

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – UTFPR
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL

NATÁLIA ALEVATO GALLI

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE EPICLORIDRINA NA MATÉRIA-
PRIMA DE CARVEDILOL.**

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO

TOLEDO

2019

NATÁLIA ALEVATO GALLI

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE EPICLORIDRINA NA MATÉRIA-
PRIMA DE CARVEDILOL.**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de “Especialista em Análise Instrumental” ao Programa de Pós-Graduação *Latu Sensu* em Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Viviane Lobo

TOLEDO

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE EPICLORIDRINA NA MATÉRIA-PRIMA DE CARVEDILOL.

Por

NATÁLIA ALEVATO GALLI

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 05 de junho de dois mil e dezanove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise Instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o **trabalho Aprovado**.

Profª Dra. Viviane Lobo
(Orientadora)

Profª Dra. Magali Silva de Amorim
(UTFPR)

Dr. Lincoln Coutinho
(Prati, donaduzzi)

RESUMO

O carvedilol é um dos fármacos mais empregados no tratamento de hipertensão arterial sistêmica e controle de doenças cardiovasculares associadas. A utilização desse fármaco tem o intuito de reduzir a mortalidade cardiovascular em pacientes vítimas de infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e disfunção ventricular esquerda. Na avaliação da documentação do processo de síntese desse ativo, verificou-se a presença da epicloridrina, que é uma impureza e apresenta alerta genotóxico. Segundo o *Guideline in the limits of Genotoxic impurities*, o limite da presença da epicloridrina é 15 ppm. No presente trabalho, um método de quantificação da epicloridrina foi validado por cromatografia gasosa (CG), com a utilização do detector de ionização de chama (em inglês – *flame ionized detector* – FID) acoplado ao amostrador *headspace*. Foi utilizada uma coluna cromatográfica G16 com 30 m x 0,53 mm x 2,0 µm, fluxo de gás de arraste de 4,0 mL min⁻¹ e injeção *split* com razão de 1:2. A validação realizada atendeu os parâmetros descritos na legislação brasileira vigente RDC166/2017. O método utilizado demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto e, conseqüentemente, adequado para a quantificação da impureza epicloridrina na matéria-prima de carvedilol.

Palavras-chave: impureza orgânica, cromatografia gasosa, *headspace*, validação analítica.

ABSTRACT

Carvedilol is one of the drugs most used in the treatment of systemic arterial hypertension and control of associated cardiovascular diseases. The use of this drug is intended to reduce cardiovascular mortality in patients suffering from myocardial infarction, heart failure and left ventricular dysfunction. In the documentation evaluation of this active synthesis process, it is verified the presence of epichlorohydrin, which is an impurity and presents genotoxic alert. According with Guideline in the Limits of Genotoxic Impurities, the limit of epichlorohydrin presence is 15 ppm. In the present work, a method of quantification of epichlorohydrin was validated by gas chromatography (GC), using the flame ionized detector (FID) coupled to the headspace sampler. A G16 column with 30 m x 0.53 mm x 2.0 μm , 4.0 mL min^{-1} drag gas flow and 1: 2 ratio split injection was used. The performed validation complied with the parameters described in current Brazilian legislation RDC166 / 2017. The method used has been shown to be specific, linear, precise, accurate and robust and therefore suitable for the quantification of the epichlorohydrin impurity in the raw material of carvedilol.

Keywords: organic impurity, gas chromatography, headspace, analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do carvedilol.	25
Figura 2 - Estrutura química da epicloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano).	26
Figura 3 - Esquema da estrutura de um cromatógrafo gasoso.	31
Figura 4 - Desenho esquemático processo amostragem da técnica headspace.	34
Figura 5 - Cromatograma da Solução Branco.	Erro! Indicador não definido.
Figura 6 - Cromatograma da Solução System Suitability.	47
Figura 7 - Cromatograma do Padrão Epicloridrina.	48
Figura 8 - Cromatograma do Padrão Metanol.	48
Figura 9 - Cromatograma do Padrão Etanol.	48
Figura 10 - Cromatograma do Padrão 2-Propanol.	49
Figura 11 - Cromatograma do Padrão Acetonitrila.	49
Figura 12 - Cromatograma do Padrão Acetato de Etila.	49
Figura 13 - Cromatograma do Padrão Benzeno.	50
Figura 14 - Cromatograma do Padrão Tolueno.	50
Figura 15 - Cromatograma da Solução Amostra.	50
Figura 16 - Cromatograma da Solução Seletividade.	51
Figura 17 - Cromatograma da Solução Seletividade Amostra.	51
Figura 18 - Equação da reta obtida na análise de linearidade de epicloridrina.	54
Figura 19 - Gráfico de resíduos padronizados para epicloridrina.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições do sistema cromatográfico.	40
Tabela 2- Programação de temperatura da coluna.	40
Tabela 3- Condições do headspace transferline.	40
Tabela 4- Preparo das Soluções Linearidade.	42
Tabela 5- Preparo Soluções Precisão.	44
Tabela 6 - Especificação utilizadas para o desvio padrão relativo (DPR) da repetibilidade.	44
Tabela 7 - Especificação utilizadas para o desvio padrão relativo (DPR) da precisão intermediária.	44
Tabela 8 – Preparo das Soluções Exatidão.	45
Tabela 9 - Especificação utilizadas para recuperação da exatidão.	45
Tabela 10- Especificação utilizadas para o desvio padrão relativo (DPR) na exatidão.	45
Tabela 11 - Preparo das Soluções para Robustez.	46
Tabela 12 - System Suitability para Epicloridrina.	52
Tabela 13 - Tempos de retenção e resolução na Solução Seletividade Amostra.	52
Tabela 14 - Linearidade Epicloridrina.	53
Tabela 15 - Resultados do teste ANOVA para a linearidade de epicloridrina.	54
Tabela 16 - Resultado dos resíduos e análise de Grubbs.	56
Tabela 17 - Teste de Cochran.	57
Tabela 18 - Precisão 1° dia da epicloridrina.	58
Tabela 19 - Precisão 2° dia da epicloridrina.	59
Tabela 20 - Precisão intermediária.	60
Tabela 21 - Resultados da análise de exatidão da epicloridrina.	61
Tabela 22 - Resultado sinal/ruído do limite de quantificação.	62
Tabela 23 - Resultados da robustez sem alteração no método.	63
Tabela 24 - Resultados da robustez com alteração do lote da coluna cromatográfica.	63
Tabela 25 - Resultados da robustez com alteração do lote da coluna cromatográfica.	63
Tabela 26 - Resultados da robustez sem alteração no método.	64
Tabela 27 - Resultados da robustez com alteração na temperatura inicial do forno para 88°C.	65
Tabela 28 - Recuperação dos teores para alteração na temperatura de forno para 88°C.	65
Tabela 29 - Resultados da robustez com alteração na temperatura inicial do forno para 92°C.	65
Tabela 30 - Recuperação dos teores para alteração na temperatura de forno para 92°C.	66
Tabela 31 - Resultados da robustez sem alteração no método.	66
Tabela 32 - Resultados da robustez com alteração no fluxo do gás de arraste para 3,8 mL min ⁻¹	67
Tabela 33 - Recuperação dos teores para alteração no fluxo do gás de arraste para 3,8 mL min ⁻¹	67
Tabela 34 - Resultados da robustez com alteração no fluxo do gás de arraste para 4,2 mL min ⁻¹	67
Tabela 35 - Recuperação dos teores para alteração no fluxo do gás de arraste para 4,2 mL min ⁻¹	68
Tabela 36 - Resultados das soluções injetadas após o preparo.	69

Tabela 37 - Resultados das amostras injetadas aproximadamente 29 horas após o preparo.....	69
Tabela 38 - Recuperação dos teores das amostras injetadas aproximadamente 29 horas após o preparo.	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros a serem considerados na validação analítica.	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
CG-HS	Cromatografia gasosa <i>headspace</i>
FID	Detector
CAS	<i>Chemical Abstract Services</i>
ECH	Epicloridrina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
CHTAC	Cloreto de 3-Cloro-2-Hidroxi-propiltriethylamônio
DCP	1,3-dicloro-2-propanol
PAE	Poliamina
DPR	Desvio Padrão Relativo
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CG	Cromatografia gasosa
FE	Fase estacionária
FM	Fase Móvel
HS-GC-MS	Cromatografia gasosa <i>headspace</i> – detecção por espectrômetro de massas
HS-GC-FID	Cromatografia gasosa <i>headspace</i> – detecção por ionização em chama

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVO	23
1.1.1 OBJETIVO GERAL	23
1.2 JUSTIFICATIVA	23
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	25
2.1 CARVEDILOL	25
2.2 EPICLORIDRINA	26
2.3 IMPUREZAS	28
2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO HEADSPACE	30
2.4.1 <i>Cromatografia Gasosa (CG)</i>	30
2.4.2 <i>Headspace</i>	34
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	35
2.5.1 <i>Seletividade</i>	36
2.5.2 <i>Linearidade</i>	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAIS	39
3.2 AMOSTRA	39
3.3 EQUIPAMENTO	39
3.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO	39
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES	40
3.6 PARÂMETROS AVALIADOS	41
3.6.1 <i>Seletividade</i>	41
3.6.2 <i>Linearidade</i>	42
3.6.3 <i>Limite de Quantificação</i>	42
3.6.4 <i>Precisão</i>	43
3.6.5 <i>Exatidão</i>	44
3.6.6 <i>Robustez</i>	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 <i>Seletividade</i>	47
4.2 <i>Linearidade</i>	52
4.3 <i>Precisão</i>	57
4.4 <i>Exatidão</i>	60
4.5 <i>Limite de Quantificação (LQ)</i>	61
4.6 <i>Faixa de Trabalho</i>	62
4.7 <i>Robustez</i>	62
4.7.1 <i>Variação do lote da coluna cromatográfica</i>	62
4.7.2 <i>Variação no sistema cromatográfico</i>	64
4.7.2.1 <i>Variação da temperatura inicial do forno da coluna</i>	64
4.7.2.2 <i>Variação do fluxo do gás de arraste</i>	66
4.7.3 <i>Estabilidade das soluções analíticas</i>	68
5 CONCLUSÃO	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

No o desenvolvimento de um novo medicamento, uma série de etapas é necessária para a composição do *book* do produto a ser enviado para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essas etapas se fazem necessárias para garantir documentalmente a qualidade do medicamento, garantindo assim, a saúde do consumidor que administrará esse produto.

Dentro das etapas do desenvolvimento de um produto, encontra-se a parte analítica, onde são realizados os primeiros testes que se estendem desde os estudos de pré-formulação até o desenvolvimento de métodos analíticos, com a finalidade de garantir a qualidade do produto acabado.

No intuito de atribuir qualidade desses medicamentos e a segurança dos consumidores, órgãos reguladores como ANVISA, *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), cada vez mais têm aumentado o nível de exigências relacionadas às análises para o controle de impurezas, em todas as etapas do processo de fabricação.

O aumento das exigências está relacionado desde a síntese de ativos farmacêuticos e excipientes ou durante a produção do produto acabado, onde são utilizados diferentes tipos de materiais de partida, intermediários e solventes orgânicos. Essas matérias-primas geram, no final do processo, diversas prováveis impurezas, de diferentes fases do processo ou até mesmo as impurezas originadas dos produtos de degradação, que podem ocorrer durante o armazenamento do produto acabado, por processos reativos entre fármaco e excipientes, fármaco e material de embalagem ou ação de fatores ambientais externos [1].

Essas impurezas podem ser classificadas como genotóxicas ou carcinogênicas, e podem permanecer nos ativos farmacêuticos ou no produto acabado. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos seletivos para a detecção e separação dessas impurezas nos produtos farmacêuticos, se torna cada vez mais necessário dentro do controle de qualidade [2]. Esses desenvolvimentos garantem a confiabilidade nos resultados de métodos com alta sensibilidade, por meio dos estudos de validação analítica [3].

Existem vários métodos de análise instrumental disponíveis para determinar a epiclorigrina e outros cloretos orgânicos, como por exemplo, a cromatografia gasosa [4,5].

A cromatografia gasosa com acoplamento ao amostrador *headspace* (HS-CG) é uma técnica eficaz, que minimiza o impacto de espécies não voláteis na matriz de amostras [6]. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para analisar as espécies voláteis em muitas amostras industriais, sem ou com pré-tratamento [7].

No presente trabalho, a proposta foi desenvolver um método de cromatografia gasosa acoplada ao *headspace* para quantificar epicloridrina na matéria-prima de carvedilol.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Comprovar que a metodologia analítica proposta para a quantificação da impureza orgânica epicloridrina, na matéria-prima de carvedilol, por cromatografia gasosa com detector FID (*Flame Ionization Detector*) e por injeção *headspace transferline*, é específica, linear, precisa e exata, segundo os parâmetros da legislação brasileira vigente RDC 166/2017.

1.2 JUSTIFICATIVA

No processo de síntese dos insumos farmacêuticos, diferentes tipos de materiais são utilizados, desde precursores, materiais de partida, catalisadores e reagentes orgânicos e inorgânicos. Esses materiais reagem e, ao término do processo de fabricação, também são obtidos diferentes tipos de materiais intermediários e prováveis impurezas orgânicas, inorgânicas e os solventes residuais.

Nesse sentido, há a necessidade de capacitação cada vez maior com relação às técnicas instrumentais que permitem o controle de impurezas, visto que, no geral, estas se apresentam em baixas concentrações e necessitam de técnicas altamente específicas e sensíveis.

Como exemplo dessas impurezas na síntese do carvedilol existe a impureza epicloridrina, que é um reagente utilizado na primeira etapa da síntese, mas se torna impureza e apresenta potencial genotóxico. Por isso, é fundamental o controle conforme o *Guideline in the Limits of Genotox Impurities*, com especificação máxima de 15 ppm. Devido a sua estrutura e seu ponto de fusão, a epicloridrina é uma

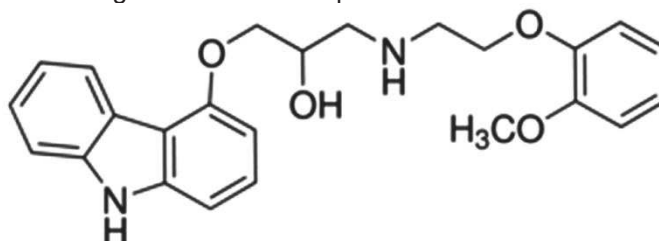
impureza que pode ser controlada pela técnica de Cromatografia Gasosa (CG) acoplada ao *headspace*, mas com a necessidade de validação analítica.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 CARVEDILOL

O (2RS)-1-(9H-Carbazol-4-iloxi)-3-[[2-(2-metoxifenoxi)etil]amino]propano-2-ol (Carvedilol – CAS 72956-09-3) é um agente hipotensor antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos, que promove a diminuição da resistência vascular periférica através do bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 [8,9]. A estrutura do carvedilol é mostrada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química do carvedilol.



Fonte: Lanzasova, F.;A.[10].

Os bloqueadores adrenérgicos, são uma classe heterogênea de substâncias e suas diferenças mais importantes, referem-se ao grau de seletividade para os receptores β -adrenérgicos e a presença de propriedades associadas [11].

O carvedilol é considerado um agente de terceira geração e, por essa razão, não é seletivo e dotado de propriedades singulares, que podem ser importantes na tolerabilidade e eficácia em pacientes com insuficiência cardíaca [11]. É amplamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e controle de doenças cardiovasculares associadas, no intuito de reduzir a mortalidade cardiovascular em pacientes vítimas de infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca e a disfunção ventricular esquerda [12, 13].

As características físico-químicas que o carvedilol apresenta, é um pó cristalino de coloração branca ou quase branca, caracterizado como uma base fraca praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool, praticamente insolúvel em soluções ácidas, solúvel em dimetilformamida, pouco solúvel em metanol e solúvel em clorofórmio [14].

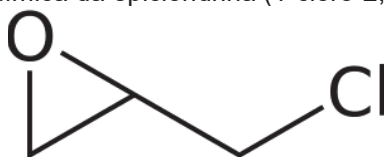
Através da avaliação da rota de síntese do carvedilol, foi possível determinar quais são os materiais de partida utilizado no processo e dentro desses, quais apresentam potencial alerta genotóxico. Diante dessa avaliação, verificou-se a necessidade do controle do material de partida intermediário epícloridrina.

Para um método analítico conseguir atender a qualidade exigida pelos órgãos regulamentadores, é necessário detectar e identificar as impurezas do processo de síntese. Compêndios oficiais como as farmacopeias Brasileira, Americana, Europeia e Britânica, apresentam métodos cromatográficos para as impurezas potenciais mais frequentes, que aparecem durante a síntese e que podem contribuir para o perfil de impurezas do princípio ativo. Para caso de impurezas não tão frequentes, se faz necessário desenvolvimento de métodos analíticos complementares para o controle [15].

2.2 EPICLORIDRINA

A epícloridrina (ECH, CAS N° 106-89-8) é um epóxido alifático que é sintetizado comercialmente a partir de cloreto de alilo, álcool alílico, dicloridrina, glicerina ou propileno. É um líquido incolor, solúvel em álcool e éter, ligeiramente solúvel em água, possui odor doce de alho e produz vapor inflamável e venenoso [16]. É um dos epóxidos alifáticos mais importantes comercialmente, amplamente utilizado como intermediário industrial, como reagente de laboratório e como inseticida [17]. A estrutura da epícloridrina é mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da epícloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano).



Fonte: Alonso, T.V. [18].

A ECH é absorvida rapidamente via pele, trato gastrointestinal e na forma de vapor através dos pulmões. Estudos em ratos comprovaram que após inalação ou aplicação oral, causa irritação respiratória aguda com hemorragias e edema grave [19]. Um estudo do Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (1976) relatou ardor no nariz e garganta, tosse, congestão no peito, nariz escorrendo, sensibilidade nos olhos, cefaleia, alterações na contagem total de leucócitos e nos níveis de hemoglobina em trabalhadores expostos à ECH. Em um estudo de caso-

controle [20], foi avaliada a relação entre câncer de pulmão e fatores ocupacionais entre os empregadores em uma fábrica de tinta e resina, em que de 102 colaboradores investigados, 51 apresentaram caso de câncer de pulmão. Em uma fábrica de resina e tintura, Barbone et al [21] também relatou que a potencial exposição rotineira a ECH estava associada a neoplasias do sistema nervoso central.

A exposição a esse epóxido, em diferentes colaboradores de indústrias e laboratórios, demonstrou que a relação “duração X exposição” cumulativa rotineira potencial a ECH é motivo de preocupação em relação a problemas de saúde humana [22].

Como exemplo de trabalhos que determinaram epícloridrina em produtos farmacêuticos, podemos citar os seguintes trabalhos:

- Loda et al. (2011) desenvolveram e validaram um método para determinar epícloridrina em um produto farmacêutico. Os autores escolheram a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas no desenvolvimento do método, em razão da dificuldade em trabalhar com uma especificação a nível traço (8 ppm) e também devido a interferência da grande quantidade de placebo frente ao ativo. Para a separação da impureza, foi utilizada uma coluna capilar DB-624 (30mx 0,32mmx 1,80 µm) [23]. Os autores concluíram que o método é sensível para baixas concentrações de epícloridrina e atendeu os parâmetros de validação analítica para especificação a nível traço (ppm).
- Tao et al. (2011) desenvolveram um método por cromatografia gasosa com amostrador *headspace* para determinação de epícloridrina nas amostras do processo de síntese do 3-Cloro-2-Hidroxipropiltriethylamônio (CHTAC). O método baseado em *headspace* (HS-GC) foi escolhido em razão de minimizar o efeito de compostos não voláteis na matriz, e também devido a uma das grandes vantagens da técnica que é não haver necessidade de pré-tratamento de amostras, o que torna a técnica ainda mais eficiente. Para o método escolhido pelos autores, foi utilizada uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,35 mm, espessura de 0,1 µm) e o detector FID. O procedimento de preparo da amostra no *headspace* foi de 10 minutos de agitação a 90°C, para alcançar o equilíbrio de fase líquido-vapor e um tempo de 0,2 minutos de pressurização. Os autores validaram o método desenvolvido, conseguindo precisão e exatidão na quantificação da epícloridrina, confirmando assim, a eficácia da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao *headspace* [24].

- Yan et al. (2017) propuseram um método para determinar epicloridrina e 1,3-dicloro-2-propanol (DCP) em soluções comerciais de poliamina (PAE) por cromatografia gasosa acoplada a *headspace*. Os principais objetivos do trabalho foram investigar o efeito da temperatura no equilíbrio da fase líquido-vapor nas soluções contendo PAE, otimizar as condições HS-CG e avaliar a precisão e exatidão do método proposto. No método proposto, foi utilizado um cromatógrafo a gás com detector FID, acoplado com amostrador automático de *headspace* e uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,35 mm, espessura de 0,1 µm) para separação do analito. O procedimento de preparo da amostra no *headspace* foi de 30 minutos de agitação a 60°C, para alcançar o equilíbrio de fase líquido-vapor e um tempo de 0,2 minutos de pressurização. Os resultados demonstraram que o método validado apresentou uma boa precisão (DPR < 2,90%) e foi exato, com recuperações de 93,6 a 105%. Também apresentou a vantagem de utilizar a técnica HS-CG, que é prática e rápida, sem a necessidade de pré-tratamento das amostras e calibração, com aumento considerável da eficiência da análise [25].

2.3 IMPUREZAS

A cobrança do controle do perfil de impurezas, pelos órgãos regulamentadores de medicamentos, está cada vez mais específica, pois a presença dessas impurezas na formulação, pode afetar diretamente a segurança e eficácia dos medicamentos, o que resulta, em alguns casos, doenças ainda mais graves.

Para a detecção das impurezas, existe a necessidade por parte das empresas produtoras dos medicamentos, se especializarem para atender as exigências dos órgãos reguladores como a ANVISA, para concessão e renovação de registro de novos produtos farmacêuticos e para Pós Registro de medicamentos.

No intuito de abordar os aspectos químicos e de segurança relacionado a impurezas, em 2006 o *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, criou uma diretriz que lista algumas das prováveis impurezas de rota e definiu os limites para identificação e quantificação, *Impurities in New Drug Substances Q3A(R2)*. Este documento descreve orientações sobre a identificação e quantificação de impurezas produzidas, pela síntese ou produto de degradação dos insumos farmacêuticos [26].

As impurezas são classificadas nas seguintes categorias:

- Impurezas orgânicas;
- Impurezas inorgânicas;
- Solventes residuais [26].

Os solventes são líquidos orgânicos ou inorgânicos e desempenham um papel importante na produção de insumos (são utilizados na síntese, separação, purificação e secagem) e também na produção dos produtos (por exemplo, granulação, revestimento, formulação em spray). Em cada um desses estágios, o produto pode estar potencialmente contaminado por solventes orgânicos, por essa razão a toxicidade desses solventes é o principal motivo para o controle de solvente residual [27].

Em 1997, o ICH apresentou a primeira versão do Guia Específico para o Monitoramento de Solventes Residuais (Q3C – *Guideline for Residual Solvents*), com o objetivo de recomendar as quantidades aceitáveis de solventes residuais no produto acabado e garantir a segurança do consumidor. Esse guia recomenda a utilização de solventes menos tóxicos e descreve os níveis considerados toxicologicamente aceitável para alguns solventes residuais [28]. E em harmonização, as farmacopeias passaram a publicar capítulos gerais específicos sobre o monitoramento de solventes residuais em insumos e produtos farmacêuticos [29].

As impurezas orgânicas são as impurezas mais comumente encontradas nos produtos farmacêuticos. Elas podem ser formadas durante o processo de fabricação dos insumos farmacêuticos e/ou durante o período de armazenamento dos insumos ou produto acabado. Estas impurezas incluem: materiais de partida da síntese do ativo; subproduto de síntese; intermediário de síntese; produtos de degradação; reagentes, materiais e catalisadores do processo de síntese [30].

A realização do controle dessas impurezas está correlacionada com a tecnologia alcançada nos instrumentos e técnicas instrumentais, pois na grande maioria, essas impurezas se encontram em baixas concentrações, e, com isso, surge a necessidade do emprego de técnicas altamente específicas e sensíveis. Como exemplo das técnicas mais utilizadas para essa finalidade, pode-se citar Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) acoplada ou não ao *headspace* e a combinação da cromatografia com a espectrometria de massas [30].

2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO HEADSPACE

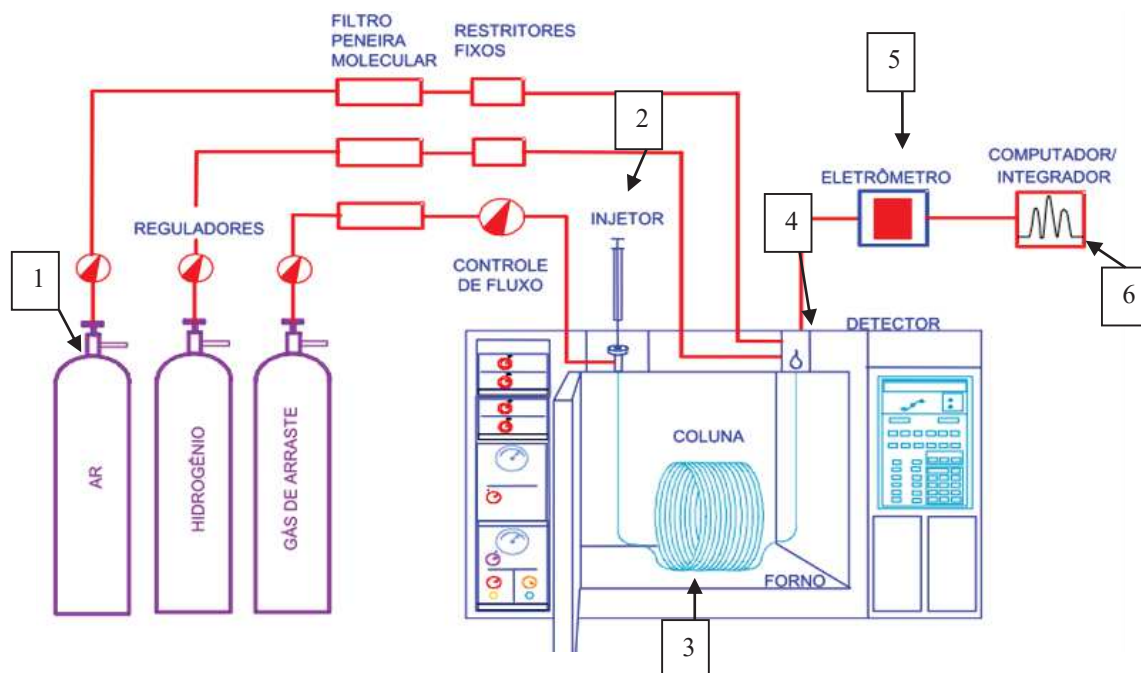
2.4.1 Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação de analitos voláteis e termicamente estáveis presentes em amostras. Nessa técnica, a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste. O fluxo de gás com a amostra vaporizada passa pela coluna (contendo a fase estacionária (FE)), onde por meio de diferentes interações ocorre a separação dos analitos. Em contraste com a maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito. A função da fase móvel é transportar o analito através da coluna [31].

Os analitos separados saem da coluna misturados no gás de arraste e passam pelo detector, onde é gerado o sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. No final da análise é gerado um sinal, que constitui um cromatograma, onde os analitos aparecem em forma de picos em diferentes tempos, dependendo da característica de cada analito, com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa [32].

A Figura 3 mostra a estrutura do cromatógrafo a gás e seus principais constituintes numerados.

Figura 3 - Esquema da estrutura de um cromatógrafo gasoso.



Fonte: Argenton, A. [33].

A numeração apresentada na Figura 3 mostra os principais constituintes do cromatógrafo gasoso, onde:

- 1) Reservatório de gás e controle de vazão e pressão;
- 2) Injetor de amostra;
- 3) Coluna cromatográfica e forno da coluna;
- 4) Detector;
- 5) Registrador de sinal;
- 6) Cromatograma;

O reservatório de gás é onde fica armazenada a fase móvel da cromatografia gasosa. O gás utilizado deve ser quimicamente inerte e apresentar elevado grau de pureza (> 99,9995%), como hélio (mais comum), nitrogênio ou hidrogênio. O gás de arraste influencia diretamente na eficiência da coluna e no tempo de retenção do analito [34].

O injetor deve ser capaz de introduzir a amostra na fase móvel sem que ocorra dispersão, evitando picos alargados ou divididos. No injetor, a amostra sólida ou líquida precisa ser convertida para fase gasosa instantaneamente sem decomposição térmica e, por isso, a temperatura no injetor precisa ser controlada, para que na sequência, seja transportada para a coluna. O objetivo principal das técnicas de

amostragem é garantir que uma alíquota representativa e homogênea da amostra sob investigação, seja carregada até a coluna, sem que ocorra contaminação e perda da amostra.

Existem diferentes tipos de injetores que devem ser escolhidos dependendo do tipo de coluna que será utilizada e do modo de injeção necessário, eles podem ser: injetor *split/splitless*, injetor *wide bore*, *on-column injector* (OCI).

Injetor *Split/Splitless* é o injetor mais comum, próprio para colunas capilares. O modo *Splitless* é mais adequado para amostras em nível traço e para amostras semi-voláteis (pontos de ebulição do analito são acima de aproximadamente 150°C). Nesse modo a amostra é retida na cabeça da coluna enquanto ventila o vapor de solvente residual, a válvula *split* é fechada e a amostra é injetada. O solvente cria uma área saturada na cabeça da coluna, que retém os componentes da amostra, quando a amostra estiver retida na coluna a válvula *Split* se abre e o vapor residual no injetor é arrastado para fora [35].

No modo *split* um volume maior de amostra pode ser injetada, pois depois da vaporização da amostra apenas uma parte dela vai para a coluna, o restante é descartado como resíduo. A válvula *split* permanece aberta. A amostra é injetada no liner, onde é vaporizada com o gás de arraste e a amostra vaporizada é dividida entre a coluna e o *split vent* [34].

Após injetada, a amostra vai para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos componentes da amostra. A maioria das separações é altamente dependente de temperatura, o controle da temperatura da coluna melhora a precisão da medida do pico. Por essa razão, na cromatografia gasosa é fundamental que a coluna esteja instalada em um forno de temperatura bem controlada.

A coluna deve ser escolhida conforme o tipo de amostra a ser analisada e considerando a resolução dos picos cromatográficos e a eficiência da coluna para os analitos de interesse [34].

Para alta eficiência da coluna, uma amostra de tamanho apropriado deve ser introduzida como uma zona “estrita” de vapor. A injeção lenta ou de amostras muito volumosas causa o espalhamento das bandas e uma resolução pobre. A porta de admissão da amostra é normalmente mantida a aproximadamente 50°C acima do ponto de ebulição do componente mais volátil da amostra [31].

As colunas cromatográficas variam em comprimento de menos de 2 metros até 60 metros, ou mais. São constituídas de aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou teflon.

Para serem inseridas em um forno para termostatização, elas são geralmente formadas como bobinas com diâmetros de 10 cm a 30 cm [31].

Para cromatografia de gás as colunas são divididas em dois tipos gerais: colunas empacotadas ou capilares.

Colunas empacotadas possuem a fase estacionária constituída por um filme de líquido retido por adsorção na superfície de um suporte sólido inerte finamente dividido. Para as colunas analíticas empacotadas normais, o tamanho da amostra pode variar de poucos décimos de microlitro até 20 microlitros [31].

Colunas capilares a fase estacionária é um filme líquido de algumas dezenas de μm de espessura que reveste uniformemente o interior de um tubo capilar, por serem mais compridas e possuírem mais pratos teóricos são mais eficientes, promovem melhor separação de misturas complexas. Mas, por apresentar um diâmetro menor suportam volume de amostra menor e podem satura-se rapidamente.

O fluxo de gás da coluna, que contém os compostos separados, passa através de um dispositivo chamado detector, que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade do material eluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa [32].

O detector mais aplicado para essa técnica é o de ionização em chama (FID), devido à sua alta sensibilidade, ampla faixa de linearidade e menos ruídos, embora seja limitado para detectar compostos que possuam ligações C-H [35]. Com um queimador, o efluente da coluna é misturado com hidrogênio e ar, e então, entra em ignição eletricamente.

A maioria dos compostos orgânicos produzem íons e elétrons quando pirolisados à temperatura de uma chama ar/hidrogênio. Estes compostos são detectados monitorando a corrente produzida coletando íons e elétrons. Poucas centenas de volts aplicadas entre a ponta do queimador e um eletrodo, localizado acima da chama, servem para coletar os íons e elétrons [31].

Um dos inconvenientes da técnica de cromatografia gasosa está no preparo das amostras, pois para amostras sólidas é necessário um complexo procedimento na manipulação, como por exemplo, fazer uma extração do analito de interesse, e em seguida, introduzir uma alíquota da solução resultante no cromatógrafo a gás [34].

Por essa razão a técnica de *headspace* acoplado a técnica de cromatografia gasosa tem sido cada vez mais utilizada para eliminar esses problemas, por ser o procedimento mais comum para a análise de solventes residuais e impurezas voláteis

em amostras de insumos farmacêuticos. Além de que técnica de *headspace* possui a vantagem de prolongar a vida útil da coluna e prevenir a contaminação do injetor [36].

2.4.2 Headspace

A técnica do *headspace* consiste na evaporação dos analitos de interesse e amostragem dos vapores acima da amostra (matéria-prima, excipientes, produto acabado) após alcançado o equilíbrio térmico e gasoso em um tubo fechado, conforme apresentado na Figura 4. Para que isso ocorra, a amostra original é colocada em um *vial* fechado que é então aquecido à temperatura constante, onde os compostos voláteis se vaporizam parcialmente acima da amostra. Em seguida, o sistema chega ao equilíbrio e os compostos voláteis presentes nessa fase vapor são analisados pela técnica cromatografia gasosa. Ao analisar uma alíquota da fase vapor, são identificados os compostos voláteis sem interferência da matriz não-volátil [37].

Figura 4 - Desenho esquemático processo amostragem da técnica *headspace*.



Fonte: Del Grande, M. [38]

A alíquota de fase vapor é transferida por meio de uma seringa especial (*gas tight* – a qual não deixa que o vapor vaze para o ambiente) e injetados no cromatógrafo para separação [37].

Para a análise no *headspace* são necessários que alguns parâmetros sejam controlados, como por exemplo, o tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação do *vial* e a temperatura do forno do *headspace*. Esses parâmetros influenciam no

equilíbrio entre a fase líquida (que contém a amostra) e a fase gasosa, pois evita que variações no procedimento de injeção da amostra no CG ocorram, tais como as variações no tempo de retenção e na forma dos picos cromatográficos.

A principal característica do *headspace* é a possibilidade da determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada de forma direta. Além disso, o *headspace* torna-se insubstituível e muito eficiente, pois possibilita a introdução da amostra sem pré-tratamento no cromatógrafo gasoso. Isto se torna mais crítico, principalmente devido à baixa detecção dos detectores cromatográficos e a indesejável contaminação da coluna por resíduos não-voláteis [39].

De acordo com os autores Loda et al. (2011), Tao et al. (2011) e Yan et al (2017), ambos os sistemas HS-GC-MS e HS-GC-FID são eficazes para determinar solventes voláteis presentes em produtos farmacêuticos. Neste trabalho, a técnica escolhida para a determinação de epicloridrina em carvedilol foi HS-GC-FID, em razão de ser uma técnica mais acessível, mais rápida para o controle de qualidade e de menor custo para a indústria farmacêutica.

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

No Brasil e em diversos países, a validação documentada da metodologia analítica é exigida pelos órgãos regulatórios às indústrias farmacêuticas, nos processos de registro e pós registro de medicamentos. Existem legislações e guias estabelecidos por estes órgãos regulatórios, que servem como diretrizes a serem adotadas no processo de validação. De acordo com a RDC nº 37, de 06 de julho de 2009, no Brasil, a ANVISA preconiza a utilização das monografias descritas na Farmacopeia Brasileira, código oficial farmacêutico do país, como referência no controle de qualidade de insumos e produtos farmacêuticos e, na ausência de monografia oficial inscrita neste compêndio, admite a adoção de farmacopeias estrangeiras, últimas edições [36].

Conforme legislação vigente, é necessário validar métodos analíticos que não estão descritos em farmacopeias ou compêndios oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA, dessa forma o método será avaliado em todos os parâmetros preconizados de acordo com a RDC 166/17, para testes quantitativos de impurezas orgânicas.

Para fins quantitativos, na validação serão avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão, faixa de trabalho, robustez e estabilidade das amostras.

Quadro 1 - Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	-dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
Exatidão	não	sim	não	Sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	Sim
Precisão Intermediária	não	sim ⁽¹⁾	não	sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não ⁽³⁾	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não ⁽³⁾
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

Fonte: ANVISA, 2017.

2.5.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade que o método analítico possui em identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz [41].

Para cromatografia gasosa, a seletividade do método pode ser avaliada através da análise de compostos semelhantes ou da análise de outros componentes voláteis presentes na amostra, no intuito de comprovar que não há coeluição com o analito de interesse.

2.5.2 Linearidade

Entende-se a linearidade como a capacidade de uma metodologia analítica, em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, obtida por padronização interna ou externa [41].

Para uma linearidade, é necessário no mínimo 5 concentrações diferentes da substância química de referência para as soluções preparadas, em, no mínimo, triplicata. As soluções devem ser preparadas de maneira independente.

A fórmula matemática que relaciona as duas variáveis, com a concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ versus resposta de cada analito de interesse é demonstrada pela Equação 1.

$$y = ax + b \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

y: resposta medida (área do pico ou razão das áreas dos picos);

x: concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$;

a: inclinação da curva de calibração (ou coeficiente angular);

b: intersecção com o eixo y, quando $x=0$ (ou coeficiente linear).

2.5.3 Limite de Quantificação

Neste parâmetro, é avaliada a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de solventes residuais, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas, e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/v, partes por milhão na amostra) [41].

Para métodos instrumentais, uma das formas de obter o limite de quantificação é através da análise do menor ponto da linearidade, precisão e exatidão, pois dessa forma pode-se afirmar sua correspondência linear, precisa e exata.

Também pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produz relação sinal-ruído superior a 10:1.

2.5.4 Precisão

A Precisão é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. No caso de impurezas conhecidas ausentes ou presentes em concentração menor que o limite da especificação na amostra, esta deve ser corrigida com concentrações conhecidas do padrão de impurezas [41].

A repetibilidade do método deve ser avaliada por no mínimo 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três)

concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.

Precisão intermediária (precisão inter-corridas), deve expressar a proximidade entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, mas obtido em dias diferentes, realizada por analistas diferentes.

2.5.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é obtida pela proximidade dos resultados obtidos individualmente, pelo método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A análise para impurezas, deve ser realizada pela adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito ao medicamento ou ao fármaco [41].

Deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas independentes em cada nível.

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente.

2.5.6 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este representa frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Caso haja susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas através de precauções descritas no método [41].

Para análises quantitativas, o impacto das variações nos parâmetros dos métodos deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão.

Esse parâmetro é realizado com o objetivo de prevenir problemas em ensaios interlaboratoriais e identificar os potenciais fatores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os padrões analíticos de referência utilizados foram: metanol, etanol, acetonitrila, acetato de etila, tolueno, 2-propanol e benzeno, todos obtidos pela Farmacopeia Americana (USP) e o padrão da impureza epicloridrina da *Clear Synth*.

O reagente utilizado foi o ácido acético P.A. da *Sigma-Aldrich*.

As soluções preparadas utilizaram como diluente água purificada obtida com equipamento *Milli-Q Millipore*.

3.2 AMOSTRA

Para a validação do método analítico da impureza orgânica, foi utilizada a matéria-prima carvedilol.

3.3 EQUIPAMENTO

As análises foram conduzidas em um sistema de injeção *Headspace Transferline* marca Agilent Technologies, modelo 7697A, acoplado ao cromatógrafo gasoso marca Agilent Technologies, modelo 7890B, com detecção por FID.

3.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Parâmetros utilizados no sistema cromatográfico encontram-se nas Tabelas de 1 a 3.

Tabela 1- Condições do sistema cromatográfico.

Coluna	DB-WAXETR (G16) (100% polietilenoglicol)
Dimensões	30 metros x 0,53 mm x 2,0 µm
Gás de arraste	Hélio
Fluxo inicial	4,0 mL.min ⁻¹
Temperatura injetor	220°C
Temperatura detector	260°C
Tipo de detector	FID

Fonte: A autora (2019).

Tabela 2- Programação de temperatura da coluna.

Rampa (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de permanência (min)	Tempo total (min)
-	90	12,00	12,00
40	220	4,75	20,00

Fonte: A autora (2019).

Tabela 3- Condições do headspace transferline.

Vial oven	85°C
Temperatura loop	100°C
Temperatura transferline	110°C
Tempo preparo amostra	30 min
Pressurização	0,10 min

Fonte: A autora (2019).

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES

O preparo da Solução Teste foi realizado pesando 200 miligramas da matéria-prima de carvedilol diretamente no *vial* de *headspace* de 20 mL. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de ácido acético e 1,5 mL de água purificada. O *vial* foi vedado com septo de silicone e *crimp* de alumínio.

Para o preparo da Solução Estoque Padrão epicloridrina, adicionou-se 0,13 mL do padrão de epicloridrina em balão volumétrico de 10 mL contendo cerca de 5 mL de água purificada, completou o volume do balão com água purificada e homogeneizou por inversão. Foi transferido 0,5 mL da 1ª diluição para balão volumétrico de 25 mL contendo 15 mL de água purificada. Completou-se o volume do balão com o mesmo diluente e homogeneizou por inversão. A concentração obtida da epicloridrina foi 294,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

No preparo da Solução Padrão epicloridrina, foi transferido 0,5 mL da Solução Estoque Padrão epicloridrina, para um balão volumétrico de 25 mL com 10 mL de água purificada. Completou-se o volume do balão com o mesmo diluente. A concentração obtida da epicloridrina foi 5,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A Solução Teste foi preparada pela pesagem de 0,200 gramas da matéria-prima de carvedilol em *vial* de *headspace* de 20 mL. Adicionou-se 1,5 mL de água purificada e 0,5 mL de ácido acético. Vedou-se o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio.

A Solução Teste Contaminada foi preparada de modo idêntico da Solução Teste, mas com a adição de 0,5 mL da Solução Padrão epicloridrina.

O preparo da Solução *System Suitability* foi realizado com 1,0 mL de água purificada, 0,5 mL de ácido acético e 0,5 mL da Solução Padrão epicloridrina em *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedou-se o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio.

3.6 PARÂMETROS AVALIADOS

3.6.1 Seletividade

Neste método, a seletividade foi avaliada pela análise da eluição dos possíveis analitos voláteis presentes na amostra do carvedilol: Solução branco (diluente), Solução Padrão epicloridrina, Solução Padrão metanol, Solução Padrão etanol, Solução Padrão 2-propanol, Solução Padrão acetonitrila, Solução Padrão acetato de etila, Solução Padrão benzeno, Solução Padrão tolueno, Solução *System Suitability* (Padrão Epicloridrina, para avaliação do sistema), Solução Teste carvedilol, Solução seletividade (mistura de todos os possíveis contaminantes voláteis da matéria-prima carvedilol) e Solução Seletividade Teste carvedilol (mistura de todos solventes e a matéria-prima carvedilol).

3.6.2 Linearidade

Para garantir a linearidade do método, foram realizadas 3 curvas independentes (de carvedilol, contaminando com epicloridrina). As concentrações da epicloridrina utilizadas para avaliação deste parâmetro, foram definidas de acordo com a especificação da impureza sugerida pela metodologia proposta. A linearidade deve seguir as seguintes condições:

- As curvas analíticas devem apresentar coeficiente de correlação $R \geq 0,99$;
- Não apresentar tendência na distribuição dos resíduos;
- Não apresentar *outliers* nos valores de resíduos padronizados pela análise de *Grubbs*;
- Deve ser comprovada a homocedasticidade dos dados;
- Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5%.

A Linearidade foi verificada através da análise de uma curva analítica com 7 níveis e 3 réplicas em cada nível, compreendendo o intervalo de 40 a 240% da especificação da impureza orgânica.

Tabela 4- Preparo das Soluções Linearidade.

Identificação	Massa epicloridrina (μg)	Teor epicloridrina ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Amostra (mg)	Ácido Acético (mL)	Água Purificada (mL)	Sol. Pad. epicloridrina (mL)
Linearidade 40%	1,18	5,90			1,3	0,2
Linearidade 80%	2,36	11,80			1,1	0,4
Linearidade 100%	2,95	14,75			1,0	0,5
Linearidade 120%	3,54	17,70	200	0,5	0,9	0,6
Linearidade 160%	4,72	23,60			0,7	0,8
Linearidade 200%	5,90	29,50			0,5	1,0
Linearidade 240%	7,08	35,40			0,3	1,2

Fonte: A autora (2019).

3.6.3 Limite de Quantificação

Para esta validação, o limite de quantificação foi determinado pelo nível de concentração de 40%.

3.6.4 Precisão

A precisão (repetibilidade) do método foi verificada com três réplicas para cada concentração (baixa, média e alta), da impureza epicloridrina com a contaminação da matriz carvedilol, observando o intervalo linear.

Para a concentração baixa, foi utilizado o limite de quantificação 40%, a concentração média 120% e a alta concentração 240%. Os testes foram avaliados pela análise do desvio padrão relativo (coeficiente de variação), calculado através do teor da epicloridrina em carvedilol, conforme as Equações 2 e 3.

$$T (\mu g \cdot g^{-1}) = \left(\frac{C \times V}{ms} \right) \times \left[\frac{\frac{As}{ms} - \frac{As}{ms_{100\%}}}{\frac{At}{mt} - \frac{At}{ms_{100\%}}} \right] \quad \text{Equação 2}$$

Em que, T é o teor em $\mu g \cdot g^{-1}$, da epicloridrina; C é a concentração de Epicloridrina na Solução Padrão Epicloridrina, em $\mu g \cdot mL^{-1}$; V é o volume pipetado, em mL, da Solução Padrão epicloridrina transferido para o *vial* no preparo da Solução Precisão 100%; ms é a massa em gramas da amostra no *vial* para o preparo da Solução Precisão em questão; As é a área da epicloridrina na solução Precisão em questão, At é a área da Epicloridrina na Solução Teste; mt é a massa em gramas, pesada da amostra para o *vial* no preparo da Solução Teste; $As_{100\%}$ é a área da epicloridrina na Solução Precisão 100%; $ms_{100\%}$ é a massa, em g, pesada da amostra para o *vial* no preparo da Solução 100%.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

O preparo das Soluções Precisão foi realizado conforme Tabela 5.

Tabela 5- Preparo Soluções Precisão.

Identificação	Massa Epicloridrina (μg)	Teor Epicloridrina ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra (mg)	Ácido Acético (mL)	Água Purificada (mL)	Sol. Pad. Epicloridrina (mL)
Precisão 40%	1,18	5,90	200	0,5	1,3	0,2
Precisão 100%	2,95	14,75			1,0	0,5
Precisão 120%	3,54	17,70			0,9	0,6
Precisão 240%	7,08	35,40			0,3	1,2

Fonte: A autora (2019).

Para a avaliação do desvio padrão relativo da repetibilidade foram utilizadas as especificações apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Especificação utilizadas para o desvio padrão relativo (DPR) da repetibilidade.

Concentração	Especificação
40%	$\leq 11\%$
120 e 240%	$\leq 7,3\%$

Fonte: A autora (2019).

A precisão intermediária, deu-se com a verificação da segunda repetibilidade, porém realizada em dia diferente, por analista diferente, através da comparação dos resultados dos dois dias. As especificações utilizadas são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Especificação utilizadas para o desvio padrão relativo (DPR) da precisão intermediária.

Concentração	Especificação
40%	$\leq 16\%$
120 e 240%	$\leq 11\%$

Fonte: A autora (2019).

3.6.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da adição de padrão de epicloridrina na matriz carvedilol. Foi verificada através da recuperação da epicloridrina, a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três determinações nas concentrações baixa 40% (limite de quantificação), média 120% e alta 240%, com três réplicas cada.

O preparo das amostras de cada nível da exatidão foi realizado conforme a Tabela 8.

Tabela 8 – Preparo das Soluções Exatidão.

Identificação	Massa epicloridrina (µg)	Teor epicloridrina (µg g ⁻¹)	Amostra (mg)	Ácido Acético (mL)	Água Purificada (mL)	Sol. Pad. Epicloridrina (mL)
Exatidão 40%	1,18	5,90	200	0,5	1,3	0,2
Exatidão 100%	2,95	14,75			1,0	0,5
Exatidão 120%	3,54	17,70			0,9	0,6
Exatidão 240%	7,08	35,40			0,3	1,2

Fonte: A autora (2019).

Foi calculado o teor obtido em cada nível e em seguida calculado a recuperação relativa, utilizando a Equação 4.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{T(\mu\text{g.g}^{-1})}{T_t(\mu\text{g.g}^{-1})} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que, Recuperação (%) é a recuperação relativa percentual; T (µg.g⁻¹) é o teor da epicloridrina calculado pela Equação 3; T_t (µg g⁻¹) é o teor teórico da epicloridrina de acordo com o nível de concentração (40%, 120% e 240%).

As especificações utilizadas são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Especificação utilizadas para recuperação da exatidão.

Concentração	Especificação
40 a 240%	80 a 110%

Fonte: A autora (2019).

As especificações do desvio padrão relativo (DPR) entre as três determinações estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Especificação utilizadas para o desvio padrão relativo (DPR) na exatidão.

Concentração	Especificação
40%	≤ 11%
120 e 240%	≤ 7,3%

Fonte: A autora (2019).

3.6.6 Robustez

Na robustez é avaliada a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros no método analítico proposto. Estas alterações possibilitaram analisar a sua confiança durante o uso na rotina laboratorial.

O parâmetro da robustez foi avaliado através da análise da Solução Amostra carvedilol e Solução Amostras de carvedilol contaminadas com epicloridrina nas concentrações de 80 e 100%, no intuito de calcular o Teor de cada alteração do parâmetro e, assim, avaliar a recuperação frente ao método sem alteração e o método com as alterações propostas. As alterações do método analítico foram: temperatura inicial do forno da coluna, vazão do gás de arraste e troca de lote de coluna cromatográfica.

As soluções para o parâmetro da robustez foram preparadas conforme Tabela 11.

Tabela 11 - Preparo das Soluções para Robustez.

Identificação	Massa Epicloridrina (μg)	Teor Epicloridrina ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostra (mg)	Ácido Acético (mL)	Água Purificada (mL)	Sol. Pad. Epicloridrina (mL)
Contaminada 80%	2,36	11,80	200	0,5	1,1	0,4
Contaminada 100%	2,95	14,75			1,0	0,5

Fonte: A autora (2019).

Foi calculado o teor obtido em cada parâmetro da robustez e, em seguida, calculado a recuperação de cada alteração frente ao método original sem alteração. A especificação utilizada para a recuperação foi de 80% a 110%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seletividade

Nas Figuras 5 a 17, estão apresentados os cromatogramas obtidos da Solução Branco, Solução *System Suitability*, Solução Padrão Epicloridrina, Solução Padrão Metanol, Solução Padrão Etanol, Solução Padrão 2-propanol, Solução Padrão Acetonitrila, Solução Padrão Acetato de Etila, Solução Padrão Benzeno, Solução Padrão Tolueno, Solução Amostra, Solução Seletividade e Solução Seletividade Amostra, respectivamente.

Figura 5 - Cromatograma da Solução Branco.

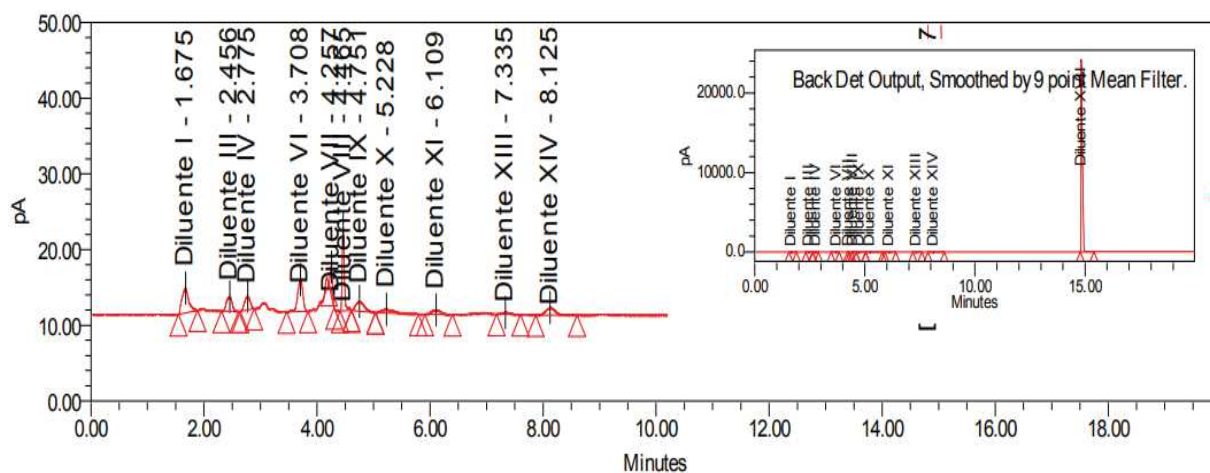


Figura 6 - Cromatograma da Solução System Suitability.

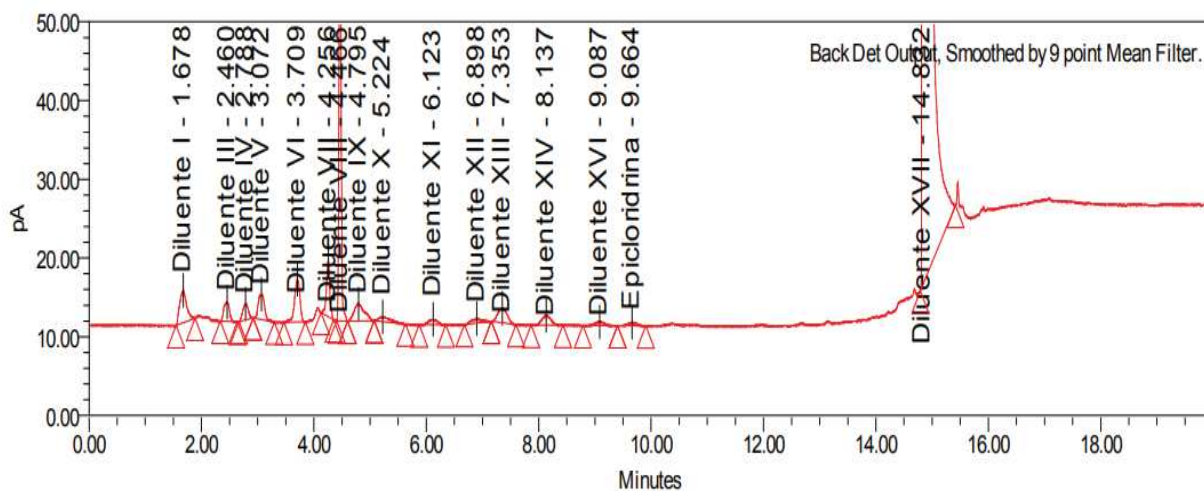


Figura 7 - Cromatograma do Padrão Epicloridrina.

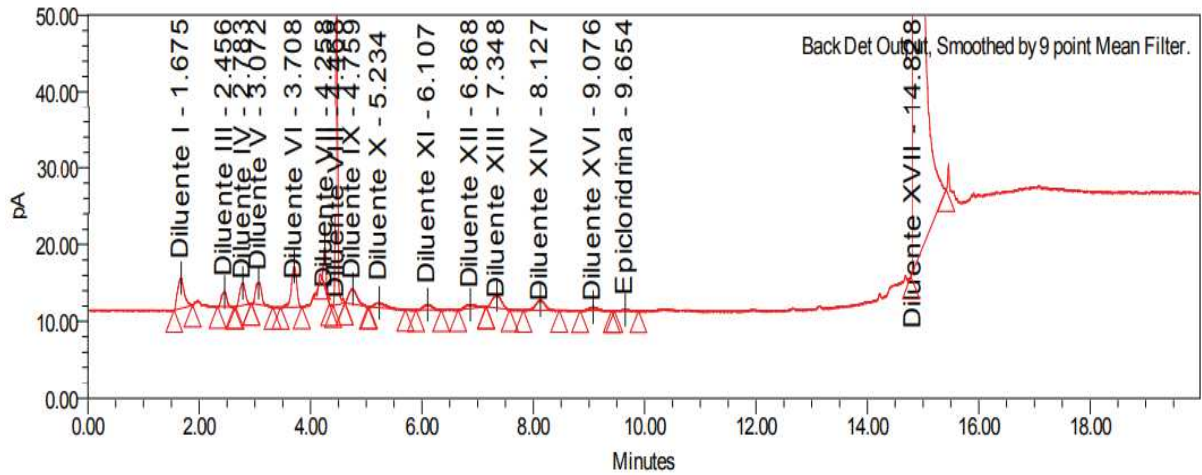


Figura 8 - Cromatograma do Padrão Metanol.

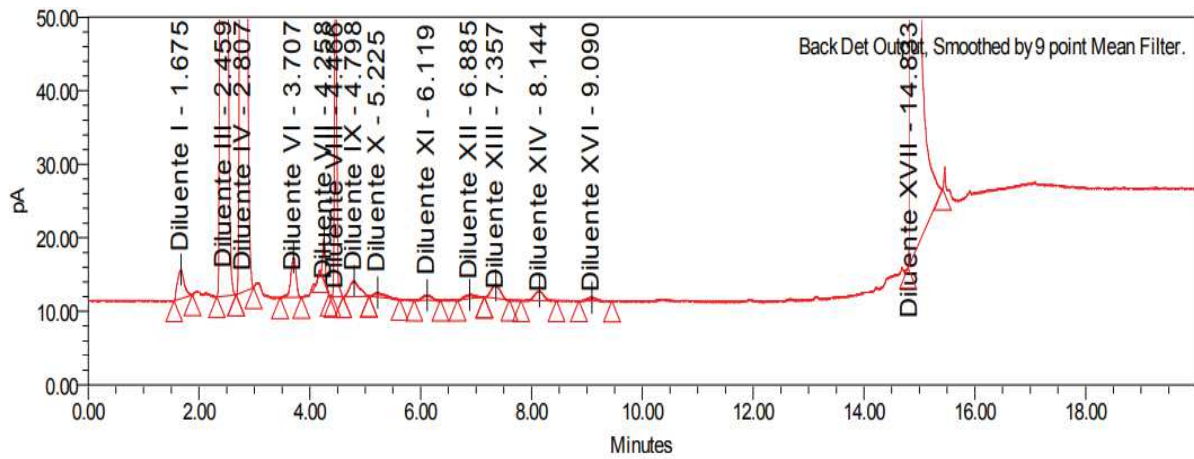


Figura 9 - Cromatograma do Padrão Etanol.

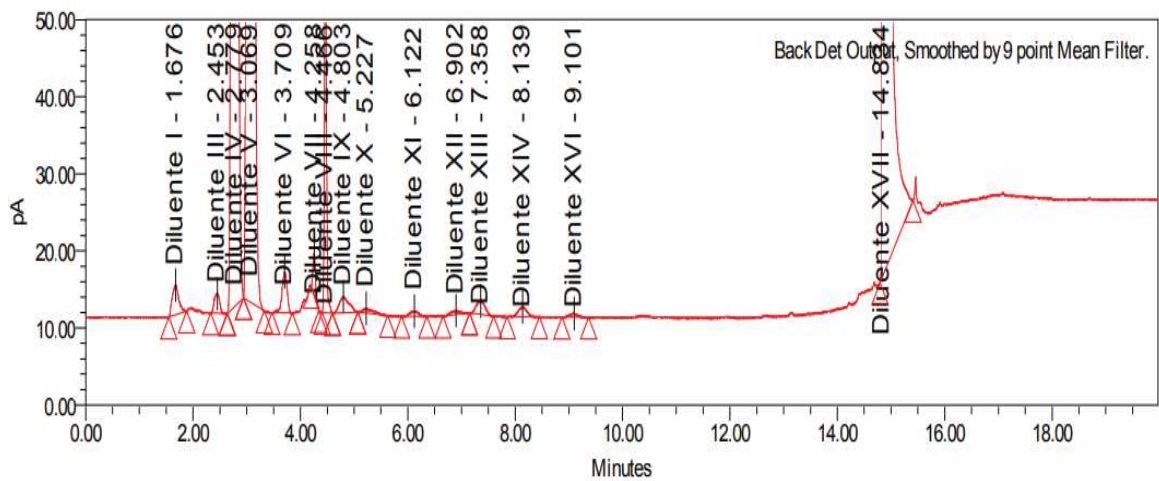


Figura 10 - Cromatograma do Padrão 2-Propanol.

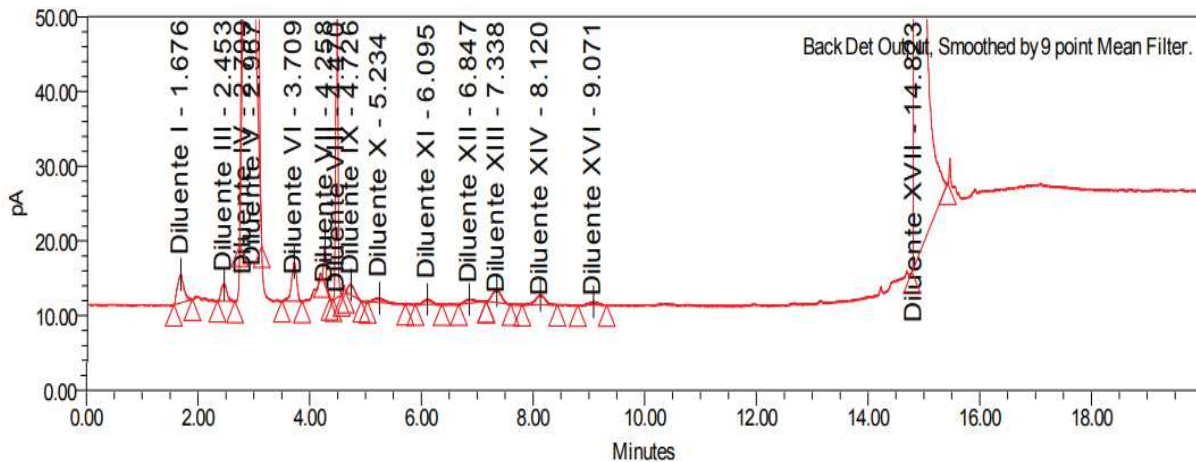


Figura 11- Cromatograma do Padrão Acetonitrila.

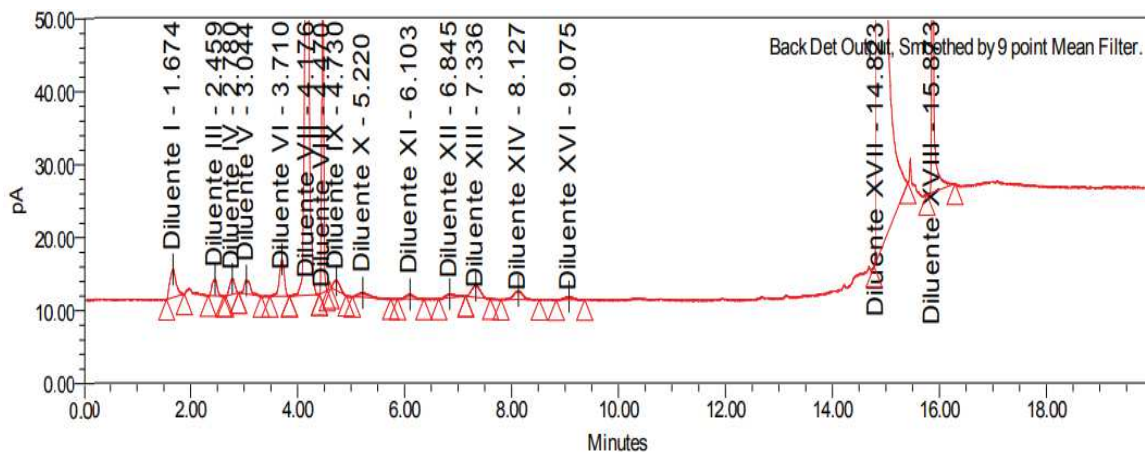


Figura 12 - Cromatograma do Padrão Acetato de Etila.

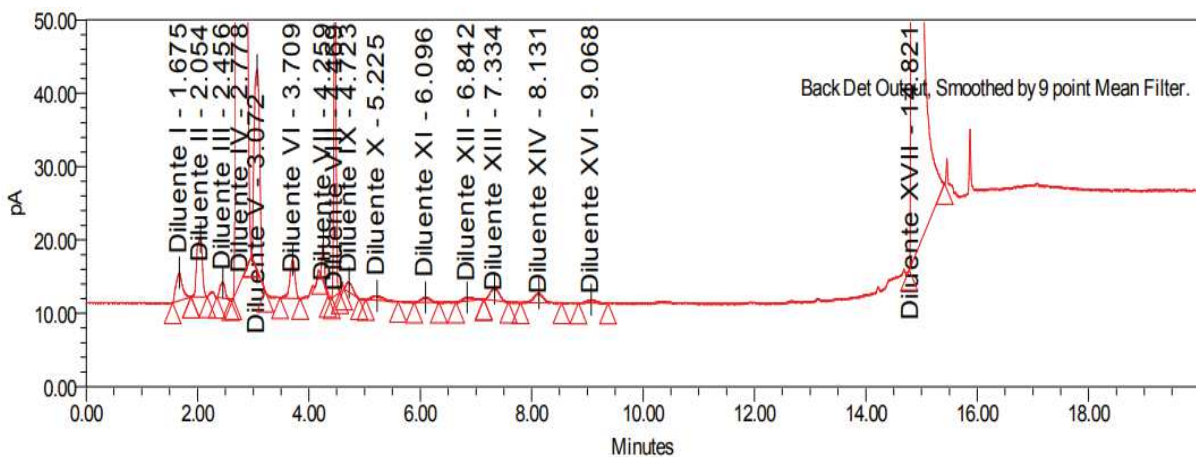


Figura 13 - Cromatograma do Padrão Benzeno.

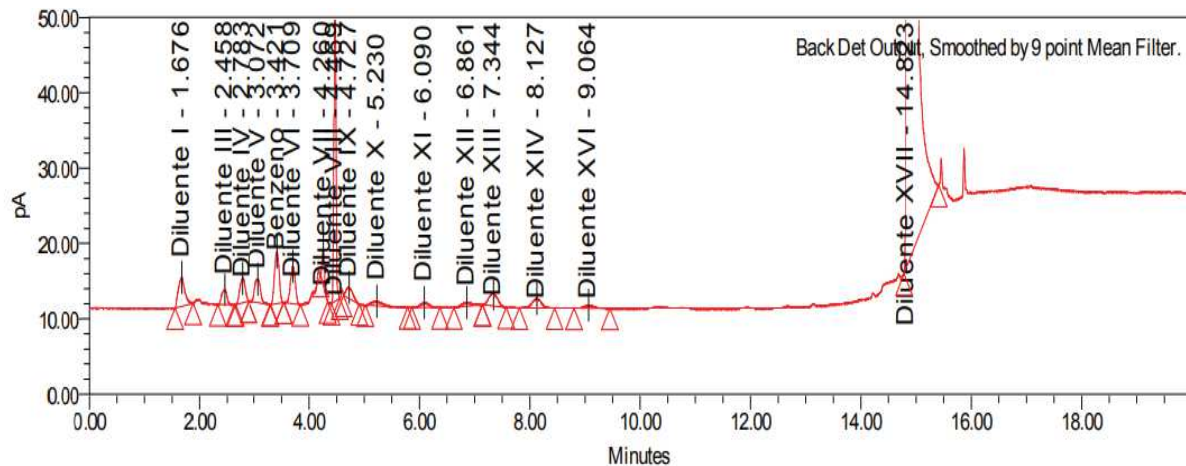


Figura 14 - Cromatograma do Padrão Tolueno.

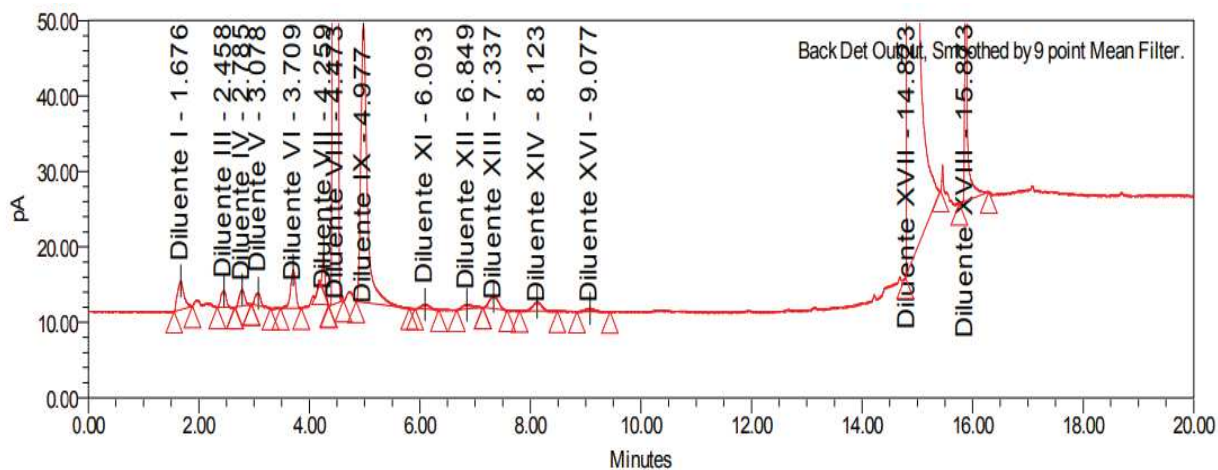


Figura 15 - Cromatograma da Solução Amostra.

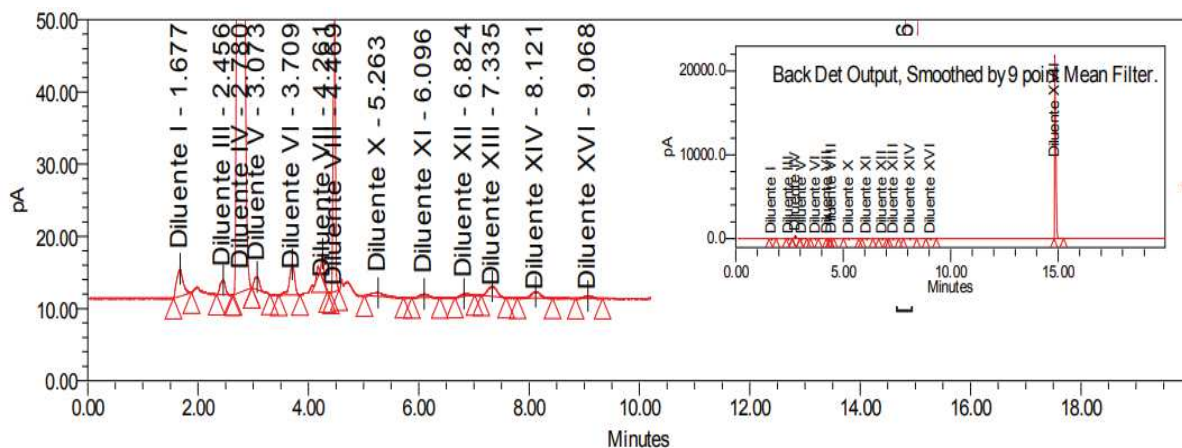


Figura 16 – Cromatograma da Solução Seletividade.

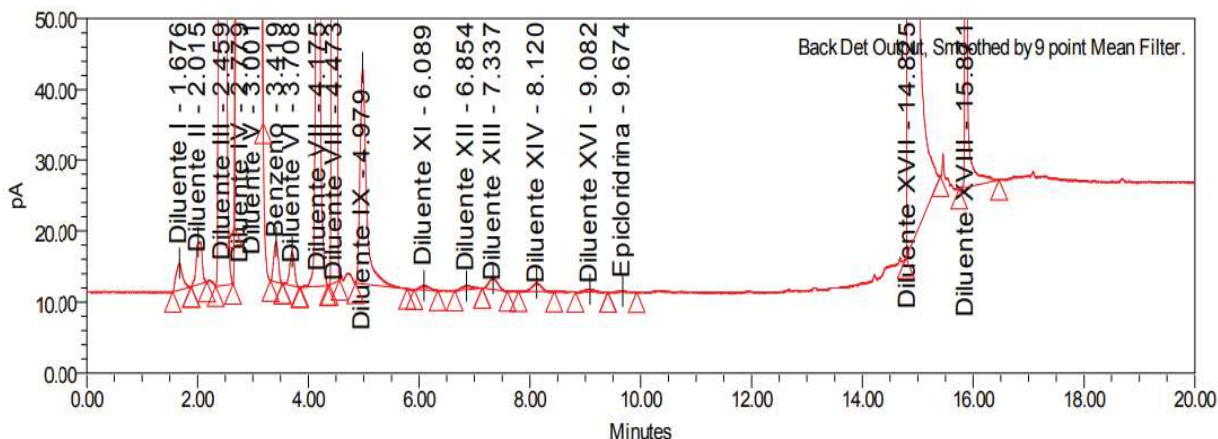
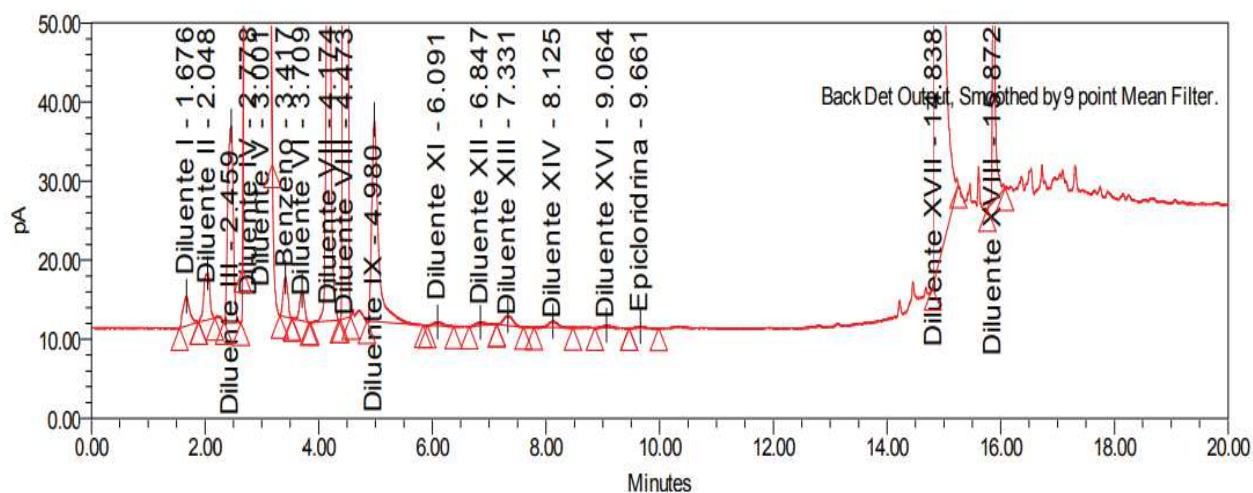


Figura 17 - Cromatograma da Solução Seletividade Amostra.



Os cromatogramas acima demonstram que nem todos os solventes são confirmados, pois alguns deles coeluem com o diluente ou, em alguns casos, o método não é apropriado para a quantificação do solvente. Porém, é possível comprovar que não há coeluição de nenhum outro analito ou impureza do diluente com o analito de interesse Epichloridrina. Dessa forma, confirmou-se que nenhum solvente residual presente na amostra de carvedilol, irá interferir na quantificação do analito de interesse.

A Tabela 12 apresenta os resultados das áreas, DPR (desvio padrão relativo) e resolução da epichloridrina nas Soluções System Suitability.

Tabela 12 - System Suitability para Epicloridrina.

Identificação	Área	DPR (%)	Especificação (%)	Resolução	Especificação
System Suitability	5,654681	6,8	≤ 7,3	1,8	≥ 1,5
	5,369300			1,8	
	4,813301			1,9	
	4,739671			1,9	
	5,239690			1,8	
	4,989280			1,8	

Fonte: A autora (2019).

Tabela 13 - Tempos de retenção e resolução na Solução Seletividade Amostra.

Solvente	Tempo de retenção (min)	Resolução	Especificação
Epicloridrina	9,667	2,2	≥ 1,5
Metanol	-	-	
Etanol	-	-	
2-Propanol	-	-	
Acetonitrila	-	-	
Acetato de Etila	-	-	
Benzeno	3,418	1,9	
Tolueno	-	-	

Fonte: A autora (2019).

Através dos cromatogramas das figuras 5 a 17 e da Tabela 13, confirma-se que o método proposto é seletivo para as análises de Epicloridrina, uma vez que não houve coeluição dos picos de interesse e os mesmos apresentaram resolução maior ou igual a 1,5 na Solução Seletividade Amostra.

4.2 Linearidade

A Tabela 14 apresenta os resultados para cada nível e suas respectivas áreas obtidas na análise de linearidade da Epicloridrina.

Tabela 14 - Linearidade Epicloridrina.

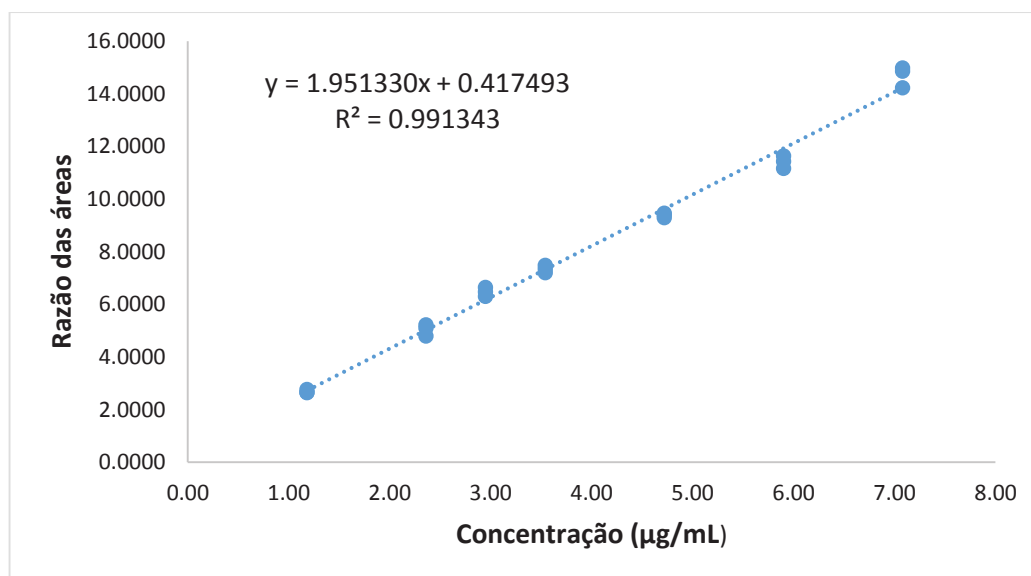
Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR(%)	Especificação DPR (%)	
System Suitability	6,117873	1,8	3,8	$\leq 7,3$	
	5,753891	1,8			
	6,004604	1,9			
	5,892593	1,9			
	5,499194	1,8			
	5,712123	1,8			
Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	[] Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	R ²	R	Especificação R
Solução Teste	0,000000	0,00	0,991	0,996	> 0,990
	0,000000				
	0,000000				
Linearidade 40%	2,655781	1,18			
	2,765313				
	2,644004				
Linearidade 80%	5,098710	2,36			
	5,220411				
	4,797958				
Linearidade 100%	6,644299	2,95			
	6,303123				
	6,471300				
Linearidade 120%	7,347512	3,54			
	7,477308				
	7,201082				
Linearidade 160%	9,399598	4,72			
	9,288471				
	9,467007				
Linearidade 200%	11,642920	5,90			
	11,427628				
	11,165419				
Linearidade 240%	14,986804	7,08			
	14,861499				
	14,232380				

^a massa teórica de epicloridrina, em μg , contida no vial.

Fonte: A autora (2019).

Os resultados obtidos de R para a epicloridrina foi satisfatório, visto que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação é de 0,990. Na Figura 18 é apresentado o gráfico da linearidade de epicloridrina e sua respectiva equação da reta.

Figura 18 - Equação da reta obtida na análise de linearidade de epicloridrina.



O gráfico da figura 18, gerou um valor de R^2 de 0,991343, que confirma ser maior que o mínimo aceitável.

Análise de Variância – ANOVA

Na Tabela 15 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA) do analito. Pode-se observar que em todos os resultados, na análise dos mínimos quadrados, o $F_{\text{significação}}$ é menor que 0,05 (nível de significância), garantindo a validade da regressão linear com nível de confiança de 95%.

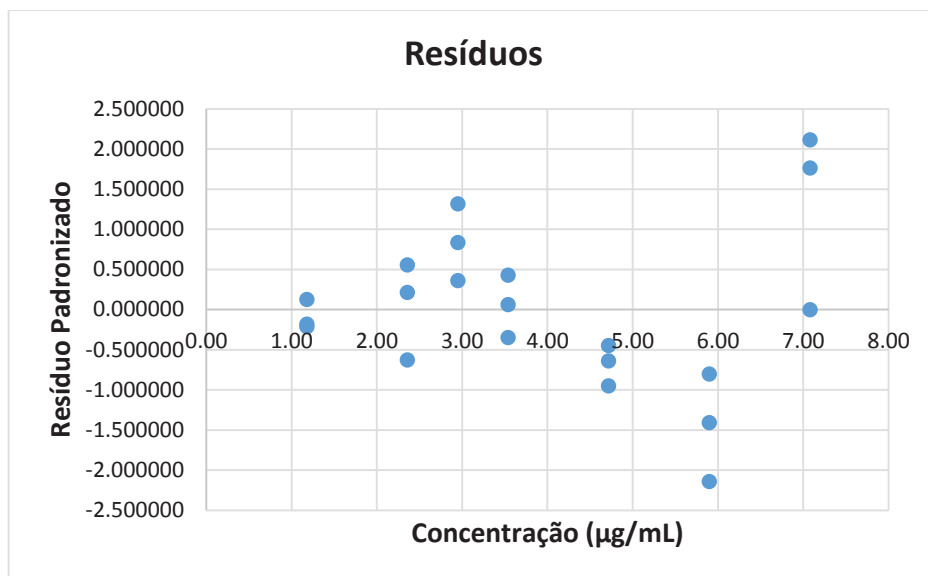
Tabela 15 - Resultados do teste ANOVA para a linearidade de epicloridrina.

	g.l.	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	291.97922	291.97922	2175.76513	4.60821E-21
Resíduo	19	2.54973	0.13420		
Total	20	294.52894			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P
Interseção	0.417493	0.1839935	2.269065	0.035103839
Variável X 1	1.95133	0.0418336	46.6451	4.60821E-21

g.l.: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática.
 Fonte: A autora (2019).

Figura 19 - Gráfico de resíduos padronizados para epiclorigrina.



O gráfico de resíduos da Figura 19, demonstra que os erros são independentes da média nula e de variância constante, uma vez que os pontos apresentaram-se distribuídos de forma aleatória em torno da reta de resíduo zero, com variância homogênea no início e no final das observações. Portanto, o método proposto não apresenta tendências e possui uma distribuição aleatória dos erros.

Avaliação de Outliers – Teste de Grubbs

O teste de Grubbs é utilizado para verificar a presença de valores considerados aberrantes (*outliers*) em relação ao seu espaço amostral. Valores aberrantes podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados. Este teste foi aplicado nos valores de resíduos, obtidos pelo teste ANOVA, para verificar a presença de *outliers* nos resultados da Figura 19 acima.

Tabela 16 - Resultado dos resíduos e análise de Grubbs.

Observação	Resíduos	Valor calculado	Especificação (n=21)
1	-0.06428	-0.18004	
2	0.04525	0.12673	
3	-0.07606	-0.21302	
4	0.07608	0.21307	
5	0.19778	0.55392	
6	-0.22467	-0.62925	
7	0.47038	1.31740	
8	0.12921	0.36187	
9	0.29738	0.83288	
10	0.02231	0.06248	
11	0.15211	0.42600	≤ 2,73
12	-0.12412	-0.34763	
13	-0.22817	-0.63905	
14	-0.33930	-0.95028	
15	-0.16077	-0.45026	
16	-0.28742	-0.80499	
17	-0.50271	-1.40796	
18	-0.76492	-2.14233	
19	0.75389	2.11143	
20	0.62859	1.76049	
21	-0.00053	-0.00149	

Fonte: A autora (2019).

Considerando o valor de $n = 21$, com nível de confiança de 95%, tem-se como especificação o valor tabelado de 2,73. Comparando este valor (2,73) com os valores calculados pelo teste de Grubbs, verifica-se que nenhum dos valores calculados é maior que o valor tabelado, portanto, estatisticamente não há presença de *outliers* nos resultados da análise para a impureza orgânica analisada.

Avaliação da Homocedasticidade – Teste de Cochran

O teste de Cochran determina se há uma diferença entre as variâncias de um grupo de amostras, utilizando a razão entre a maior variância e a soma de todas as variâncias das amostras (incluindo a maior). Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Teste de Cochran.

Linearidade	Área Epiclorigrina ($\mu\text{V sec}$)	Variância	Valor Calculado
40%	2.655781	0,0045	0,0136
	2.765313		
	2.644004		
80%	5.098710	0,0473	0,1439
	5.220411		
	4.797958		
100%	6.644299	0,0291	0,0885
	6.303123		
	6.471300		
120%	7.347512	0,0191	0,0581
	7.477308		
	7.201082		
160%	9.399598	0,0081	0,0247
	9.288471		
	9.467007		
200%	11.642920	0,0572	0,1740
	11.427628		
	11.165419		
240%	14.986804	0,1634	0,4972
	14.861499		
	14.232380		

Fonte: A autora (2019).

Conforme a Tabela 17, a maior variância obtida para epiclorigrina foi no nível de concentração de 240%, cujo valor foi de 0,1634. Ao dividir este valor pela soma de todas as variâncias (0,3287), obtidas pelos sete níveis das concentrações, obtém-se o valor 0,4972. Aplicou-se o teste de Cochran, considerando $K = 7$ e $n = 3$ ao nível de confiança de 95%, obteve-se o valor teórico (tabelado) de 0,5612.

Ao comparar o valor calculado 0,4972 com o valor tabelado 0,5612, verifica-se que o valor calculado é menor. Portanto, há homogeneidade entre as variâncias, garantindo assim, a homocedasticidade do método na faixa de concentração avaliada.

4.3 Precisão

Para Precisão do 1° e 2° dias, os resultados da repetibilidade estão apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Precisão 1° dia da epiclorigidrina.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação DPR (%)	
System Suitability	6,117873	1,8	3,8	$\leq 7,3$	
	5,753891	1,8			
	6,004604	1,9			
	5,892593	1,9			
	5,499194	1,8			
	5,712123	1,8			
Identificação	Massa (g)	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	DPR (%)	Especificação DPR (%)
Solução Teste	0,20090	0,000000	NA	NA	NA
	0,20051	0,000000			
	0,20050	0,000000			
Precisão 100%	0,20050	6,644299	NA	NA	NA
	0,20090	6,303123			
	0,20070	6,471300			
Precisão 40%	0,20090	2,655781	5,86	5,1	$\leq 11,0$
	0,20060	2,765313	6,46		
	0,20010	2,644004	6,04		
Precisão 120%	0,20010	7,347512	16,34	4,1	$\leq 7,3$
	0,20010	7,477308	17,56		
	0,20030	7,201082	16,42		
Precisão 240%	0,20080	14,986804	33,09	4,1	$\leq 7,3$
	0,20070	14,861499	34,69		
	0,20180	14,232380	31,98		

^a teor calculado experimental de Epiclorigidrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida nas soluções precisão, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 19 - Precisão 2° dia da epiclorigidrina.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação DPR (%)
System Suitability	4,863196	1,9	4,7	$\leq 7,3$
	4,691303	2,0		
	4,509937	2,0		
	4,654092	1,9		
	4,407648	1,9		
	4,261588	1,9		

Identificação	Massa (g)	Área ($\mu\text{V} \cdot \text{Sec}$)	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	DPR (%)	Especificação DPR (%)
Solução Teste	0,20255	0,000000	NA	NA	NA
	0,20268	0,000000			
	0,20052	0,000000			
Precisão 100%	0,20003	4,410833	NA	NA	NA
	0,20000	4,280335			
	0,20001	5,085445			
Precisão 40%	0,20001	1,616858	5,41	7,1	$\leq 11,0$
	0,20135	1,489250	5,06		
	0,20069	1,627067	4,69		
Precisão 120%	0,20071	5,038770	16,73	2,0	$\leq 7,3$
	0,20008	4,900869	16,87		
	0,20061	5,636935	16,25		
Precisão 240%	0,20048	9,995334	33,27	1,8	$\leq 7,3$
	0,20009	9,660890	33,26		
	0,20000	11,116539	32,24		

^a teor calculado experimental de Epiclorigidrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida nas soluções precisão, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Através dos resultados obtidos nas Tabelas 18 e 19, pode-se observar que todos os níveis se mostraram precisos, tanto no primeiro quanto no segundo dia da precisão.

Na Tabela 20 são apresentados os resultados da Precisão Intermediária (reprodutibilidade) quando comparados os resultados da Precisão 1° dia e Precisão 2° dia.

Tabela 20 - Precisão intermediária.

Identificação	Teor 1º dia ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	Teor 2º dia ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a	DPR (%)	Especificação (%)
Precisão 40 %	5,86	5,41	12	16
	6,46	5,06		
	6,04	4,69		
Precisão 120 %	16,34	16,73	3	11
	17,56	16,87		
	16,42	16,25		
Precisão 240 %	33,09	33,27	3	11
	34,69	33,26		
	31,98	32,24		

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida nas soluções precisão, em relação a massa de amostra Carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Observa-se que o método também é preciso quando aplicado à análise de precisão intermediária, ou seja, quando feitas comparações entre os resultados obtidos em dias distintos das análises de Epicloridrina realizada por analistas diferentes. Para as amostras de cada réplica as diferenças entre as médias dos dois dias de análise estão dentro do critério de aceitação estabelecido, portanto o método é considerado preciso.

4.4 Exatidão

Os resultados obtidos do parâmetro exatidão foram retirados da Linearidade/Precisão 1º dia.

Na Tabela 21 constam as porcentagens de recuperação obtidas na análise de exatidão da impureza orgânica epicloridrina.

Tabela 21 - Resultados da análise de exatidão da epicloridrina.

Identificação	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação DPR (%)
System Suitability	6,117873	1,8	3,8	$\leq 7,3$
	5,753891	1,8		
	6,004604	1,9		
	5,892593	1,9		
	5,499194	1,8		
	5,712123	1,8		

Identificação	Massa (g)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	Teor Teórico ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a	Teor Calc. ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Solução Teste	0,20090	0,000000	NA	NA	NA	NA	NA
	0,20051	0,000000					
	0,20050	0,000000					
Exatidão 100%	0,20050	6,644299	NA	NA	NA	NA	NA
	0,20090	6,303123					
	0,20070	6,471300					
Exatidão 40%	0,20090	2,655781	5,87	5,86	5,1	100	DPR $\leq 11,0$ e Recuperação 80-110
	0,20060	2,765313	5,88	6,46		110	
	0,20010	2,644004	5,90	6,04		102	
Exatidão 120%	0,20010	7,347512	17,69	16,34	4,1	92	DPR $\leq 7,3$ e Recuperação 80-110
	0,20010	7,477308	17,69	17,56		99	
	0,20030	7,201082	17,67	16,42		93	
Exatidão 240%	0,20080	14,986804	35,26	33,09	4,1	94	DPR $\leq 7,3$ e Recuperação 80-110
	0,20070	14,861499	35,28	34,69		98	
	0,20180	14,232380	35,08	31,98		91	

^a teor teórico de Epicloridrina (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) contida nas soluções exatidão, em relação a massa da amostra carvedilol matéria-prima pesada;

^b teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) contida nas soluções exatidão, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Observa-se na tabela 21, que todos os resultados da exatidão foram satisfatórios, visto que as quantidades recuperadas de epicloridrina e desvio padrão relativo entre as injeções estão dentro das faixas estabelecidas como critério de aceitação para cada concentração.

4.5 Limite de Quantificação (LQ)

Para o método estudado, foi considerado como LQ a menor concentração da curva de calibração (concentração de epicloridrina = 40% do limite da especificação),

visto que a concentração apresentou precisão e exatidão aceitáveis e sinal/ruído superior a 10.

Assim, o resultado do limite de quantificação teórico foi:

- $LQ_{\text{Epicloridrina}} = 5,90 \mu\text{g}$ de epicloridrina por grama de amostra de carvedilol na matéria-prima.

Tabela 22 - Resultado sinal/ruído do limite de quantificação.

Impureza Orgânica	Relação Sinal/Ruído			Especificação
	1ª injeção	2ª injeção	3ª injeção	
Epicloridrina	17,27	15,75	13,90	> 10

Fonte: A autora (2019).

4.6 Faixa de Trabalho

Para a faixa de trabalho da metodologia validada foi considerado o intervalo dentro da faixa de concentração de 40 a 240% para a Epicloridrina na matéria-prima de carvedilol, apresentando-se linear, preciso e exato, nesta faixa.

4.7 Robustez

Os resultados encontrados na robustez são apresentados nas Tabelas 23 a 34.

4.7.1 Variação do lote da coluna cromatográfica

A alteração da coluna foi realizada alterando o lote da coluna original. A coluna testada foi a do fabricante Agilent, DB-WAXETR (G16) 30,0 m x 0,53 mm x 2,0 μm . Os resultados são apresentados nas Tabelas 23 a 25.

Tabela 23 - Resultados da robustez sem alteração no método.

Identificação	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	5,036694	2,0	5,0	$\leq 7,3$
	5,413233	1,8		
	5,173966	1,9		
	5,249400	1,9		
	4,737393	1,8		
	4,848405	1,9		
Epícloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	0,0000	4,575146	6,256526	10,81
Massa (mg)	200,13	200,13	200,70	

^ateor calculado experimental de Epícloridrina (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 24 - Resultados da robustez com alteração do lote da coluna cromatográfica.

Identificação	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	5,675274	2,3	4,4	$\leq 7,3$
	5,559453	2,0		
	5,163220	2,2		
	5,144417	2,5		
	5,129889	2,4		
	5,264196	2,3		
Epícloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	0,0000	4,687179	6,071529	11,34
Massa (mg)	200,45	200,44	200,13	

^ateor calculado experimental de Epícloridrina (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 25 - Resultados da robustez com alteração do lote da coluna cromatográfica.

Impureza orgânica	Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a Coluna original do método	Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a Alteração coluna	Recuperação (%)	Especificação (%)
Epícloridrina	10,81	11,34	105	80 - 110

^ateor calculado experimental de Epícloridrina (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Através da análise de recuperação, verifica-se que a alteração do lote da coluna cromatográfica é robusta para o método, pois o resultado ficou dentro da especificação.

4.7.2 Variação no sistema cromatográfico

4.7.2.1 Variação da temperatura inicial do forno da coluna

Nesse parâmetro foi alterada a temperatura inicial do forno da coluna de 90°C para 88°C e 92°C. Os resultados são apresentados nas Tabelas 26 a 30.

Tabela 26 - Resultados da robustez sem alteração no método.

Identificação	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	6,163326	2,2	3,7	$\leq 7,3$
	5,880813	2,2		
	5,915256	2,2		
	5,970612	2,3		
	5,579290	2,1		
	5,640604	2,1		

Epicloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V Sec}$)	0,0000	5,104219	6,253604	11,97
Massa (mg)	200,49	200,60	200,12	

^ateor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 27 - Resultados da robustez com alteração na temperatura inicial do forno para 88°C.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	4,581493	6,1	3,2	$\leq 7,3$
	4,407542	5,6		
	4,466524	5,5		
	4,554721	6,0		
	4,680539	5,8		
	4,273387	6,1		
Epicloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V Sec}$)	0,0000	3,278806	4,422429	10,96
Massa (mg)	200,25	200,18	200,85	

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 28 - Recuperação dos teores para alteração na temperatura de forno para 88°C.

Impureza orgânica	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a Forno 90°C	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a Forno 88°C	Recuperação (%)	Especificação (%)
Epicloridrina	11,97	10,96	92	80 - 110

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 29 - Resultados da robustez com alteração na temperatura inicial do forno para 92°C.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	4,363139	2,0	3,8	$\leq 7,3$
	4,089821	2,0		
	3,995722	2,1		
	4,189702	2,0		
	3,914906	2,1		
	4,151370	2,1		
Epicloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V Sec}$)	0,0000	3,171084	4,160969	11,27
Massa (mg)	200,18	200,19	200,90	

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 30 - Recuperação dos teores para alteração na temperatura de forno para 92°C.

Impureza orgânica	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$)^a Forno 90°C	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$)^a Forno 92°C	Recuperação (%)	Especificação (%)
Epicloridrina	11,97	11,27	94	80 - 110

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Para a alteração no parâmetro de temperatura inicial do forno, pode-se observar que o resultado da recuperação de epicloridrina ficou dentro da especificação. Portanto, o método proposto é robusto para mudança de temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$) em relação ao método original.

4.7.2.2 Variação do fluxo do gás de arraste.

A alteração na variação do fluxo do gás de arraste foi de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ para $3,8 \text{ mL min}^{-1}$ e $4,2 \text{ mL min}^{-1}$. Os resultados são apresentados nas Tabelas 31 a 35.

Tabela 31 - Resultados da robustez sem alteração no método.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	5,651356	2,0	5,1	$\leq 7,3$
	5,646857	2,2		
	5,388025	2,0		
	5,142683	2,0		
	5,223681	2,1		
	4,977446	2,0		
Epicloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$)^a
Área ($\mu\text{V Sec}$)	0,0000	5,154982	6,302310	12,06
Massa (mg)	200,29	200,16	200,31	

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 32 - Resultados da robustez com alteração no fluxo do gás de arraste para 3,8 mL min⁻¹.

Identificação	Área (µV Sec)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	4,032817	2,1	6,8	≤ 7,3
	3,933325	2,2		
	3,773503	2,1		
	3,550013	2,3		
	3,470573	2,1		
	3,435549	2,1		

Epicloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado (µg g ⁻¹) ^a
Área (µV.Sec)	0,0000	3,752341	4,948528	11,20
Massa (mg)	200,29	200,02	200,75	

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em µg g⁻¹) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 33 - Recuperação dos teores para alteração no fluxo do gás de arraste para 3,8 mL min⁻¹.

Impureza orgânica	Teor (µg g ⁻¹) ^a Fluxo original	Teor (µg.g ⁻¹) ^a Fluxo 3,8 mL min ⁻¹	Recuperação (%)	Especificação (%)
Epicloridrina	12,06	11,20	93	80 - 110

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em µg g⁻¹) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 34 - Resultados da robustez com alteração no fluxo do gás de arraste para 4,2 mL min⁻¹.

Identificação	Área (µV.Sec)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	4,818519	2,1	5,3	≤ 7,3
	4,396286	2,1		
	4,366600	2,2		
	4,138445	2,2		
	4,274167	2,1		
	4,284694	2,1		

Epicloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado (µg g ⁻¹) ^a
Área (µV.Sec)	0,0000	4,368070	5,584170	11,57
Massa (mg)	200,24	200,07	200,77	

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em µg g⁻¹) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 35 - Recuperação dos teores para alteração no fluxo do gás de arraste para 4,2 mL min⁻¹.

Impureza orgânica	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a Fluxo original	Teor ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^a Fluxo 4,2 mL min ⁻¹	Recuperação (%)	Especificação (%)
Epicloridrina	12,06	11,57	96	80 - 110

^a teor calculado experimental de Epicloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Após avaliação da recuperação dos teores para mudança de fluxo do gás de arraste, em comparação com a robustez do método sem alteração do método, verificou-se que a alteração ficou dentro das especificações. Dessa forma, o método é robusto para alteração de velocidade de gás de arraste ($\pm 0,2$ mL min⁻¹).

4.7.3 Estabilidade das soluções analíticas.

O ensaio de estabilidade das soluções foi realizado para simular as situações encontradas na rotina laboratorial, em que as amostras são armazenadas ao abrigo de luz e temperatura ambiente em *vials* acondicionados na *rack* do equipamento. Assim, foi determinado em qual período os analitos de interesse sofreram redução significativa em áreas. A avaliação da estabilidade das soluções analíticas foi realizada pela comparação dos resultados das amostras analisadas no momento do preparo, frente as amostras armazenadas sob condição ambiente no laboratório por aproximadamente 29 horas. Os resultados são apresentados nas Tabelas 36 a 38.

Tabela 36 - Resultados das soluções injetadas após o preparo.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	4,954145	1,8	4,1	$\leq 7,3$
	5,005285	1,8		
	4,627939	1,8		
	4,789817	1,9		
	4,642514	1,7		
	4,519128	1,9		
Epícloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V Sec}$)	0,0000	4,714333	6,088821	11,40
Massa (mg)	200,44	203,04	205,82	

^a teor calculado experimental de Epícloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 37 - Resultados das amostras injetadas aproximadamente 29 horas após o preparo.

Identificação	Área ($\mu\text{V Sec}$)	Resolução	DPR (%)	Especificação
System Suitability	3,579033	5,2	2,6	$\leq 7,3$
	3,513442	5,1		
	3,484426	2,0		
	3,512445	5,1		
	3,307814	5,2		
	3,509284	2,1		
Epícloridrina	Solução Teste	Amostra 80%	Amostra 100%	Teor Calculado ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a
Área ($\mu\text{V Sec}$)	0,0000	2,971394	3,661262	11,97
Massa (mg)	200,76	200,30	200,51	

^a teor calculado experimental de Epícloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Tabela 38 - Recuperação dos teores das amostras injetadas aproximadamente 29 horas após o preparo.

Impureza orgânica	Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^a Amostras injetadas logo após o preparo	Teor ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^a Amostras injetadas 29 horas após o preparo	Recuperação (%)	Especificação (%)
Epícloridrina	11,40	11,97	105	80 - 110

^a teor calculado experimental de Epícloridrina (em $\mu\text{g g}^{-1}$) contida na solução 80%, em relação a massa de amostra carvedilol matéria-prima pesada.

Fonte: A autora (2019).

Nos resultados do teor, apresentados nas Tabelas 36, 37 e 38, no período de aproximadamente 29 horas após a injeção da primeira amostra, foi possível observar que a recuperação se manteve dentro da especificação. Porém, também foi possível observar um decaimento das áreas da epicloridrina, que podem indicar possível degradação da impureza, influenciando negativamente nos resultados da liberação da matéria-prima no controle de qualidade. Desse forma, preferiu-se incluir no método analítico a observação, para que as amostras sejam injetadas logo após o preparo, evitando assim, problemas na liberação da matéria-prima do carvedilol.

5 CONCLUSÃO

Após a realização de todos os parâmetros da validação analítica, o método proposto para o controle da impureza orgânica epicloridrina por cromatografia gasosa com detecção por FID e injeção *headspace* na matéria-prima carvedilol, apresentou-se específico, não havendo interferência de outras substâncias voláteis. O método mostrou ser linear, preciso, exato e robusto nas faixas de concentração propostas, comprovando assim, que o método utilizado é adequado para a finalidade proposta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Impurities in New Drug Substances Q3A(R2)**, 2006.
- [2] AHUJA, S.S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Advanced drug delivery reviews**, v.59, n.1, p.3-11, 2007.
- [3] BUENO, L.M. **Desenvolvimento de Método Analítico para Avaliação de Impurezas Orgânicas de Ticagrelor**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- [4] SCHUHMACHER, R.; NURMI-LEGAT, J.; OBERHAU, A.; KAINZ, M.; KRŠKA, R. **A Rapid and Sensitive GC–MS Method for Determination of 1,3-dichloro-2-propanol in Water**. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 p. 366–371, 2005.
- [5] MUELLER, T.W.; FISCHER, S.A. **Determination of Organic Chloride Impurities in Polyaminoamide-Epichlorohydrin Resins by Gas Chromatography**. *Tappi J.* 75 p.159–162, 1992.
- [6] LOFFE, B.V.; VITENBERG, A.G. **Head-Space Analysis and Related Methods in Gas Chromatography**. Wiley, New York, 1984.
- [7] KOLB, B.; ETTRE, L.S. **Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice**. John Wiley & Sons Inc., 2006.
- [8] STAFYLAS, P.C; SARAFIDIS, P.A. **Health Risk Manag.** *Vas* 4, 23. 2008.
- [9] GENARO, A.R. **The Science and Practice of Pharmacy**, 20 ed. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2000.
- [10] LANZANOVA, F.A. **Carvedilol – Estudos de Estabilidade e Perfil de Dissolução**. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2007.

- [11] BRISTOW, M.R. et al. **Effects of Carvedilol on Adrenergic Receptor Pharmacology in Human Ventricular Myocardium and Lymphocytes**. *Clinical Investigation*, v.70, n.1, p. 105-113, 1992.
- [12] BROPHY, J.M.; JOSEPH, L.; ROULEAU, J.L. **Ann, Int Med**, 134, 550. 2001.
- [13] HIRLEKAR, R.; KADAM, V. J. **Incl Phenom. Macrocycl. Chem**, 63, 219. 2009.
- [14] FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2019.
- [15] CHIAMULERA, P. **Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico de Produto de Degradação para Aceclofenaco Comprimidos Baseado na Abordagem “Quality by Design”**. Monografia (Pós- Graduação em Gestão e Experimentação Laboratorial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.
- [16] Ficha de informação de produto químico – Epicloridrina. USP - Universidade de São Paulo. Disponível em <http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Epicloridrina.pdf>. Acesso em 08/10/2018.
- [17] GIRI, A.K. **Genetic Toxicology of Epichlorohydrin: A review**. *Mutation Research* 386, 25-38. 1997.
- [18] ALONSO, T.V. **Estudo da Reação de Formação de Adutos Gerados por Resina Epóxi e Polialquileno Glicóis**. Monografia (Metrado em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2013.
- [19] KREMNEVA, S.N.; TOLGSKAJA, M.S. **The toxicology of epichlorohydrin**. *Toksikol Nov. Prom. Khim. Veshchestv*, 2, 28–41. 1961.
- [20] BARBONE, F., DELZELL, E.; AUSTIN, H.; COLE, P. **A Case Control Study of Lung Cancer at a Dye and Resin Manufacturing Plant**. *Am. J. Industr. Med.*, 22, 835–849. 1992.

- [21] BARBONE, F., DELZELL, E.; AUSTIN, H.; COLE, P. **Exposure to Epichlorohydrin and Central Nervous System Neoplasms at a Resin and Dye Manufacturing Plant.** Arch. Environ. Health, 49, 355–358. 1994.
- [22] MANSON, M.M. **Epoxides - Is there a human health problem?** Br. J. Indust. Med., 37, 317–336. 1980.
- [23] LODA, C. et al. **Determination of Epichlorohydrin in Active Pharmaceutical Ingredients by Gas Chromatography- Mass Spectrometry.** Organic Process Research & Development, v.15, p.1388-1391, 2011.
- [24] TAO, Z.Y.; CHAI, X.S.; WU, S.B. **Determination of Epichlorohydrin and 1,3-dichloro-2-propanol in Synthesis of Cationic Etherifying Reagent by Headspace Gas Chromatography.** Journal of Chromatography A, 1218, p. 6518-6521, 2011.
- [25] YAN,N. et al. **Determination chlorinated volatile organic compounds in polyamine epichlorohydrin solution by headspace gas chromatography.** Journal of Chromatography A, 1496, p. 163-166, 2017.
- [26] ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Impurities in New Drug Substances Q3A(R2)**, 2006.
- [27] TANKIEWICZ, M.; NAMIESNIK, J.; SAWICKI, W. **Analytical procedures for quality control of pharmaceuticals in terms of residual solvents content: Challenges and recent developments.** Trends in Analytical Chemistry, 80, p. 328-344, 2016.
- [28] ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R6)**, 2016.
- [29] OTERO, R. et al. **Static Headspace Gas Chromatographic Method for Quantitative Determination of Residual Solvents in Pharmaceutical Drug**

Substances According to European Pharmacopeian Requirements. Journal of Chromatography A. Vol. 1057. 2004.

[30] DE SOUZA, T.H. **Uma revisão sobre o arcabouço legal para o controle de impurezas em produtos farmacêuticos registrados no Brasil.** Monografia (Pós-Graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas), Fundação Oswaldo Cruz Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos/CTM, 2015.

[31] SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.T. **Fundamentos de Química Analítica.** 9.ed. São Paulo: Centage Learning, p.879- 891. 2014.

[32] LANÇAS, F.M. **Cromatografia em Fase Gasosa.** São Carlos – SP: Acta, p. 254. 1993.

[33] ARGENTON,A. **Curso de Cromatografia a Gás.** Conceito de Cromatografia a Gás- Minicurso CRQ- IV, 2010.

[34] GROBÉRIO, T.S. **Desenvolvimento de uma metodologia para comparação de amostras de sal de cocaína pela determinação de solventes residuais e análise quimiométrica.** Monografia (Mestrado em Química), Universidade de Brasília – Instituto de Química, 2012.

[35] ZHENG, J.; HUANG, C.; WANG, SIMON. **Challenging Pharmaceutical Analyses by Gas Chromatography with Vacuum Ultraviolet Detection.** Journal of Chromatography A, 1567, 185-190. 2018.

[36] CORRÊA, C.L.; PEDROSO, R.C. **Headspace Gas Chromatography with Capillary Column for Urine Alcohol Determination.** Journal of Chromatography B, v. 704, p. 365- 368. 1997.

[37] LANÇAS, F.M. **Cromatografia em Fase Gasosa.** São Carlos – SP: Acta, p. 254. 1993.

[38] DEL GRANDE, A. **Cromatografia Gasosa Princípios Básicos.** SINC do Brasil.

[39] TERESA CRISTINA EPIFÂNIO DIÓGENES REGO. **Avaliação de um Método de Cromatografia em Fase Gasosa – Headspace e Estudo da Estabilidade do Etanol em Amostras de Sangue.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

[40] TONIOLO, M.R. **Verificação Farmacopeica de Metodologia Analítica de Doseamento de Bisoprolol Comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** Monografia (Pós Graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas), Fundação Oswaldo Cruz – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos/CTM, 2016.

[41] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução RDC nº166, Brasília, 24 de julho de 2017.