



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

LUCAS HENRIQUE DOS SANTOS LOPES

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE SECNIDAZOL VIA DOE**

TOLEDO  
2021

LUCAS HENRIQUE DOS SANTOS LOPES

## OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DE SECNIDAZOL VIA DOE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Viviane da Silva Lobo

TOLEDO  
2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

LUCAS HENRIQUE DOS SANTOS LOPES

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMNETODE SECNIDAZOL VIA DOE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Banca examinadora

---

Prof. Dra Viviane da Silva Lobo  
UTFPR, Câmpus Toledo  
Orientador

---

Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa  
UNIOESTE, Câmpus Toledo  
Avaliador

---

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara  
UTFPR, Câmpus Toledo  
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

## RESUMO

O presente trabalho é de suma importância para a otimização de métodos de análise de fármacos, pois, com a aplicação de novas ferramentas de trabalho, como o *Design of Experiments* (DOE), será capaz de evoluir cada vez mais a qualidade dos projetos, e, paralelo a isso, diminuir a repetibilidade de análise de produtos novos e em uso atualmente. Este trabalho será desenvolvido com o embasamento de um método vigente de secnidazol. Com objetivo de otimizar o método de doseamento de secnidazol matéria-prima que é validado e utilizado atualmente. Para o desenvolvimento deste projeto foi utilizado a técnica de cromatografia líquida e de análise de estatística matemática, como principal meio de tratamento de dados. Sendo assim, após ser testado o método vigente em um cromatógrafo de alta performance (HPLC), esse foi transposto para um cromatógrafo de ultra performance (UPLC), cumprindo com a especificação de segurança do equipamento em questão. Foram utilizados os resultados adquiridos anteriormente para que se possa ter uma fundamentação teórica e assertiva no teste proposto, para que o objetivo seja alcançado com maior eficiência e qualidade. Após adquirir os dados desejados no trabalho, foram realizadas análises para garantir a repetibilidade e robustez do método desenvolvido no trabalho para que possa ser reproduzido pela indústria. Ao final, pode-se observar que a aplicação da metodologia DOE foi apta para a análise do secnidazol, utilizando UPLC.

Palavra-chave: Princípio ativo; Cromatografia; Eficiência; Quantificação.

## ABSTRACT

The present work is of paramount importance for the optimization of drug analysis methods, as, with the application of new work tools, such as the Design of Experiments (DOE), it will be able to increasingly evolve the quality of projects, and, parallel to this, decrease the repeatability of the analysis of new and currently used products. This work will be developed based on an existing method of secnidazole. Aiming at optimizing the raw material secnidazole dosing method that is currently validated and used. For the development of this project, the technique of liquid chromatography and mathematical statistical analysis was used as the main means of data processing. Therefore, after testing the current method in a high-performance chromatograph (HPLC), it was transferred to an ultra-performance chromatograph (UPLC), complying with the safety specification of the equipment in question. The previously acquired results were used to provide a theoretical and assertive foundation for the proposed test, so that the objective is achieved with greater efficiency and quality. After acquiring the desired data in the work, analyzes were carried out to ensure the repeatability and robustness of the method developed in the work so that it can be reproduced by the industry. At the end, it can be seen that the application of the DOE methodology was suitable for the analysis of secnidazole, using UPLC.

Keyword: Active ingredient; Chromatography; Efficiency; Quantification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 - Estrutura química do secnidazol.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 2 - Matriz de Trabalho .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3 - Resumo dos Resultados.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4 - Perfil cromatográfico de secnidazol (HPLC).....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5 - Perfil cromatográfico de secnidazol (UPLC).....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 6 – Gráfico de resultados obtidos na robustez. ....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 7 - Gráfico de Análise comparativa.....</b>	<b>26</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Especificação para avaliação da repetibilidade no ensaio de doseamento ...</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 2 – Especificação para avaliação da precisão intermediária .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 3 – Especificação para exatidão de doseamento.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 4 – Fatores avaliados na robustez do método.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 5 – Resultados obtidos na linearidade de secnidazol .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 6 – Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 7 – Resultados de exatidão para a quantificação de secnidazol.....</b>	<b>25</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DoE Design of Experiments  
HPLC High performance liquid chromatography  
UPLC Ultra performance liquid chromatography  
QbD Quality by Design



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	11
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	11
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	12
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1. INTRODUÇÃO

O principal objetivo da indústria farmacêutica é fornecer medicamentos com qualidade, eficácia e segurança, quando se fala de desenvolvimento de um medicamento e sua produção consiste de muitos processos farmacêuticos, incluindo testes analítico onde são gerados dados que apoiam outras decisões, sobre como o desenvolvimento deve proceder ou até mesmo fornecer informações para saber se o fármaco pode ser ou não comercializado. É importante que cada uma dessas etapas de desenvolvimento ou produção forneçam credibilidade e qualidade constante portanto, o processo precisa ser controlado e se necessário continuamente melhorado(TOME et al., 2019)

Para superar algumas limitações no desenvolvimento analítico o planejamento experimental (Design of experiments - DoE) pode fornecer melhores resultados com testes mais objetivos. O planejamento experimental é um conjunto de ferramentas estatísticas que incluem triagem, *designs* e projetos de otimização (BEZERRA et al., 2008).

Planejamento experimental é um componente importante na indústria farmacêutica junto com qualidade por *design* analítico. Na abordagem do planejamento experimental, os fatores de entrada controlados, são variáveis sistematicamente para determinar seus efeitos sobre respostas de saída, o que permite os fatores mais importantes de entrada, a identificação da configuração de entrada que são fatores que levam a respostas de saída otimizada e a elucidação das interações entre os fatores de entrada (FUKUDA et al., 2018).

Os experimentos fatoriais completos de dois níveis são os experimentos de triagem mais poderosos, uma vez que permitem estimar os efeitos principais dos fatores de entrada suas interações nas respostas de saída. As principais limitações dos experimentos fatoriais completos de dois níveis dependem do grande número de experimentos necessário, quando comparados aos experimentos fatoriais fracionados. O número necessário para experimentos fatoriais completo pode ser calculado como  $2^k$ , onde K e o número de entrada para fatores a serem estudados. (BEZERRA et al., 2008)

Sendo assim o presente trabalho fornece condição teóricas e práticas para implementação de planejamento experimental em produtos farmacêuticos e / ou qualidade analítica por *design* (QbD) (FUKUDA et al., 2018)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- ✓ O presente trabalho tem como objetivo otimizar método de doseamento utilizado para Secnidazol.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver uma metodologia analítica para quantificação de Secnidazol;
- ✓ Aplicar o tratamento de estatística de (Design of Experiments DoE);
- ✓ Migrar de uma metodologia de Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para Cromatografia líquida de ultra performance (UPLC);

### **3. JUSTIFICATIVA**

Otimizar um método que é vigente nos dias atuais é de grande importância para o desenvolvimento das indústrias pois, somente assim, consegue obter resultados melhores em relação de gastos, produção e qualidade.

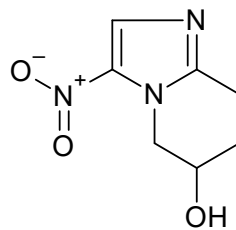
Quando se trabalha com um método que utiliza o UPLC pode-se adquirir resultados com menor tempo de análise pois, essa técnica promove uma faixa maior nas condições de pressão do equipamento, visto que também apresenta colunas com especificações e tecnologias diversas como o tamanho de partículas, sendo umas das principais. Para uma farmacêutica, que é o caso em questão, conseguir utilizar um método capaz de aumentar a produtividade e diminuir o custo financeiro do projeto e de suma importância para indústria, entretanto, estar disponível em maior quantidade, e podendo diminuir custo do fármaco para ser adquirido comercialmente e essencial a população.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Secnidazol

O secnidazol é um antimicrobiano, derivado do nitroimidazol conhecido como 1-(2-metil-5-nitro-1-imidazolil) -2-propanol (FIGURA 1). É considerado um ativo de segunda geração sendo estruturalmente relacionado a outros nitroimidazóis incluindo metronidazol e tinidazol. Apresenta melhor absorção oral e maior meia-vida que outros agentes antimicrobianos desta classe e é seletivo contra muitas bactérias anaeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas, além de também ser seletivo contra protozoários.

**Figura 1 - Estrutura química do secnidazol**



**Fonte: Maestrello (2020)**

Em setembro de 2017, A U.S. Food and Drug Administration (FDA) concedeu aprovação para o uso do Secnidazol, sob o nome comercial Solosec®, como um tratamento oral de dose única para vaginose bacteriana, infecção comum em mulheres de 15 a 44 anos normalmente causada por *Gardnerella vaginalis*. Este medicamento também é indicado para o tratamento de amebíase intestinal, amebíase hepática, giardíase e tricomoníase (PENG et al., 2019.; FLICK et al., 2019.; MAESTRELO; LUANA, 2020)

Apesar de não existir monografia farmacopeica para o secnidazol, existe para outros compostos da classe dos nitroimidazóis, como ornidazol, metronidazol e tinidazol. Com base no método descrito na farmacopeia americana para o metronidazol (USP, 2016), a coluna cromatográfica foi otimizada envolvendo estudos relacionados com a alteração das dimensões e fase estacionária de forma a proporcionar a completa separação entre todos os analitos de interesse e com baixos tempos de retenção, favorecendo análise rápida para ser aplicada na rotina. (MAESTRELO, LUANA, 2020)

## 4.2 Design de experimentos (DOE)

O planejamento experimental (Design de Experimentos - DoE) é uma abordagem sistemática que usa ferramentas estatísticas para projetar experimentos e modelagem matemática. No projeto experimental, um ou mais fatores são simultaneamente variados, para estudar os efeitos desses fatores suas interações em uma resposta particular. A relação fator-resposta é descrito por um modelo matemático montado a partir de um conjunto de equação polinomiais de uma determinada ordem. Aplicar DoE é uma maneira eficiente de identificar e otimizar fatores significativos com um número minimizado de experimentos. Na verdade, os dados gerados com DoE são apoiados por evidências científicas simples e experiências empíricas e fornece uma melhor compreensão da relação fator-resposta (TOME et al., 2019)

O desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida é baseado em modelos teóricos. Além de modelos empíricos, onde o método em desenvolvimento é baseado em dados experimentais com o uso de modelagem matemática e estatística, uma alternativa para o desenvolvimento de métodos avançados que pode ser aplicada. A principal vantagem para a aplicação, que é a capacidade de prever um cromatograma para um conjunto aleatório de cromatogramas e parâmetros. Assim, quando os parâmetros de HPLC investigados por exemplo, composição de fase móvel, pH da fase móvel, coluna, temperatura e tempo de gradiente são alterados simultaneamente, o *software* prevê movimentos de picos e simula o cromatograma correspondente. Além disso, relativamente um pequeno número de experimentos são necessários para a simulação da maioria das separações adequada entre picos cromatográficos (TOME et al., 2019)

## 4.3 Otimização de métodos

No início do desenvolvimento do método, uma revisão de literatura geralmente inclui monografias de farmacopeias internacionais. A adoção de um método farmacopeico certamente economiza tempo e recurso que seriam gastos no desenvolvimento, e os benefícios também devem ser vistos em um funcionamento confiável e um desempenho de um método para finalidade pretendida. Porém, muitos métodos farmacopeicos que foram desenvolvidos dez ou mais anos atrás pode hoje ser considerado obsoleto. Sistemas analíticos avançados e novas fases estacionárias com partículas sub-2 µm podem oferecer tempos de execução de análise dez vezes mais curtos, ao mesmo tempo alcançar menor tempo de separação.(TOME et al., 2019)

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Equipamentos**

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Acquity Hclass Waters. A coluna cromatográfica utilizada Acquity UPLC BEH C-8 (Waters, EUA), 50mm de dimensão, 2.1 mm de diâmetro, 1.7µm de tamanho de partícula. Também foi utilizado aparelhos de ultrassom modelo Elmasonic P (Elma Alemanha) balança analítica modelo excellence plus XP26(Mettler Toledo, Brasil) e sistema de purificação de água modelo Elix Technology Inside Integral 5 (Merck, Alemanha).

### **5.2 Soluções e amostras**

O 1-(hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (Secnidazol) SimSom (India), lote SP-029-0988, foi utilizado como como minha solução padrão de referência, apresentando validade até 09/2022. A matéria-prima de Secnidazol foi utiliza para o preparo de solução teste cujo o, lote 8007597, validade 05/2022, foi fabricada e fornecida pela Aarti Drugs Limited. E solventes empregados para o preparo das soluções como fase móvel e diluente foram, metanol (Bio Grade) grau HPLC; Água ultrapura.

### **5.3 Parâmetros cromatográficos**

A escolha da fase móvel foi realizada através da mistura de solventes constituídos por água ultrapura e metanol v/v (80:20 v/v), e utilizando a própria fase móvel como diluente para solubilizar as amostras. As soluções das amostras e de estoque foram preparadas no momento da sua utilização. As condições de operação foram vazão de 0,40 mL min<sup>-1</sup>, tempo de corrida de 5 min e detecção no UV em 319 nm.

### **5.4 Preparo de amostras**

Para o preparo de solução padrão 1e 2 foi transferido 5 mg de padrão de secnidazol para um balão volumétrico de 10 mL, e adicionado 5 mL de diluente, foi levado ao ultrassom por 10

minutos. Em seguida, completado o volume com diluente e homogeneizado, filtrado em membrana PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  com descarte de 2 mL, obtendo  $[\text{Secnidazol}] = 500 \mu\text{g mL}^{-1}$

Para o preparo da amostra foi pesado 25 mg da matéria prima de Secnidazol para um balão volumétrico 50 mL. Adicionado 40 mL de diluente e levado ao ultrassom por 10 minutos. Em seguida, completado o volume com diluente, e homogeneizado, filtrado em membrana PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  com descarte de 2mL. Concentração final obtida foi de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.5 Avaliação da adequabilidade do sistema

Após a estabilização do sistema cromatográfico foram seguidos os seguintes critérios:

- Injetado cinco vezes a solução padrão de doseamento 1
- O número de pratos teóricos (N) para o pico de secnidazol não deve ser inferior a 2000.
- O fator de cauda (Fc) para o pico de secnidazol não deve ser inferior a 0,8 nem superior a 2,0.
- O desvio padrão relativo ( $DPR_{inj}$ ) das áreas do pico de secnidazol não deve ser superior a 2,0%.
- Injetado uma vez a solução padrão de doseamento 2
- A recuperação da Solução Padrão Doseamento 2 deve estar entre 98 e 102% em relação a Solução Padrão Doseamento 1.

Caso os critérios estabelecidos acima forem atendidos, o sistema foi considerado apto e deve-se prosseguir com a etapa de Quantificação.

### 5.6 Avaliação da solução controle

Para verificar se o sistema permaneceu estável

- Injetado uma vez a Solução padrão 1 como controle
  - Calcular os fatores resposta do Secnidazol nas Soluções padrão doseamento 1 ( $FRC_1$ ).

A recuperação da Solução Controle deve estar entre 98 e 102 % em relação a média das cinco injeções da Solução Padrão Teor 1.

- O número de pratos teóricos (N) para o pico do Secnidazol não deve ser inferior a 2000.



- O fator de cauda (Fc) para o pico do Secnidazol não deve ser inferior a 0,8 nem superior a 2,0.

## 5.7 Especificações do doseamento da amostra

Para identificação o espectro de absorção no UV/Vis da solução amostra corresponde ao espectro da solução padrão conforme teste de doseamento.

Para o doseamento o teor de secnidazol deve conter de 98,00 a 102,00% calculado em base anidra, ou de 93,10 a 102,00 %, em matéria ativa, os resultados devem estar de acordo com os critérios de aceitação que são estabelecidos pela *Association of Official Agricultural Chemist* (PAEZ et al., 2016)

### 5.7.1 Linearidade

A linearidade foi verificada através da análise de uma curva analítica com 5 níveis e com 3 réplicas em cada nível compreendendo o intervalo de 80,0 % a 120,0 % da concentração nominal limite da solução teste ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) abrangendo, desta forma, o intervalo de concentração de 400 a  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Secnidazol para a finalidade de doseamento.

Para o preparo da solução estoque de secnidazol (triplicata), foi adicionado 25 mg de secnidazol para balão volumétrico de 10 mL. Adicionado cerca de 8 mL de diluente e levado ao ultrassom por 10 minutos. Em seguida completado com diluente e homogeneizado. A concentração final obtida foi de  $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;

Após ser traçado um gráfico com as áreas do pico de secnidazol no eixo y, e concentração do secnidazol nas soluções no eixo x. Foi avaliado visualmente se os dados apresentam relação linear aparente.

Em seguida foi realizado a regressão linear da curva analítica através do método por mínimos quadrados ordinários e avaliado o coeficiente angular da reta; coeficiente linear da reta, coeficiente de correlação.

Como método de estatística foi utilizado o *software excel* para a análise de variância para a regressão linear (ANOVA) com nível de significância de 5%. E traçado um gráfico com os resíduos padronizados. Para os critérios de aceitação, foram adotados os seguintes parâmetros para avaliar a linearidade. Para análise de variância (ANOVA) deve indicar que o

coeficiente angular da reta deve ser significativamente diferente de zero e o coeficiente linear da reta não deve ser significativamente diferente de zero.

### 5.7.2 Precisão

Para análise de precisão foi verificado por meio de seis determinações a 100 % da concentração da solução teste amostra ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para obter o resultado da precisão intermediária foi realizado uma nova análise de precisão no mesmo laboratório, em um segundo dia e preparado por analista diferente.

Após realizar análise deve-se avaliar a precisão com os seguintes parâmetros o teor de secnidazol nas seis soluções teste, calcular o desvio padrão relativo (DPR) dos teores dos seis preparos. Para avaliação da precisão intermediária foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) dos doze preparos (seis preparos do primeiro dia e os mais seis do segundo dia) de cada nível.

Critério de aceitação para a precisão os desvios padrões de relativos (DPR) entre os seis preparos para repetibilidade deve estar de acordo com os valores apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1 - Especificação para a avaliação da repetibilidade no ensaio de Doseamento.**

Nível (%)	DPR (%)
100	1,3

FONTE: PAEZ et al., 2016.

O desvio padrão relativos (DPR) entre os doze preparos para precisão intermediária, devem estar de acordo com os valores apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2 - Especificação para a avaliação da precisão intermediária.**

Nível (%)	DPR (%)
100	2

FONTE: PAEZ et al., 2016.

### 5.7.3 Exatidão

A exatidão da metodologia analítica foi verificada por meio de nove determinações contemplando os níveis, baixo, médio e alto respectivamente (80 %; 100 % e 120 %), compreendendo o intervalo analítico para o ensaio de doseamento.

Após serem preparadas as amostras em seus determinados níveis, foram injetadas conforme o procedimento analítico e calculado o teor da solução das nove amostras. Onde verificou-se o teor obtido e o teor teórico nas nove soluções amostra, em seguida avaliado a média das recuperações de cada nível e por último avaliado do desvio padrão relativo (DPR) obtido em cada um dos níveis

Para os critérios de aceitação a média das recuperações de um mesmo nível e o desvio padrão relativo (DPR) entre as três replicatas do mesmo nível devem estar de acordo com os valores apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3 - Especificação para a exatidão de doseamento.**

Nível (%)	DPR (%)	Recuperação (%)
80		
100	1,3	98 – 102
120		

FONTE: PAEZ et al., 2016.

A faixa de trabalho para a metodologia analítica foi estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados dentro da faixa de 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de secnidazol para doseamento.

#### 5.7.4 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de variações deliberadas nos fatores considerados críticos para quantificação de secnidazol: proporção entre fase orgânica e aquosa na fase móvel, temperatura da coluna, fluxo da fase móvel, tempo de ultrassom e membrana filtrante empregados na preparação da amostra, entre outros. As amostras foram preparadas conforme descrito no preparo das amostras empregando as variações apresentadas na Tabela 4.

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

<i>Fatores</i>	<i>Nominal</i>	<i>Varição I</i>	<i>Varição II</i>
Tempo de ultrassom	10 minutos	5 minutos	15 minutos
Membrana filtrante	Centrifugação	PVDF 0,45 $\mu\text{m}$	PTFE 0,45 $\mu\text{m}$
Fluxo da Fase móvel	0,45 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0,25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0,65 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Temperatura da coluna	30 ° C	28 ° C	32 ° C
Composição da Fase móvel (MeOH:H <sub>2</sub> O)	20:80	18:82	22:78

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA fator único), testes t e f com nível de confiança de 95 % (probabilidade inferior a 5% -  $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na etapa de desenvolvimento algumas ferramentas, como *software*, são muito importantes para o trabalho cotidiano pois, disponibiliza várias ferramenta para que possamos estar realizando um trabalho que levaria um tempo maior para estar fazendo de forma manual e isso acaba se tornando inviável para algumas etapas rotineiras.

O *excel* foi a ferramenta utiliza para realizar todo o tratamento de dados tanto para se trabalhar com planejamento experimental quanto a utilização do método de mínimos quadrados ordinários. Como o foco do trabalho foi utilizar planejamento de experimentos para estar otimizando uma metodologia e diminuindo análises ou testes que não são de certa forma relevante pois, não se sabe ao certo qual seria o resultado esperado, entretanto, através de um sistema de matriz conforme proposto pelo sistema fatorial completo  $2^3$  foi construído um esquema para representar as variáveis como mostra a Figura 2.

**Figura 2 - Matriz de Trabalho**

Identificação		Níveis	
Variáveis		-	+
Expoente	Fluxo	0,2	0,6
	Temperatura	20	60
	Proporção de fase móvel (Agua:MeOH)	(60:40)	(90:10)

	Fluxo	Temp	Prop	FxT	FxP	TxP	FxTxP	Tr
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	8,4
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	3,7
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	3,5
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1,4
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	9,6
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	3
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	4,6
8	1	1	1	1	1	1	1	2,35
PC	0	0	0	0	0	0	0	5,2
	0	0	0	0	0	0	0	5,2
	0	0	0	0	0	0	0	5,2

\*PC = Ponto central  
Intervalo de entrada: Tempo de retenção(TR)

**Fonte: Autoria própria**

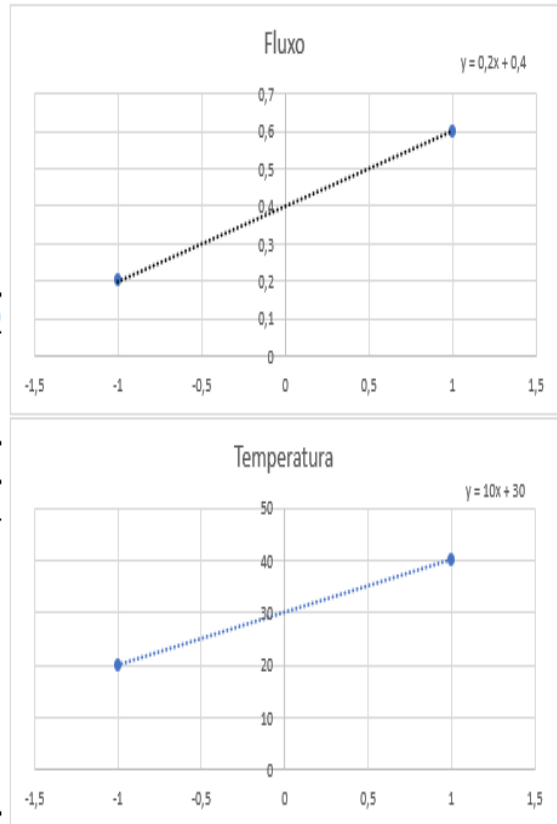
Sendo assim, após realizar uma análise de dados através das variáveis propostas, foram gerados alguns resultados conforme a Figura 3 onde foi possível retirar dados estatísticos coerentes.

Figura 3 - Resumo dos Resultados

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,992750858
R-Quadrado	0,985554265
R-quadrado ajustado	0,951847551
Erro padrão	0,538831809
Observações	11

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	7	59,3146875	8,473526786	29,2391082	0,009229296
Resíduo	3	0,869403409	0,289801136		
Total	10	60,18409091			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores
Interseção	4,740909091	0,162313147	29,2084108	8,8129E-05	4,224356214
Fluxo	-1,95625	0,190329036	-10,27825306	0,00196385	-2,561961938
Temp	-1,60625	0,190329036	-8,439332387	0,00349156	-2,211961938
Prop	0,31875	0,190329036	1,67473133	0,19258047	-0,286961938
FxT	0,86875	0,190329036	4,56446382	0,01972074	0,263038062
FxP	-0,25625	0,190329036	-1,346352638	0,27087895	-0,861961938
TxP	0,19375	0,190329036	1,017973946	0,38363664	-0,411961938
FxTxP	0,21875	0,190329036	1,149325422	0,33374064	-0,386961938



Fonte: Autoria própria

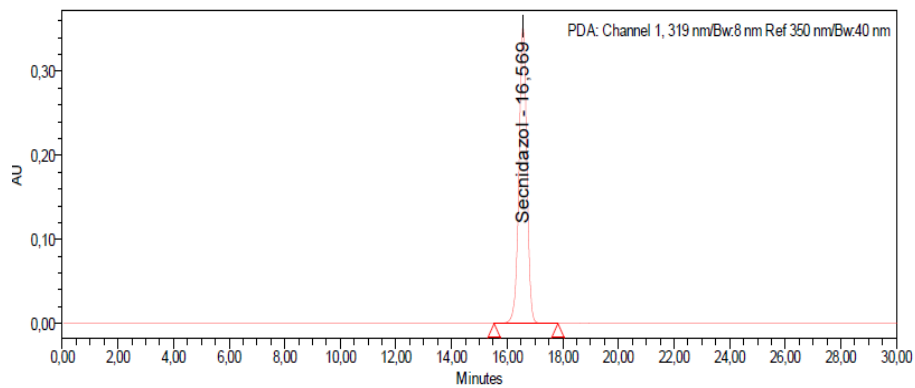
Através dos resultados gerados pode-se observar como maior impacto para o intervalo de entrada foi a temperatura e o fluxo de fase móvel, entretanto, foram realizados cálculos pela equação da reta para a proporção da fase móvel, mesmo não apresentando um impacto maior no resultado, mas necessário para obter uma análise robusta. Como obteve-se um resultado de R<sup>2</sup> de aproximadamente de 0,985 para estatística de regressão pode-se concluir que os resultados gerados tinham uma porcentagem de 98% de confiabilidade, logo foram traçados os dados de fluxo e temperatura em um gráfico, onde representa a melhor faixa de trabalho para ambas as condições em relação ao intervalo de entrada.

Com base no método descrito na farmacopeia americana para o metronidazol (USP, 2016), a coluna cromatográfica foi otimizada envolvendo estudos relacionados com a alteração das dimensões e fase estacionária de forma a proporcionar a completa separação entre os analitos de interesse e com baixos tempos de retenção, favorecendo análise rápida para ser aplicada na rotina, entretanto obter um tempo de análise ainda menor é muito benéfico para trabalho rotineiro, em relação ao método de secnidazol foi feito um comparativo entre o tempo

de análise para o método de doseamento aplicado em HPLC para o método proposto no presente trabalho, onde foi realizado um desenvolvimento através de um UPLC que tem como uma das suas principais características tempos menores para análises devido a sua tecnologia de se trabalhar com uma pressão mais elevada e mantendo sua eficiência.

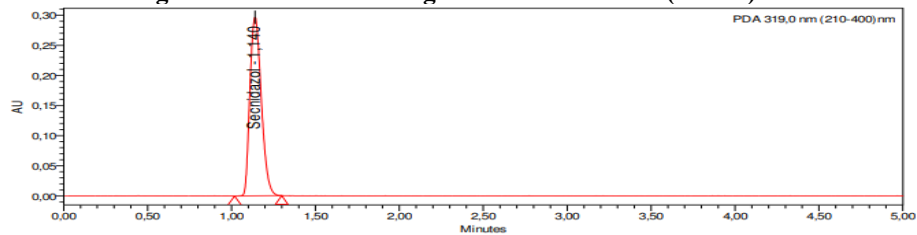
Em seguida pode-se observar o perfil cromatográfico de ambas análises com mesma concentração, entretanto com sistemas diferentes na Figura 4 representa uma análise realizada em um HPLC onde o tempo de corrida é de trinta minutos na sequência a Figura 5 representa análise desenvolvida para UPLC que apresenta um tempo de análise de cinco minutos de corrida, ou seja mais rápido.

**Figura 4 - Perfil cromatográfico de secnidazol (HPLC)**



Fonte: Autoria própria

**Figura 5 - Perfil cromatográfico de secnidazol (UPLC)**



Fonte: Autoria própria

Para verificar a eficiência do método foi realizado as seguintes análise como linearidade, precisão, exatidão e robustez.

### **Linearidade**

Após avaliação estatística das curvas de linearidade nos intervalos de concentração estabelecidos para a quantificação do ativo e de seus compostos relacionados, observou-se que para todos os intervalos avaliados, no teste do coeficiente angular, o P-valor do teste F da

ANOVA foi menor que 0,05, sendo, portanto, rejeitada a hipótese nula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%.

No teste do intercepto (Coeficiente Linear) o P-valor do teste t foi maior que 0,05, não sendo, portanto, rejeitada a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%. Na avaliação do coeficiente de correlação de Pearson (r) os valores obtidos foram maiores que 0,990, existindo uma relação linear adequada. A Tabela 5 resume os testes estatísticos realizados e os P-valores obtidos e também as curvas analíticas, por meio do método dos mínimos quadrados, onde apresentaram as equações e coeficientes de correlação.

**Tabela 5. Resultados obtidos na linearidade de secnidazol**

<i>Teste</i>	<i>Secnidazol</i>
Coeficiente angular	2739,8
Coeficiente Linear	9869,6
<i>R</i>	0,9961
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,9923

Fonte: Autoria própria

### Precisão

Em seguida, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária por meio de análises cromatográficas de soluções contendo secnidazol na concentração nominal de quantificação. Os ensaios ocorreram em dois dias diferentes e com analistas diferentes. Os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária, apresentados na Tabela 6, demonstram que o método proposto apresenta boa precisão com valores de desvio padrão relativo (DPR) de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC. (PAEZ et al., 2016)

**Tabela 6. Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária**

Composto	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Repetibilidade		Precisão intermediária		DPR%
		Média%	DPR%	Média%	DPR%	
Secnidazol	500	99,56	0,35	99,76	0,40	0,46

Fonte: Autoria própria

### Exatidão

Com a confirmação dos resultados da precisão do método proposto foram realizados ensaios para a determinação da exatidão.

Os resultados do ensaio de recuperação das amostras analisadas nos três diferentes níveis de concentração estão apresentados na Tabela 7, uma vez que o parâmetro foi avaliado



juntamente com a repetibilidade. Todos os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela *Association of Official Agricultural Chemist* (PAEZ et al., 2016)

**Tabela 7. Resultados de exatidão para a quantificação de secnidazol**

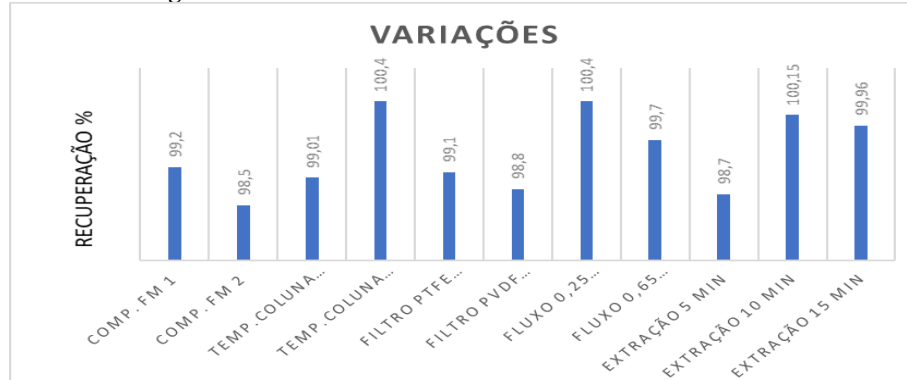
<i>Composto</i>	<i>Concentração (<math>\mu\text{g. mL}^{-1}</math>)</i>	<i>Media %</i>	<i>DPR%</i>
secnidazolo	400	99,30	0,59
	500	98,80	1,77
	600	98,32	1,38

Fonte: Autoria própria

### Robustez

A robustez foi verificada através de pequenas variações dos parâmetros analíticos do método, tais com composição da fase móvel, fluxo, temperatura da coluna, membrana filtrante e tempo de ultrassom. Em todas as variações os resultados obtidos cumpriram com os critérios definidos para a exatidão, para a quantificação do ativo. O gráfico abaixo na Figura 6 apresenta os resultados obtidos para a quantificação do ativo relacionados às variações realizadas.

**Figura 6 – Gráfico de resultados obtidos na robustez.**

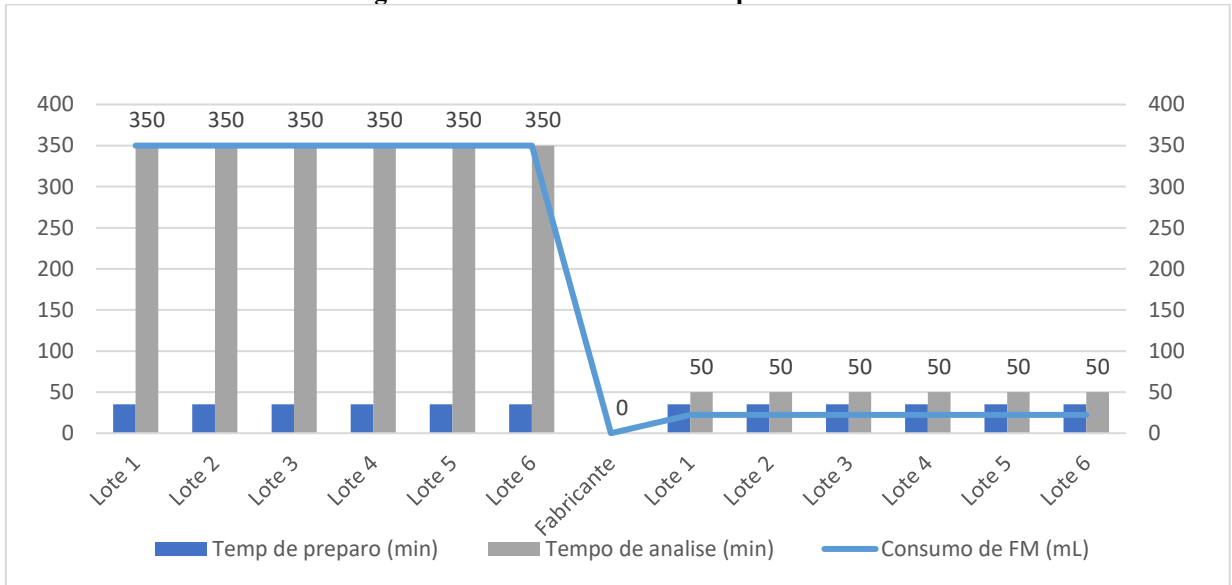


Fonte: Autoria própria

O método proposto foi robusto em todos os parâmetros avaliados demonstrando que o método é uma excelente alternativa na quantificação de secnidazol.

A Figura 7 representa uma comparação do método anterior para o método proposto pelo presente trabalho, em relação ao tempo de análise, tempo de preparo e consumo de fase móvel.

Figura 7 - Gráfico de Análise comparativa



Fonte: Autoria própria

## 7. CONCLUSÃO

O método proposto mostrou-se eficiente e confiável, apresentando linearidade nas faixas de 400 a 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para o doseamento de secnidazol, repetibilidade, exatidão e robustez permitindo o uso em análises rotineiras para o controle de qualidade de matérias-primas comercializadas no mercado nacional.

Realizando a migração para UPLC obtiveram-se ótimos resultado em relação à metodologia anterior pois, a nova metodologia proposta no presente trabalho apresentou uma diminuição significativa em dois principais fatores do processo, visando em uma escala industrial, sendo o tempo de análise que diminui de trinta minutos para cinco minutos, esse tempo representa um valor de 85,7 % menor que o método anterior, segundo de maior impacto foi o consumo de fase móvel pois, isso é visto como menos gasto em relação a utilização de solução, devido ao baixo fluxo de fase móvel no sistema e menos tempo de corrida, e isso se aplica diretamente no impacto financeiro e ambiental.

Quando se fala de impacto ambiental é de suma importância ser levada em consideração, todavia, a empresa quando gera resíduos e efluentes líquidos por exemplo, deve ser tratado de acordo com as normas ambientais, então podemos concluir que com menor uso de fase móvel, menor quantidade de efluente gerado.

Para o planejamento experimental pode-se concluir que os dados gerados foram extremante impactantes para os testes do desenvolvimento pois, com os resultados gerados tivemos condições de traçar uma forma de trabalho que foi tanto objetiva quanto assertivo como o esperado, para que o método desenvolvido neste trabalho seja reprodutível.

## REFERÊNCIAS

- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.
- FLICK, A. C. et al. Synthetic Approaches to the New Drugs Approved during 2017. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 16, p. 7340–7382, 2019.
- FUKUDA, I. M. et al. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–16, 2018.
- MAESTRELO, LUANA, 2020. Validação, Desenvolvimento E Indicativo, D E Método Eficiência, Líquida D E Alta Química, Programa D E Pós-graduação E M. 2020.
- PAEZ, V. et al. Aoac Smpr(®) 2016.002. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 1122–1124, 2016.
- PENG, P. et al. A novel sensor based on multi-walled carbon nanotubes and boron-doped double-layer molecularly imprinted membrane for the analysis of SCZ in pharmaceutical and biological samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 15, p. 1495–1514, 2019.
- TOME, T. et al. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. **Organic Process Research and Development**, v. 23, n. 9, p. 1784–1802, 2019.
- USP, M. USP, Metronidazole, USP 43 – NF 39, 4568. v. 1, 2016.