacêuticos e certamente traria danos irremediáveis à saúde da população que faz uso de medicamentos. Com a condição peculiar de cada organismo, já é possível a existência de reações adversas ao esperado por determinadas substâncias, sem a validação, essa proporção alcançaria uma escala ainda maior, desde um breve mal estar a complicações secundárias ou avanço do quadro patológico em decorrência da ineficácia do medicamento.

As reações adversas mais comuns constituem-se de taquicardia reflexa, cefaléia, tonturas, rubor

facial, edema maleolar, hipertrofia gengival e constipação intestinal (NOBRE 2013, p.267).

A ANVISA, através da Resolução RE n° 398 (2004), de medicamentos, define prazo de validade como a data limite para a utilização de um determinado produto farmacêutico estabelecido pelo fabricante, a partir dos determinados testes de estabilidade com preservação das condições de armazenamento e transporte na distribuição primária.

Ainda de acordo com a ANVISA, Resolução RE n° 1, (2005), define que estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais de acondicionamento, como temperatura, luz e umidade, dentre outros fatores relacionados, intrinsecamente a características do próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos utilizados, forma farmacêutica e composição durante o processo de fabricação, interação com os materiais de embalagem destinados a proteger ou acondicionar o proteger o medicamento. A Resolução RE n°. 398 (ANVISA, 2004), estabelece três tipos de estudos nesses testes:

- Estudo de estabilidade acelerado que avalia a degradação química acelerada, através de mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento e as alterações mediante a exposição curta em condições ambientais fora daquelas pré-estabelecidas no rótulo do produto.
- Estudo de estabilidade de longa duração: avalia características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e posteriormente a expiração do prazo de validade determinado para o produto.
- Estudo de estabilidade de acompanhamento em processo: avalia se o produto mantém inalteradas suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade previamente realizados.

As agências regulamentadoras avaliam a estabilidade do medicamento em si, e não contemplam a estabilidade das soluções analíticas destinadas à análise do produto acabado. Visando assegurar a qualidade das análises destinadas a avaliar o produto acabado e conseqüentemente dos medicamentos, o controle de qualidade

da indústria farmacêutica utiliza-se de soluções de substâncias químicas de trabalho, com teor conhecido para identificar e quantificar o fármaco de interesse em amostras de produto acabado, onde submetem a rigorosos testes de qualidade para que após sua aprovação sejam comercializados.

Assim, Mattos (2017, p.02) expressa que entre as finalidades dos estudos de estabilidade na farmacêutica, existe a necessidade de garantir a segurança do consumidor:

Dentre todas as vantagens relacionadas à condução dos estudos de estabilidade e estudos de estresse, deve-se ressaltar que tais estudos visam demonstrar que os possíveis produtos de degradação formados não irão interferir na qualidade, segurança e eficácia do medicamento desenvolvido, garantindo a segurança do paciente.

Ou seja, aprimorando a avaliação, é possível estender a técnica a outros compostos, para redução de custos relacionados produção e de análise do medicamento, e conseqüentemente para o aumento do fluxo financeiro. Afinal se durante os procedimentos produtivos, na falta de um protocolo são necessários novos preparos constantemente, envolvendo os custos que lhe são inerentes, conhecer a estabilidade do composto bem como sua melhor condição de armazenamento e o período em que se mantém estável e por isso adequado, é de suma relevância à indústria farmacêutica.

Logo, dentro desse quadro Patrício (2014, p.127) afirma que “um estudo de estabilidade destina-se a fundamentar a definição do prazo de validade e condições de armazenamento de certo produto efetuado com lotes industriais”.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O estudo tem por objetivo avaliar a estabilidade da solução substância química de trabalho atenolol, utilizadas na rotina laboratorial de análise do controle de qualidade de produto acabado, setor de análise instrumental da empresa Prati-Donaduzzi.

3.2 ESPECÍFICOS

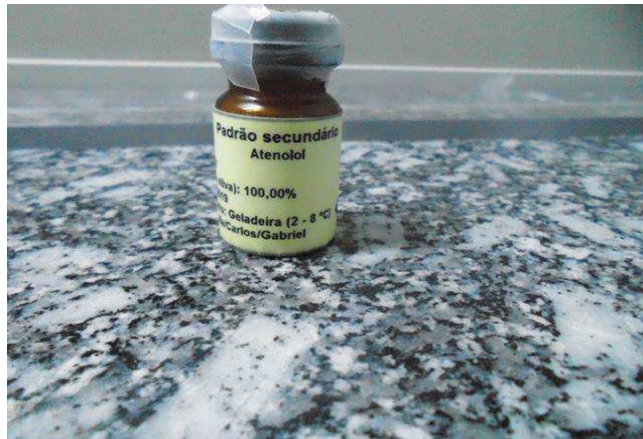
- Elaborar o protocolo de estudo de estabilidade para soluções de substância química de trabalho aplicável ao setor de controle de qualidade da empresa;
- Avaliar a estabilidade e a influência da temperatura na solução substância química de trabalho atenolol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra do estudo constitui-se de substância química de trabalho atenolol (figura 2), utilizada na rotina de análise na forma de solução com concentração conhecida gentilmente cedida pela empresa farmacêutica Prati-Donaduzzi.

Figura 2 – Composto do estudo em questão.



Fonte: Autoria própria (2019).

4.2 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS

Os testes ocorreram concomitantemente aos testes do controle de qualidade para a liberação dos lotes de produto acabado produzidos pela empresa, e os custos relacionados a insumos, reagentes, materiais e equipamentos, serão inclusos ao processo do setor de controle de qualidade, cabendo ao estudo somente o armazenamento destas soluções devidamente identificadas por um período prolongado e a reinjeção destas soluções armazenadas para posterior avaliação.

4.3 A INSTRUMENTAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC)

Parâmetros como precisão, linearidade e faixa linear, limite de quantificação e detecção, robustez, seletividade e exatidão são inerentes ao procedimento cromatográfico, junto à validação dos compostos químicos (Aragão et al., 2009). As análises das soluções foram avaliadas por técnica cromatográfica líquida em cromatógrafo da marca Shimadzu modelo: série 20 com amostrador automático não refrigerado (figura 3).

O preparo das soluções de substância química de referência de trabalho seguiu a metodologia vigente para a avaliação do teor do produto acabado de atenolol da empresa.

A obtenção dos cromatogramas foi realizada pelo software EMPOWER® 3, no qual foi possível observar parâmetros cromatográficos de interesse, tais como as áreas de pico de interesse que serão determinantes para a obtenção do fator resposta, o qual será utilizado para a avaliação da estabilidade das soluções do estudo, todas estas gentilmente cedidas pela empresa Prati-Donaduzzi no setor de Controle de Qualidade.

Figura 3 - Cromatógrafo Líquido com amostrador automático sem refrigeração modelo *Shimadzu* série 20.



Fonte: Autoria própria (2019).

Para a validação do sistema cromatográfico serão calculados, fator resposta, erro relativo percentual nas seis injeções sucessivas da solução padrão 1 e a recuperação do controle frente à curva analítica do sistema inicial; e as fórmulas para os seguintes cálculos estão expressas abaixo:

$$FR = (Ap \times FDP \times 100) / (mp \times Tp \times Vinj)$$

A área do pico da solução padrão é o Ap , o fator de diluição em mL é o FDP , a massa em mg é mp e o teor do padrão é o Tp , (previamente padronizado por análise em HPLC). O volume de injeção é representado por $Vinj$.

4.4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Cada unidade da amostra foi armazenada em diferentes condições: geladeira a uma temperatura de 2°C a 8°C; e em estufa a uma temperatura de 30°C, ambas protegidas da luz do sol, a amostra foi acondicionada em frasco de vidro âmbar devidamente identificados. Conforme preconizado para o estudo de estabilidade, cada unidade da amostra foi analisada em diferentes momentos: no momento inicial (T_0), logo após a diluição; depois, diariamente até conclusão da sequência de lote.

4.4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O estudo de estabilidade das soluções de substância química de trabalho atenolol foi validado sob as seguintes condições: volume de injeção correspondente a 10 µL num fluxo de 0,6 mL por minuto, utilizando como fase estacionária: coluna cromatográfica em temperatura ambiente do tipo: C18 300 mm X 3.9 mm X 5.0 µm fabricante: Akzo Nobel ou equivalente, onde o pico da solução de atenolol foi detectado em comprimento de onda específico de 226 nm, tempo total da corrida 15 minutos, tempo de retenção do ativo entre 9 e 12 minutos, pratos teóricos da coluna

> 5.000, assimetria de pico < 2,0. O Desvio Padrão Relativo < 2,0, a fase móvel foi obtida através do preparo de 1,1g de 1-heptanossulfonato de sódio e 0,71g de fosfato de sódio dibásico anidro em 700 mL de água purificada, adicionou-se 2 mL de dibutilamina, ajustou-se então o pH da fase móvel em 3,0 com solução de ácido fosfórico 0,8 M, e se adicionou 300 mL de metanol e homogeneizou-se. Filtrou-se em membrana hidrofóbica 0,45 µm e desgaseificou-se em ultrassom.

4.4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA

Para o preparo da solução amostra, pesou-se 10 mg da substância química de trabalho atenolol para um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 50 mL de fase móvel, levou-se ao ultrassom até completa solubilização, resfriou-se à temperatura ambiente e completando o volume com fase móvel até homogeneização. Posteriormente transferiu-se 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL completou-se o volume com fase móvel e homogeneizou-se. Por fim, filtrou-se em membrana PET 0,45 µm obteve-se uma concentração de 0,01 mg/mL.

Figura 4 – Coluna cromatográfica utilizada no procedimento marca Akzo Nobel C-18.



Fonte: Autoria própria (2019).

4.4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na literatura há poucos artigos que determinem estabilidade de soluções padrão, porém se sabe que a temperatura pode ser determinante, como foi observado pelo estudo de Leite; Facchini; Faria (2003). Desta maneira, propusemos o seguinte delineamento experimental avaliando as soluções de substância de referência de trabalho em duas condições de temperatura (ambiente e refrigerada) ao longo do tempo (curto prazo e longo prazo).

Para obtenção da curva analítica de calibração, foi injetada a solução da substância química de trabalho atenolol por seis vezes, onde se determinou a área média da solução em estudo e o fator resposta médio, com o qual foi avaliada a recuperação da solução controle em intervalo de curto prazo (até 24 horas, em temperatura ambiente de 30° C – armazenado em estufa com controle de temperatura) e de longo prazo (acima de 24 horas, sob a refrigeração de 2° a 8°C – armazenado em geladeira com controle de temperatura).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi realizado durante a rotina de análise de controle de qualidade para produtos acabados no laboratório da empresa, dessa forma, foram realizados dois experimentos, experimento 1 (E1) avaliando armazenamento sob temperatura de 30°C e o experimento 2 (E2) avaliando sob temperatura refrigerada. Para cada experimento seguiu-se com a prévia climatização da amostra antes da injeção no sistema cromatográfico, não houve troca de fase móvel que permanecesse em sistema isocrático, nem da fase estacionária ou tampouco do cromatógrafo líquido utilizado para análise.

Na tabela 1 está expresso o resumo dos dados de estabilidade da solução atenolol, considerando a área da amostra, a porcentagem de recuperação e o tempo avaliado após a curva analítica. Conforme o resumo abaixo, a recuperação de 99,76% deu-se em 145 horas e a recuperação de 100,16% deu-se em 11 horas.

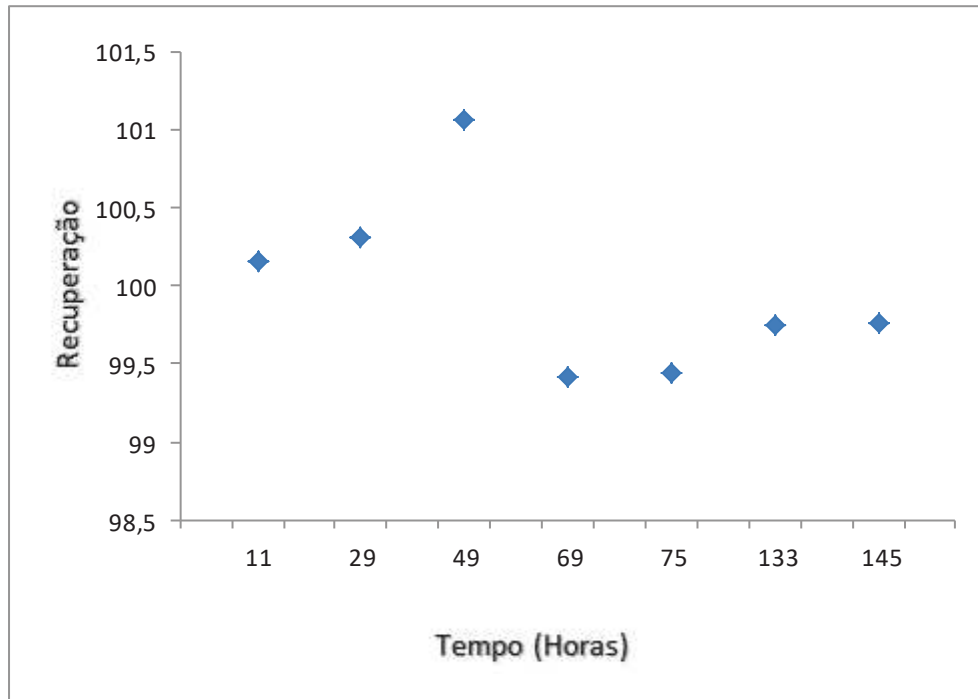
Tabela 1. Resumo da avaliação da estabilidade de soluções padrão de atenolol em estufa.

Data e Hora	Área	Condição °C	Recuperação %	Tempo
09/01/19 às 21:45	331612	Estufa	100,16	11h
10/01/19 às 16:14	332127	Estufa	100,31	29h
11/01/19 às 11:42	334619	Estufa	101,07	49h
12/01/19 às 08:36	334404	Estufa	99,41	69h
12/01/19 às 14:17	334514	Estufa	99,44	75h
15/01/19 às 03:20	337852	Estufa	99,75	133h
15/01/19 às 11:58	337896	Estufa	99,76	145h

Fonte: Autoria própria (2019).

A figura a seguir apresenta a faixa de recuperação em função do tempo (em horas) do composto condicionado em estufa.

Figura 5 – Representação gráfica do Experimento 1 (estabilidade de soluções padrão de atenolol em estufa).



Fonte: Autoria própria (2019).

Assim, no Experimento 2 são expressos os dados dos mesmos itens do Experimento 1 (área da amostra, porcentagem de recuperação e o tempo pós curva analítica), na descrição resumida da avaliação da estabilidade de soluções padrão de atenolol (tabela 2). No entanto, a diferença é que nesse resumo a condição térmica envolve o resfriamento do material em avaliação.

Como foi descrito anteriormente a simulação de condições adversas às comuns no laboratório foi substancial na pesquisa, procurando agregar veracidade ao estudo, afinal nem sempre é possível manter as condições ideais durante toda a realização de um procedimento experimental, especialmente se o mesmo envolver uma relativa faixa de tempo. E mesmo não havendo alteração significativa da estabilidade química pela variação da temperatura, só foi possível comprovar essa

falta de interferência na recuperação amostral por se ter utilizado dada diferença nas condições térmicas.

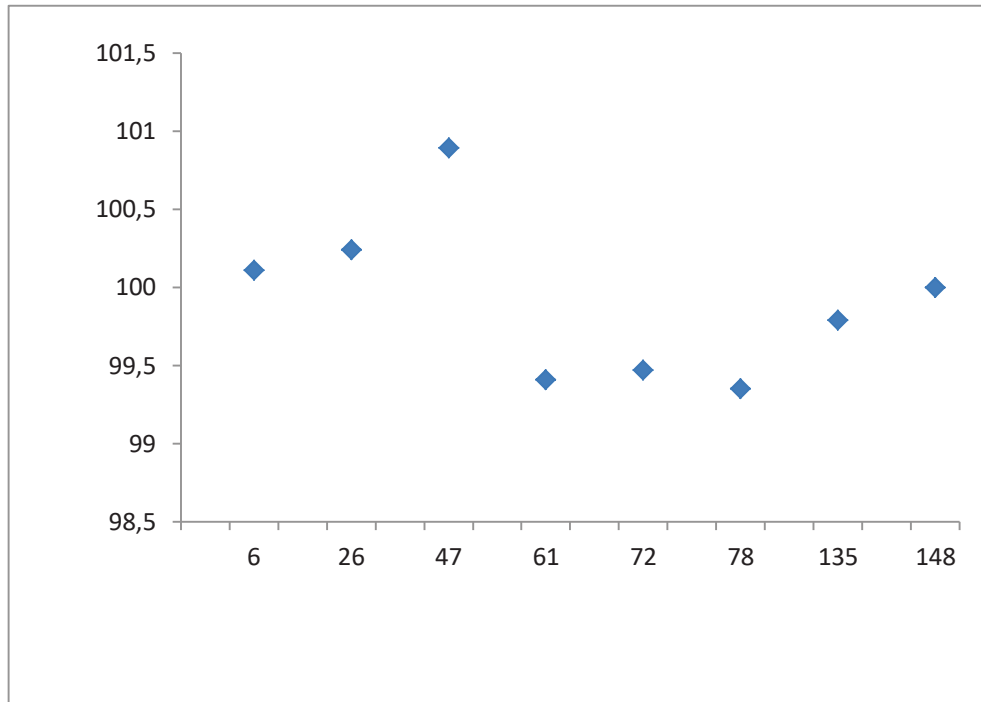
De acordo com a tabela abaixo e a figura 6, a recuperação das soluções condicionadas em geladeira foi de 100% correspondente a 148 horas, maior tempo de avaliação e de 100,11% ao período de 6 horas. A representação gráfica expressa os valores da recuperação em função do tempo em horas, apontando a relação entre recuperação e tempo, referente ao composto refrigerado.

Tabela 2. Resumo da avaliação da estabilidade de soluções padrão de atenolol em geladeira.

Data e Hora	Área	Condição °C	Recuperação %	Tempo
09/01/19 às 16:52	331467	Geladeira	100,11	6h
10/01/19 às 01:29	331892	Geladeira	100,24	26h
11/01/19 às 09:56	334048	Geladeira	100,89	47h
11/01/19 às 22:50	334385	Geladeira	99,41	61h
12/01/19 às 11:34	334589	Geladeira	99,47	72h
12/01/19 às 17:13	334204	Geladeira	99,35	78h
15/01/19 às 04:48	337984	Geladeira	99,79	135h
15/01/19 às 14:32	338709	Geladeira	100,00	148h

Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 6 – Representação gráfica do Experimento 2 (estabilidade de soluções padrão de atenolol em geladeira).



Fonte: Autoria própria (2019).

Na busca por um procedimento operacional padrão para validar um determinado composto, sabe-se que quanto mais criteriosa é a metodologia utilizada, mais palpáveis devem ser os resultados encontrados e mais estruturada essa validação, que poderá ter seu tempo de utilização estendido, em virtude da confiabilidade da técnica por HPLC. Assim sendo, a indústria farmacêutica tem na avaliação da estabilidade química uma resposta que assegura credibilidade e segurança como se explana acerca de variados aspectos onde:

A estabilidade química provavelmente é o aspecto mais importante da estabilidade farmacêutica, pois determina as incompatibilidades fármaco-excipiente na formulação e permite selecionar as condições de armazenamento e acondicionamento compatíveis com o produto (MEIRELLES, 2014, p.10).

As substâncias avaliadas não apresentam dados de extrapolação aquém e além da margem de recuperação, a qual compreende de 98,5% a 101,5%, e devido ao fato de tratar-se de uma utilização prolongada da solução de substância química de trabalho. Nesse contexto sabe-se que o manual de boas práticas cromatográficas

da Prati-Donaduzzi preconiza a recuperação dos padrões frente à curva analítica entre 98,0% - 102,0%, como se trata da utilização estendida da solução de substância química de trabalho atenolol, foi definido uma faixa de recuperação menor, à saber 98,5% – 101,5%. Desde o início da curva analítica da solução em estudo, foram avaliados os parâmetros cromatográficos, número de pratos teóricos, fator de cauda ou assimetria e tempo de retenção conforme estabelecido em metodologia analítica. Confirmados os parâmetros, seguiu-se com as réplicas do P1. O tempo zero da análise se deu a partir da primeira injeção do padrão 1.

Tabela 3 System Inicial P1

	Nome Amostra	Componente	Inj. N	Inj. Vol. (µL)	Área	Resposta	TR	Fator de Cauda (USP)	Pratos Teóricos (USP)	Inj. Id
1	Padrão 1	Atenolol	1	10,00	331277	33127,29	10,44	1,10	11206	1061
2	Padrão 1	Atenolol	2	10,00	331846	331845,67	10,48	1,10	11207	1067
3	Padrão 1	Atenolol	3	10,00	330889	330888,75	10,47	1,10	11258	1070
4	Padrão 1	Atenolol	4	10,00	331565	331564,77	10,48	1,10	11222	1073
5	Padrão 1	Atenolol	5	10,00	330875	330875,11	10,47	1,10	11253	1076
6	Padrão 1	Atenolol	6	10,00	331165	331165,29	10,46	1,10	11263	1079
Mean						331269,48				
%RDS						0,12				

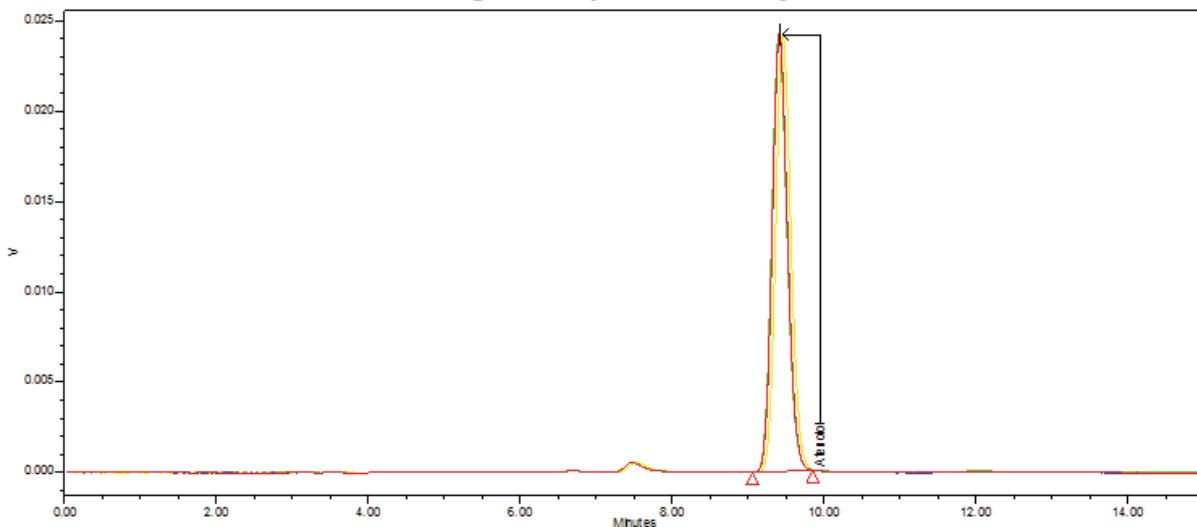
Fonte: Autoria própria (2019).

Conforme visto na tabela 3, o fator de cauda médio foi de 1,10, a e a especificação solicita inferior a 2,0, e tempo de retenção médio de 10,4, a especificação solicita tempo de retenção entre 9 – 12 minutos. Os dados do sistema cromatográfico são apresentados de acordo a metodologia analítica do produto atenolol, em que a adequação dos parâmetros cromatográficos serve para atestar a aplicabilidade cromatográfica em validar uma determinada análise de acordo com parâmetros estabelecidos na monografia (metodologia analítica), sendo citados os seguintes itens: equipamento, tempo de corrida, volume injetado da solução, comprimento de onda e o tipo de coluna cromatográfica para análise (figura 7).

Figura 7 – Análise cromatográfica obtida através do software Empower® 3

INFORMAÇÕES DA ANÁLISE	
Nome Sequência:	Method Set: Atenolol_UV
Data Calibração: 15/01/2019 23:56:18 BRST	Equipamento: CL014
Calibration ID: 1151	Tempo de Corrida: 15,0 Minutes
Processing Method ID: 1144	Volume Injetado: 10,00 µl
Processing Method: Atenolol_Projeto	Canal: Detector 226nm
Sequenciado Por: mentges	Coluna: CQ-C18 - 1096
Processado Por: epinheiro/CQ_Líder_1	Instrument Method ID: 1022
Impresso Por: Éric Wesley Pinheiro dos Santos (epinheiro)	Instrument Method Name: Atenolol_UV

Cromatograma - System Suitability Final



Fonte: Autoria própria (2019).

A verificação da adequabilidade do sistema se baseia no conceito de que o equipamento, a eletrônica, as operações analíticas, as soluções avaliadas constituem um sistema integrado que mostra o tempo de retenção obtido nas seis injeções sucessivas da solução de trabalho atenolol na qual se obteve o valor da área, o fator resposta e o desvio padrão relativo que deve ser inferior a 2% na curva analítica. A curva de calibração que tem por objetivo padronizar o sistema cromatográfico e validar a análise através da obtenção da linearidade obtida pelas repetidas injeções (seis vezes) da solução de SQT atenolol onde demonstra a curva de calibração linear obtida pelo padrão resposta do instrumento (eixo Y) em relação à concentração, quantidade do analito nas soluções de SQT de atenolol. O sistema foi considerado válido para as injeções posteriores das soluções controles em que se deu o estudo de estabilidade.

Figura 8 – Informações sobre a curva de calibração da solução.

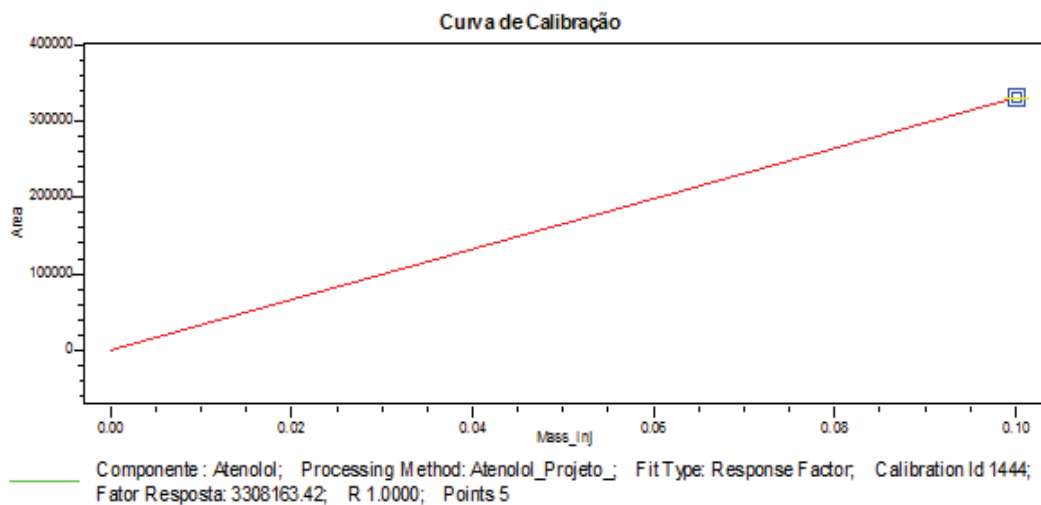


Tabela - Curva de Calibração - P1
Peak: Atenolol

	Nome Amostra	Componente	Vial	Level	Fator de Diluição	Massa	Pureza	Inj. Id
1	Padrão 1	Atenolol	1	1	1000.00000	10.01000	100.00	1067
2	Padrão 1	Atenolol	1	1	1000.00000	10.01000	100.00	1070
3	Padrão 1	Atenolol	1	1	1000.00000	10.01000	100.00	1073
4	Padrão 1	Atenolol	1	1	1000.00000	10.01000	100.00	1076
5	Padrão 1	Atenolol	1	1	1000.00000	10.01000	100.00	1079

Fonte: Autoria própria (2019).

Conforme os resultados da análise das recuperações das soluções de SQT atenolol injetadas (figura 8) com intervalos sucessivos de datas e horas sob as condições de temperatura já detalhadas, obtiveram-se as áreas das soluções com as respectivas recuperações do registro da hora de injeção, contabilizado frente ao início da curva de calibração analítica no tempo zero em que se passou a avaliar as recuperações subsequentes com o estudo da condição estável das soluções padrão pertinente.

Observamos que as injeções se mantiveram dentro da faixa de recuperação, apresentando estabilidade tanto na condição de armazenamento em estufa por 145 horas, com recuperação de 99.76% quanto na condição de geladeira por 148 horas com recuperação de 100.00%.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, é possível inferir que pelo armazenamento sistemático das soluções teste do estudo de estabilidade química de soluções de SQT atenolol, se viabiliza o aproveitamento de energia, reagentes, reduzindo o tempo destinado à pesagem de reagentes na balança e possíveis reanálises dos lotes no controle de qualidade, padronizando o tempo de utilização das soluções de trabalho e evitando assim, desperdícios de recursos durante a análise.

A avaliação da estabilidade química destas soluções ocorreu em condições bem definidas de armazenamento e mostra ser adequada a técnica de análise instrumental por HPLC, em que se obteve maior confiabilidade dos resultados do estudo com a identificação da estabilidade química em horas da solução amostra de atenolol pós preparo, para assim sugerir adequações à metodologia analítica e torná-la mais assertiva em relação à sua estabilidade.

Durante o período do estudo o sistema cromatográfico se manteve constante, não houve troca de fase móvel ou utilização de outra fase estacionária, o que contribuiu para obtenção de resultados aproximados ao tempo de retenção do ativo preconizado em metodologia. Vale ressaltar que antes da injeção aguardou-se o equilíbrio térmico das soluções com a temperatura ambiente para não interferir na consistência viscosa da amostra, o que poderia apresentar resultados inconsistentes. A solução de SQT atenolol sob a condição estufa a 30°C apresentou estabilidade 145 horas, e a mesma solução sob a condição de armazenamento em geladeira 2°C - 8°C apresentou estabilidade de 148 horas. Esse fato sugere a realização de um estudo mais prolongado para avaliar se posterior às 148 horas as duas condições podem manter a estabilidade da solução em estudo.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, Nádia Machado de; VELOSO, Márcia Cristina da Cunha; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. Validação de métodos cromatográficos de análise-um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Revista Química Nova**, v 32, n.9, 2476-2481, 2009.

BERNARDES, A. C. M.; SOUZA, S. V. C. DE. Análise comparativa do guia para validação de métodos analíticos propostos pela ANVISA (RE nº 899 de 2003) com o documento orientado do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC *International*, ISO e IUPAC. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 51, p. 66-77, 2011.

BRASIL. Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 16 de novembro de 2004 (Revogada pela Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005). Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word.htm>>. Acesso em 13 de março de 2019.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word.htm>>. Acesso em 13 de março de 2019.

CARDOSO FREITAS, Natália Cristina; PERARO NASCIMENTO, Andréia. Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor em atenolol comprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, 2014.

CARVALHO, Giselle de Oliveira et al. Desenvolvimento de fases estacionárias baseadas em poli (óxido de etileno-co-dimetilsiloxano) imobilizado termicamente sobre sílica para cromatografia líquida de interação hidrofílica. 2017.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Revista Química Nova**, v.32, n.4, p.1021-30. 2009.

DOS SANTOS, Enicy Cecília; BARROS, David Antônio Costa; DE OLIVEIRA, Stela Ramirez. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. **Revista Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 93-113, 2016.

DOTSE, Louis Kwame. Desenvolvimento, validação e adequação de metodologias analíticas empregando cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de pemetrexede, fludarabina e idarrubicina-hcl em líofilos injetáveis.

2017. 83f. Dissertação. Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde. UNB. Brasília, 2017.

GASPERIN, Katiane de M. et al. Metodologia analítica–Cromatografia: Método utilizado em diversas áreas ambientais. **Anais do Encontro Nacional de Pós Graduação**, v. 1, n. 1, p. 479-483, 2017.

GUEDES, Camila Delanesi; PAGANINI, Wanderley da Silva. A remoção do fármaco paracetamol dos esgotos comparando três processos de tratamento biológico em nível secundário. **Anais**, 2017.

GONÇALVES, Eline Simões et al. Estratégias analíticas com cromatografia e espectrometria de massas para biomonitorização da exposição ao benzeno pela determinação do ácido S-fenilmercaptúrico urinário. 2017.

INMETRO (Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQCGCRE-008. Revisão 04 – Julho de 2011. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf> Acesso em 04 de abril de 2019.

KAZAKEVICH, Yuri.; LOBRUTTO, Rosario. *Introduction. In: HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 1–24.

KONATU, Fernanda Ribeiro Begnini. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em cultura de alface, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. 2014. 183f. Tese. Instituto de Química. UNICAMP, Campinas, 2014.

LEITE, C.; FACCHINI, F. P.; FARIA, E. C. DE. Avaliação laboratorial da estabilidade do padrão calibrador de bilirrubina *Laboratorial evaluation of standard bilirubin stability*. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n1/v39n1a04>>. Acesso em 04 de abril de 2019.

LIMA, Lílian Moura de et al. Perfil dos usuários do Hiperdia de três unidades básicas de saúde do sul do Brasil. **Revista gaúcha de enfermagem**, v. 32, n. 2, p. 323-329, 2011.

MAKAROV, Alexey; LOBRUTTO, Rosario; KAZAKEVICH, Yuri. *Liophilic mobile phase additives in reversed phase HPLC*. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®**, v. 31, n. 11-12, p. 1533-1567, 2008.

MALDANER, Liane et al. *The State Of Art Of Ultra Performance Liquid Chromatography* [o Estado Da Arte Da Cromatografia Líquida De Ultra Eficiência]. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 1, 214-222, 2009.

MATTOS, Ana Paula Felix de Lima et al. Proposta de estudo de degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o insumo farmacêutico ativo praziquantel e produto acabado. 2017. 49f. Monografia de Especialização. Instituto de Tecnologia Industriais Farmacêuticas. Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2017.

MEIRELLES, Lyghia Maria Araújo. Estabilidade de medicamentos: estado da arte. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 4, p. 06-26, 2014.

MELO, SRO. Produtos de degradação: regulamentação sanitária e proposta de monografia para qualificação. Brasília, 2012.

MEYER, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th ed. Chichester: Wiley, p. 426, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Avaliação do plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus no Brasil. 2004. Disponível em: < <http://www.portalms.saude.gov.br.htm>>. Acesso em 20 de março de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acesso à informação- Saúde de A a Z - Hipertensão em números, 2017. Disponível em < <http://www.portalms.saude.gov.br.htm>>. Acesso em 20 de março de 2019.

NOBRE, Fernando et al. Hipertensão arterial sistêmica primária. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v. 46, n. 3, p. 256-272, 2013. Disponível em: < <http://www.periodicos.usp.br.htm>>. Acesso em 19 de março de 2019.

ORIQUI, Luciana R. Guia de Estabilidade para a Indústria Química - Definição de Prazo de Validade e Proposição de Prazo. 2012.144f. Desenvolvimento de Processos Químicos. Faculdade de Engenharia Química. UNICAMP. Campinas, 2012.

ORIQUI, Luciana R. et al. Guide For Determining The Stability Of Chemical Products [guia Para A Determinação Da Estabilidade De Produtos Químicos]. **Revista Química Nova**, v. 36, No. 2, 340-347, 2013.

PATRÍCIO, Maria Inês Abreu Reis. **Desenvolvimento farmacêutico de um medicamento: área analítica**. 2014. 192f. Dissertação. Engenharia Biotecnológica no Engenharia Biotecnológica. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2014.

REMONDI, Felipe et al. A Gestão e a Avaliação de Tecnologias em Saúde no Paraná: desafios e propostas para a SESA e para o setor de saúde paranaense. **Revista Espaço para Saúde**, v. 18, n. 1, p. 215-224, 2017.

REMPEL, Claudete et al. Análise da medicação utilizada por diabéticos e hipertensos. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 12, n. 1, 2015.

RIBANI, Marcelo; COLLINS, Carol; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan. Desenvolvimento e validação de método para separação de isoflavonas em extrato seco de soja. **Revista Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 501-510, 2014.

SCHMIDT, Maria Inês et al. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. 2011.

SILVA K.E.R.; Alves L.D.S.; SOARES M.F.R.; PASSOS R.C.S.; FARIA A.R., Rolim Neto PJ. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**. 20(2): 129-135, 2009.

SILVA, Lidiane Mauricio da. Saúde ambiental: a importância dos fatores ambientais para a promoção de políticas pública de saúde. 2014. 46f. Diretoria de Pesquisa e pós-graduação em Gestão Ambiental em municípios. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2013.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOUSA, Diana Isabel Teixeira. **Validação de Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um Medicamento de associação dupla (20mg+ 40mg)**. 2018. 91f. Dissertação. Departamento de Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2018.

VECHIA, C. A. D. et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 288-296, 2016.

ANEXOS

ANEXO A - PROTOCOLO DE ESTUDO DE ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO DE
SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO NA ROTINA LABORATORIAL DO
CONTROLE DE QUALIDADE PRATI-DONADUZZI



**PROTOCOLO DE ESTUDO DE ESTABILIDADE DE SOLUÇÃO
SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE TRABALHO NA ROTINA
LABORATORIAL DO CONTROLE DE QUALIDADE
DA EMPRESA PRATI-DONADUZZI**

Dezembro

2018

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	42
2. OBJETIVO	42
3. MÉTODOS.....	42
4. PROCEDIMENTO.....	43
5. CÁLCULO.....	43
6. REFERÊNCIA.....	44

1. INTRODUÇÃO

O protocolo de estudo de estabilidade dos padrões do controle de qualidade da indústria farmacêutica Prati – Donaduzzi descreve o procedimento de análise a ser realizado nos padrões primários e secundários. A substância química de trabalho (SQT) também conhecida como padrão secundário e a substância química de referência farmacopeica (SQF), são utilizadas para fins de identificação e quantificação do analito de interesse em uma amostra por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia a líquido de ultra eficiência (UHPLC). A SQT possui um custo menor, pois é padronizada a partir de uma SQF que possui um alto grau de pureza. Este último, apresenta um alto custo, além disso, sua aquisição demanda tempo devido a sua procedência ser importada. Diante disto, pretendendo a economia de tempo juntamente a recursos para execução da análise, faz-se necessário desenvolver um protocolo para avaliação da estabilidade da solução padrão.

7 OBJETIVO

O objetivo do estudo é avaliar a estabilidade das soluções de substância química de trabalho, utilizados na rotina do laboratório instrumental do controle de qualidade da indústria farmacêutica Prati – Donaduzzi.

8 MÉTODOS

O estudo da solução de trabalho de cada analito seguirá a metodologia analítica de produto acabado vigente do controle de qualidade da indústria farmacêutica Prati-Donaduzzi.

9 PROCEDIMENTO

Primeiramente, o estudo será armazenado em um projeto denominado “ESTUDO DE ESTABILIDADE” em subitens específicos para cada método no software Empower® 3.

Considerando o fluxo laboratorial as injeções ocorrerão nas pastas dos projetos da rotina e posteriormente serão compartilhadas na pasta supracitada.

Neste contexto, as injeções da solução padrão ocorrerão da seguinte maneira: A análise consistirá na avaliação da estabilidade no curto e longo prazo. À primeira, considera-se o tempo estipulado de até 24 horas, ao exceder este tempo a mesma seguirá o procedimento de longo prazo. Assim, as condições de armazenamento em curto prazo serão sob temperatura ambiente à 30°C durante as primeiras 24 horas. Em contrapartida, na avaliação à longo prazo as mesmas serão armazenadas em geladeira (2 - 8 °C), vale ressaltar que as amostras apenas devem ser acondicionadas em vials e armazenadas em geladeira devidamente identificados, na ocasião que antecede a injeção, os vials serão ambientalizados à temperatura de 15 - 30° C, preconizando-se que as amostras no ato da injeção devem estar a temperatura ambiente com o intuito de mimetizar a condição inicial.

A injeção da curva (sextuplicata) deverá ser analisada imediatamente após o preparo da solução, registrando assim, o tempo zero da análise (Dia 1). Neste momento deve-se avaliar o desvio padrão relativo (DPR) que deverá ser menor que 1,5%, salvo quando especificado em metodologia para que seja dado continuidade no estudo de estabilidade.

Segundo Huber, 2010; Kalakuntla e Kumar, 2009 e Guia de Validação de método Bioanalítico, 2012 da Agência Europeia de Medicina, recomenda-se um coeficiente de variação de 15% e a injeção do padrão em sextuplicata (n =6) para que possa ser avaliado a % de estabilidade conforme cálculos demonstrados a seguir.

10 CÁLCULO

5.1 - Fator resposta relativo da solução padrão:

$$\text{Fator resposta} = \frac{A_p \times FD_p \times 100}{m_p \times T_p \times V_{inj}}$$

Sendo: A_p : a área do pico do ativo em estudo, m_p : massa em miligramas do ativo utilizado no preparo da solução padrão, FD_p : fator de diluição em mililitro, da solução, T_p : teor em % do padrão e V_{inj} : volume de injeção em mililitros da solução padrão.

5.2 - % Estabilidade:

$$\% \text{ Estabilidade} = \frac{\text{Fator Resposta Solução em estabilidade}}{\text{Fator Resposta da solução recém preparada}} \times 100$$

Considera-se aceitável a estabilidade da solução se a % estabilidade estiver entre a faixa de 85% - 115%.

Ou

Recuperação do controle da solução de estabilidade entre 98.5 – 101.5% frente a uma curva com uma solução recém-preparada, assim, respeitando a variação de 15% preconizada acima.


11 REFERÊNCIA

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE. **Guideline on bioanalytical method validation.** v. 44

HUBER, L. **Analytical method validation_Agilent**. v. 2

KALAKUNTLA, R. R.; KUMAR, K. S. Bioanalytical method validation: A quality assurance auditor view point. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 1–10, 2009.

ANEXO B - FICHA DO PRODUTO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÃO ATENOLOL DO LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE PRATI-DONADUZZI

	Ficha de Estudo de Estabilidade das Soluções Padrão Atenolol do Laboratório de Controle Qualidade Prati-Donaduzzi
---	--

Descrição do Ativo: Atenolol é um pó cristalino branco ou quase branco, é um fármaco com atividade terapêutica anti-hipertensivo

Solução padrão: Atenolol	Número:
Padrão Lote:	
Data de Fracionamento:	
Data de Validade:	
Método: CQ- PA-078	
Armazenamento:	

Preparo da Fase Móvel: 1.1 gramas de heptanossulfonato de sódio e 0.71 gramas de fosfato de sódio dibásico em 700mL de água purificada, adicionar 2mL de dibutilamina, ajustar o pH em 3.0 com solução ácido fosfórico 0.8M, adicionar 300mL de metanol e homogeneizar, filtrar em membrana hidrofóbica 0.45µm ou porosidade menor, degaseificar no ultrassom.

Preparo do Diluente: Fase móvel

Massas utilizadas em miligramas:

P1:

P2:

Balança utilizada: validade da calibração:

Cromatógrafo utilizado: validade da calibração:

Parâmetros Cromatográficos:

Coluna cromatográfica: C18 300mm X 3.9mm X 5.0µm Akzo Nobel Kromasil ou equivalente

Volume de Injeção: 10µL

Temperatura do Forno: Ambiente

Fluxo: 0.6mL / minuto

Tempo de corrida: 15minutos

Tempo de Retenção do Ativo: entre 9 a 12 minutos

Pratos teóricos da coluna: > 5.000

Assimetria: < 2.0

ERA: < 1.5

Desvio Padrão Relativo (DPR): < 2.0

Faixa de recuperação: 98.0 – 102.0 %

Sistema de eluição: [] gradiente [X] isocrático

Temperatura Ambiente: 8 – 30° C

Anexo: 1- Etiqueta identificação do Frasco de Padrão

Solução padrão: Atenolol	Número:
Padrão Lote:	
Data de Fracionamento:	
Data de Validade:	
Método: CQ- PA-078	
Armazenamento:	

6. Referências bibliográficas

Ministério da Saúde. OPAS. *Avaliação do plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95.

BRASIL. SECRETARIA DA EDUCAÇÃO. *Hipertensão Arterial Sistêmica para o Sistema Única de Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, *Fundamentos de Química Analítica*, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

Habel LA, Cooper WO, Sox CM, et al. *ADH medications and risk of serious cardiovascular events in young and middle-ages adults*. *JAMA* 2011 (published online December, 2011, doi:10.1001/jama.2011.1830);2011.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. Introduction. In: *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 1–24.

LEITE, C.; FACCHINI, F. P.; FARIA, E. C. DE. Avaliação laboratorial da estabilidade do padrão calibrador de bilirrubina Laboratorial evaluation of standard bilirubin stability. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n1/v39n1a04>>. Acesso em: 4 out. 2018.

RODRIGUES ORIQUI, L. Guia de Estabilidade para a Indústria Química - Definição de Prazo de Validade e Proposição de Prazo. p. 143,