

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE DIPIRONA SÓDICA
MONOIDRATADA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE
(HPLC)**

PATRICIA VIEIRA MACHADO

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE DIPIRONA SÓDICA
MONOIDRATADA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE
(HPLC)**

PATRICIA VIEIRA MACHADO

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

Orientador: Dr. Fernando Rodolfo Espinoza Quinoñes

Co-orientadora: Dra. Marilesia Ferreira de Souza

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

Machado, Patricia Vieira

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de impurezas orgânicas de dipirona sódica monoidratada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) / Patricia Vieira Machado; orientador(a), Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones; coorientador(a), Marilesia Ferreira Souza, 2020.

86 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Graduação em Química Programa de Pós-Graduação em Química Ensino de Ciências e Matemática, 2020.

1. Dipirona . 2. Impurezas orgânicas. 3. Estabilidade da amostra. 4. Validação de método analítico. I. Quiñones, Fernando Rodolfo Espinoza . II. Souza, Marilesia Ferreira. III. Título.

PATRICIA VIEIRA MACHADO

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de impurezas orgânicas de dipirona sódica monoidratada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química, área de concentração Química, linha de pesquisa Química Analítica e Ambiental (QAA), APROVADA pela seguinte banca examinadora:

Via Videoconferência

Orientador – Prof. Dr. Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones (Unioeste)

Via Videoconferência

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara (UTFPR)

Via Videoconferência

Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski (Unioeste)

Toledo, 5 de junho de 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fernando Rodolfo Espinoza Quinoñes, sinceros agradecimentos pela oportunidade em ser sua aluna, ter recebido o incentivo e o aceite pela orientação.

A Dra. Marilesia Ferreira de Souza que contribuiu com sugestões e indicações bibliográficas.

Aos colegas Alessandra Eugênio, Fábio Gubiani e Gustavo Coppini pela contribuição com auxílio na operação de equipamentos e preparo de amostras enquanto estava ausente e idéias para a realização do projeto.

À empresa Pratidonaduzzi, pela oportunidade e disponibilização de todos os insumos e equipamentos em uma área de elevada relevância para a realização desse projeto.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE DIPIRONA SÓDICA MONOIDRATADA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

Patricia Vieira Machado

RESUMO

A dipirona é um analgésico, antipirético, espasmolítico e antiinflamatório de amplo uso, banido por agências reguladoras de referência devido ao risco de agranulocitose e outras discrasias sangüíneas. Para assegurar o uso de um medicamento é necessário controle de qualidade e estabilidade das amostras, assim como, o controle de possíveis produtos de síntese ou degradação. Dessa forma, foi desenvolvido e validado um método analítico capaz de separar e quantificar as impurezas orgânicas de Dipirona. O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento da Dipirona frente a condições de degradação em (hidrólise ácida, básica, oxidativa, íons metálicos, temperatura, umidade e fotólise), a fim de avaliar o decaimento do ativo e a separação das possíveis impurezas formadas, seja por degradação ou impurezas já presentes na amostra. Para isto foi desenvolvido e validado um método capaz de fazer essa avaliação com sensibilidade, precisão e exatidão. A linearidade foi determinada nas concentrações de $2,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a impureza C e Dipirona e $2,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $15,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a impureza E. A validação foi realizadas em modo gradiente constituída de tampão fosfato de sódio monobásico, pH 7,0 e metanol, utilizando coluna C18 de fase reversa $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ($5 \mu\text{m}$) com detecção a 254 nm. O método analítico obteve tempos de retenção das impurezas de aproximadamente 12 minutos para a impureza A, 16,9 minutos para a impureza E, 20 minutos para a Dipirona, 22,3 minutos para a impureza B, 25,6 minutos para a impureza C e 27,7 minutos para a impureza D, demonstrando resolução maior que 1,5 e ótima separação. Também apresentou sensibilidade para analitos em baixa concentração no limite de detecção e quantificação a $2,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$, exatidão, precisão e robustez para as impurezas orgânicas testadas.

Palavras-chave: Impurezas orgânicas, produtos de degradação, estabilidade da amostra, dipirona sódica monoidratada, validação de método analítico.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE DIPIRONA SÓDICA MONOIDRATADA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

ABSTRACT

Dipyrone is an analgesic, antipyretic, spasmolytic and broad antiinflammatory use in Latin America, banned by regulatory agencies of reference due to the risk of agranulocytosis and other blood dyscrasias. To ensure the use of a drug is necessary to control the quality and stability of samples and their organic impurities. Thus, an analytical method capable of separating and quantifying the organic impurities of Dipirone was developed and validated. The objective of this work was to evaluate the behavior of Dipirone against decomposition conditions (acid, basic, oxidative hydrolysis, metal ions, temperature, humidity and photolysis), in order to evaluate the decomposition of the active and the separation of possible organic impurities, either. degradation or impurities already present in the sample. For this a method was developed and validated to make this evaluation with sensitivity, precision and accuracy. Linearity was determined at concentrations of 2.55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 51 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for impurity C and Dipyrone and 2.55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ at 15.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for impurity E. Validation was performed in gradient mode consisting of monobasic sodium phosphate buffer, pH 7.0 and methanol, using 150 x 4.6 mm (5 μm) reverse phase C18 column with detection at 254 nm. The analytical method obtained impurity retention times of approximately 12 minutes for impurity A, 16.9 minutes for impurity E, 20 minutes for Dipyrone, 22.3 minutes for impurity B, 25.6 minutes for impurity C and 27.7 minutes for impurity D, showing a resolution greater than 1.5 and optimum separation. It also presents sensitivity for analytes at low concentration, not limit of detection and quantification at 2.55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, accuracy, precision and robustness for the organic impurities tested.

Keyword: Organic impurities, Degradation products, sample stability, dipyrone monohydrate, Analytical method validation

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

HPLC - *High performance liquid chromatography*

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

AINES – Anti-inflamatórios não Esteroidais

MIP – Medicamentos Isentos de Prescrição

AOAC - Associação de Químicos Agrícolas Oficiais

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FDA – *Food and Drug Administration*

DAD - Detector Diode Array

ICH - *International Conference on Harmonization*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de Quantificação

pH - Potencial Hidrogeniônico

PET – Polietileno Tereftalato

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

PTFE – Politetrafluoretileno

DPR – Desvio Padrão Relativo

UV – Radiação Ultravioleta

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Limites especificados para impurezas em fármacos	24
Tabela 2 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona.....	42
Tabela 3 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona.....	42
Tabela 4 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona.....	43
Tabela 5 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona.....	44
Tabela 2 - Avaliação quantitativa condição pré-determinada pH 7,0 e testadas pH 6,8 e pH 7,2. .50	
Tabela 3 - Avaliação quantitativa condição pré-determinada fluxo 1,0 mL/min e testadas 0,9 e 1,1 mL/min.	51
Tabela 4 - Avaliação quantitativa condição pré-determinada temperatura do forno de 15 °C e testadas 13 °C e 17 °C.	52
Tabela 5 - Resultados da verificação do sistema na solução Padrão	52
Tabela 6 - Teste de filtro solução padrão	52
Tabela 7 - Teste de filtro solução amostra.....	53
Tabela 8 - Teste de filtro para impurezas específicas C - Matéria prima	54
Tabela 9 - Teste de filtro para impurezas específicas E - Matéria prima.....	55
Tabela 10 - Teste de filtro para impurezas inespecíficas – Matéria prima	55
Tabela 11 - Avaliação quantitativa de impurezas - teste de extração.	57
Tabela 12 - Avaliação quantitativa dos padrões - teste de estabilidade.....	57
Tabela 13 - Avaliação quantitativa de impurezas - teste de estabilidade.	58
Tabela 14 – Condições de estresse e tempo de exposição da Dipirona.....	60
Tabela 15 – Resultados da avaliação de pureza de pico para o pico da dipirona na amostra para o fabricante 1 e fabricante 2 (purity angle/ purity threshold).	64
Tabela 16 - Resultados das amostras submetidas a estresse ácido.....	66
Tabela 17 - Resultados das amostras submetidas a estresse básico.....	66
Tabela 18 - Resultados das amostras submetidas a estresse oxidativa.	67
Tabela 19 - Resultados das amostras submetidas a estresse íons metálicos	68
Tabela 20 - Resultados das amostras em estresse fotolítico, térmico e úmido.	69
Tabela 21 – Resultados de teste ANOVA para Dipirona.....	73
Tabela 22 – Resultados de teste ANOVA para Impureza C.	73
Tabela 23 – Resultados de teste ANOVA para Impureza E.....	73
Tabela 24 – Dados dos coeficientes de regressão segundo teste ANOVA para Dipirona.....	74
Tabela 25 – Resultados da Estatística de regressão Dipirona, Impureza C e Impureza E.....	74
Tabela 26 – Resultados do teste estatístico de Cochran.	75
Tabela 27 – Resultados de variância - teste de Grubbs para Dipirona.	76
Tabela 28 – Resultados de variância - teste de Grubbs para Impureza C.	76
Tabela 29 – Resultados de variância - teste de Grubbs para Impureza E.	77
Tabela 30 – Determinação do fator resposta.....	77

Tabela 31 – Exatidão/Precisão 1º dia (repetibilidade) e 2º dia (intermediária) para impurezas inespecíficas.	78
Tabela 32 – Reprodutibilidade – impurezas inespecíficas.	78
Tabela 33 – Exatidão/Precisão 1º dia (repetibilidade) e 2º dia (intermediária) para Impureza C....	79
Tabela 34 – Reprodutibilidade – Impureza C.....	80
Tabela 35 – Exatidão/Precisão 1º dia (repetibilidade) e 2º dia (intermediária) para Impureza E	80
Tabela 36 – Reprodutibilidade – Impureza E.....	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química de dipirona sódica	20
Figura 2 – Esquema do equipamento para análise por cromatografia líquida de performance HPLC ⁴⁶	25
Figura 3 – Cromatograma sobreposto a solução de impureza E e da solução amostra de dipirona sódica monoidratada	39
Figura 4 – Gráfico de pureza cromatográfica – purity plot do pico de Dipirona coeluinto com a impureza E	40
Figura 6 – Cromatograma da amostra de dipirona com adição das impurezas orgânicas específicas e inespecíficas da farmacopeia Britânica ¹¹	40
Figura 7 – Cromatograma da amostra de dipirona sobreposto com as impurezas orgânicas e com o diluente - farmacopéia Britânica	41
Figura 8 – Cromatograma sobreposto do mix de impurezas com a solução diluente (metanol 100%)	42
Figura 9 – Cromatograma sobreposto do mix de impurezas com a solução diluente (metanol 100%)	43
Figura 10 – Cromatograma da amostra de dipirona 8500 µg.mL ⁻¹ solubilizada em diluente (metanol 100%) e contaminada com as impurezas A, B, C, D e E	44
Figura 11 – Cromatograma da amostra de dipirona 8500 µg.mL ⁻¹ solubilizada em diluente (metanol 100%) e contaminada com as impurezas A, B, C, D e E – Gradiente 4.....	45
Figura 12 - Teste de estabilidade da amostra exposta a diluente 1 (H ₂ O).....	46
Figura 13 – Resultados de teor de dipirona obtidos nos testes de estabilidade da amostra exposta à diluente 2 (MeOH 100%), Diluente 3 (MeOH:NaSO ₄), Diluente 4 (MeOH:NaSO ₄):DMF (75:25), Diluente 5 (MeOH:NaSO ₄):DMF (50:50) e Diluente 6 (MeOH:NaSO ₄):DMF (25:75).	47
Figura 14 - Resultados de teor da impureza C obtidos nos testes de estabilidade da amostra exposta à diluente 2 (MeOH 100%), Diluente 3 (MeOH:NaSO ₄), Diluente 4 (MeOH:NaSO ₄):DMF (75:25), Diluente 5 (MeOH:NaSO ₄):DMF (50:50) e Diluente 6 (MeOH:NaSO ₄):DMF (25:75).	48
Figura 15 - Overlay dos cromatogramas das Soluções Padrões no teste de filtro	54
Figura 16 - Overlay dos cromatogramas das Soluções amostras no teste de filtro.....	54
Figura 17 - Overlay dos cromatogramas das robustez de filtro das Solução contaminada – Impureza C	56
Figura 18 - Overlay dos cromatogramas das robustez de filtro das Solução contaminada – Impureza E	56
Figura 19 - Overlay dos cromatogramas das robustez de filtro de Dipirona 0,05% - Impureza Inespecíficas	56
Figura 20 – Solução padrão em diferentes tempos de injeção - estabilidade.	59
Figura 21 – Solução amostra matéria prima em diferentes tempos de injeção - estabilidade.	59
Figura 22 - Estrutura da Dipirona com seus grupos funcionais evidenciados.	60

Figura 24 – Cromatograma da solução amostra verificada no Max Plot	61
Figura 25 – Cromatograma da solução amostra 1249,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ verificada no Max Plot	62
Figura 26 – Purity plot da Solução amostra 1249,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Dipirona Monoidratada para avaliação da homogeneidade espectral	62
Figura 27 – Cromatograma da solução padrão de Dipirona.	63
Figura 28 – Espectro de absorção na região UV-Vis para Dipirona na solução padrão.	63
Figura 29 – Espectro de ruído (Noise Spectrum).....	64
Figura 30 – Sobreposição dos cromatogramas da solução branco exposta a degradação ácida, básica, peróxido e íons metálicos.....	65
Figura 31 – Decomposição hidrolítica da Dipirona ²⁸	70
Figura 32 – Decomposição hidrolítica da Dipirona e aumento da 4-metilaminoantipirina ²⁸	70
Figura 33 – Rota de degradação de Dipirona ¹⁵	71
Figura 34 – Curva analítica para Dipirona.	72
Figura 35 – Curva analítica para Impureza C.	72
Figura 36 – Curva analítica para Impureza E.	73
Figura 37 – Gráfico de Resíduos para Dipirona.....	74
Figura 38 – Gráfico de Resíduos para Impureza C.....	75
Figura 39 – Gráfico de Resíduos para Impureza E.....	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO	18
2.1 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Analgésicos, antiespasmódicos e antiinflamatórios.....	19
3.2 Dipirona Sódica.....	20
3.3 Desenvolvimento de métodos	22
3.4 Impurezas Orgânicas	23
3.5 Identificação de impurezas e produtos de degradação.....	24
3.6 Cromatografia líquida de alta performance.....	24
3.6.1 Equipamento e parâmetros analíticos	24
3.6.1.1 Definições dos parâmetros analíticos.....	26
3.7 Validação do método analítico	27
3.7.1 Conformidade do sistema	27
3.7.2 Seletividade	27
3.7.2.1 Avaliação de homogeneidade espectral.....	28
3.7.3 Linearidade	28
3.7.4 Precisão.....	29
3.7.4.1 Repetibilidade	29
3.7.4.2 Precisão intermediária.....	30
3.7.4.3 Reprodutibilidade	30
3.7.5 Exatidão.....	30
3.7.6 Limite de detecção	31
3.7.7 Limite de quantificação.....	31
3.7.8 Robustez.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Método Farmacopeia Mexicana de Dipirona Sódica - Substâncias Relacionadas ⁵⁶	32
4.2 Método Farmacopeia Britânica de Dipirona Sódica - Substâncias Relacionadas ²⁴	33
4.3 Padrões e amostras	33
4.4 Equipamentos	34
4.5 Solventes	34
4.6 Ajuste de sistema cromatográfico.....	34
4.7 Preparo das soluções.....	34
4.7.1 Diluente.....	34
4.7.2 Tampão.....	34
4.7.3 Curva analítica	35
4.7.4 Amostra.....	35
4.7.5 Sensibilidade do sistema.....	35
4.7.6 Solução de impurezas.....	35

4.8	Preparo da seletividade.....	36
4.9	Preparo da linearidade	38
4.10	Preparo da precisão/exatidão.....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1	Desenvolvimento do método analítico.....	39
5.1.1	Farmacopeia Mexicana.....	39
5.1.2	Farmacopeia Britânica	40
5.1.3	Testes de gradiente	41
5.1.3.1	Gradiente 1	41
5.1.3.2	Gradiente 2	42
5.1.3.3	Gradiente 3	43
5.1.3.4	Gradiente 4	44
5.1.4	Testes de estabilidade e diluente	45
5.1.5	Robustez.....	49
5.1.6	Variação de pH da solução tampão.....	49
5.1.6.1	Condição pH 6,8 e pH 7,2.....	49
5.1.7	Variação da vazão da fase móvel	50
5.1.7.1	Condição 0,9 mL/min e 1,1 mL/min.....	50
5.1.8	Variação de temperatura do forno.....	51
5.1.8.1	Condição 13 °C e 17 °C	51
5.1.9.	Teste de membrana filtrante.....	52
5.1.10.	Teste de extração.....	56
5.1.11.	Teste de estabilidade.....	57
6.	SELETIVIDADE	60
6.1	Estrutura	60
6.1.1	Condições de degradação forçada para a estrutura da Dipirona.....	60
6.1.2	Avaliação de homogeneidade espectral.....	60
6.1.3	Amostras de degradação ácida, alcalina, oxidativa e íon metálico	65
6.1.3.1	Estresse Branco.....	65
6.1.3.2	Estresse Ácido – HCl 0,01 M.....	65
6.1.3.3	Estresse Alcalino – NaOH 0,50 M	66
6.1.3.4	Estresse Oxidativo – H ₂ O ₂ 0,15%.....	67
6.1.3.5	Estresse por íons metálicos – FeCl ₃ 2 mM.....	68
6.1.4	Amostras de degradação fotolítico, temperatura e umidade.....	69
6.1.5	Discussão da Seletividade	69
6.2.	Linearidade	72
6.2.1	Avaliação fator resposta das impurezas C e E	72
6.3.	Exatidão/Precisão	77
6.6.1	Precisão 1º dia e 2º dia / Exatidão – Impurezas Inespecíficas.....	77
6.6.2	Reprodutibilidade – Impurezas Inespecíficas	78
6.6.1	Precisão 1º dia e 2º dia / Exatidão – Impureza C – Impureza Específica.....	79
6.6.2	Reprodutibilidade – Impureza C – Impureza Específica	79

6.6.3	Precisão 1º dia e 2º dia / Exatidão – Impureza E – Impureza Especifica.....	80
6.6.4	Reprodutibilidade – Impureza E – Impureza Especifica.....	81
6.	CONCLUSÃO	82
7.	REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

Criada pela lei nº 9,782 de 26 de janeiro de 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem por finalidade promover a saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambiente, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados¹. Este controle deve ser feito para que garanta, principalmente, a eficácia e a segurança de produtos para a saúde humana.

Um dos maiores focos de fiscalização da ANVISA são os medicamentos, que para serem comercializados, devem desenvolver e empregar boas práticas de controle de qualidade^{2, 3, 4}. Para que um medicamento tenha qualidade ele precisa ser eficaz e seguro tendo um processo de produção de acordo com as exigências do órgão regulatório. Aliado a isto, devem ser adotadas controles de todas as substâncias que irão compor o medicamento (seja o ativo farmacêutico, sejam os excipientes), a fim de se prever a maior pureza possível. Também é importante reconhecer que todos estes compostos contém impurezas^{5,6,7,8}, o que pode interferir nas propriedades toxicológicas do medicamento.

As impurezas são resultantes de inúmeras fontes, como por exemplo, das matérias-primas, dos reagentes de síntese, como materiais de partida e ainda da degradação do produto, que pode originar compostos indesejáveis durante o próprio processo de fabricação, transporte ou ainda durante o armazenamento dos medicamentos. Entender a origem, controlar e quantificar as impurezas é importante e crítico para a produção de fármacos e medicamentos com alta qualidade⁶.

Em 2015, a ANVISA publicou a RDC nº 53, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos ou similares, e dá providências⁵. Esta resolução exige que as indústrias farmacêuticas realizem o monitoramento dos produtos de degradação dos medicamentos, para conhecê-los, de forma a garantir que tenham toxicidade dentro das especificações ou que não tenham perda da eficiência terapêutica.

Esta nova resolução também traz providências quanto aos estudos que devem ser realizados para que se conheça de fato o comportamento do ativo farmacêutico no medicamento. Estes testes são conhecidos como testes de estresse ou ainda ensaios de degradação forçada. Tais testes são usados para avaliar a formação dos produtos de degradação e são objetos de estudo o medicamento, o fármaco isolado e o placebo. Estes ensaios ajudam a entender melhor a cinética de formação dos produtos de degradação,

além de ajudar a prever quais são os mais prováveis produtos de degradação que podem ser relativamente encontrados no medicamento que está disponível para a população e também, auxiliam no desenvolvimento de métodos analíticos específicos, chamados métodos indicativos de estabilidade⁵.

O objetivo inicial deste teste é gerar produtos de degradação em quantidade suficiente para poder se desenvolver e validar o método indicativo de estabilidade. Depois de desenvolvido e validado, este método deverá ser destinado a avaliar as amostras de medicamentos provenientes dos estudos de estabilidade, o qual tem como objetivo geral prever, determinar e acompanhar o prazo de validade do produto farmacêutico.

O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação ou aplicação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos em rotina, denominado validação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados¹.

As agências reguladoras (ANVISA, AOAC, ICH) oferecem guias para que os laboratórios farmacêuticos possam utilizar para a validação de métodos analíticos, sendo que estes guias usualmente determinam procedimentos analíticos e especificações a serem seguidos^{1,2,6-9}.

Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação¹.

Neste trabalho é apresentado o desenvolvimento e validação de um método analítico para a detecção, identificação e quantificação de impurezas orgânicas de Dipirona sódica monohidratada utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) atendendo as especificações das agências regulamentadoras.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para impurezas orgânicas de Dipirona sódica monoidratada através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

2.1 Objetivos específicos

- a. Avaliação da estabilidade da molécula frente a solventes;
- b. Avaliação da susceptibilidade dos grupos funcionais da molécula do insumo farmacêutico ativo (IFA) à degradação;
- c. Desenvolver um método seletivo e específico as impurezas orgânicas e produtos de degradação da dipirona sódica monoidratada;
- d. Validação do método proposto.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Analgésicos, antiespasmódicos e antiinflamatórios

A dor e a febre, associadas ou não a processos inflamatórios, são sintomas que afetam todos os indivíduos, sendo usual a várias doenças e têm preocupado a humanidade há muitos séculos^{10,11}. Medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são populares e amplamente utilizados por causa de sua reconhecida eficácia e excelente perfil de segurança em uma ampla gama de condições, os mais utilizados são: ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno e dipirona¹². Existem evidências substanciais decorrentes de estudos experimentais e clínicos para múltiplos efeitos na função renal¹³. Anti-inflamatórios não esteroides são úteis no controle da dor no pós-operatório pois devido a intervenção cirurgica pode causar dor ou inflamação. A maioria desses medicamentos demonstram uma faixa de ações analgésicas, anti-inflamatórias, antiplaquetárias e antipiréticas¹⁴.

Analgésicos são todos os medicamentos que podem reduzir ou aliviar a dor. Esses medicamentos são divididos em duas categorias: analgésicos opióides (relacionados à morfina) e analgésicos não opióides (consistindo em medicamentos que podem resistir à dor e/ou febre, mas não na capacidade de combater a inflamação e anti-inflamatórios não-esteróides)^{4,15}.

Os AINES utilizados como antipiréticos ou antitérmicos são fármacos que eliminam ou aliviam os estados febris. O efeito é rápido, porém melhoram o conforto de pacientes no pós-operatório¹⁴. A temperatura corporal é elevada por estímulos endógenos ou exógenos controlada pelo sistema nervoso central é controlada por um mecanismo regulador situado no hipotálamo, que controla a produção e a perda de calor¹¹. Constatou-se que a dipirona estava em 88,3% das prescrições como antipirético em casos de temperatura igual ou superior a 38°C em crianças hospitalizadas, sendo portanto o mais indicado¹¹.

É de grande importância estudos relacionados a medicamentos analgésicos devido a automedicação para tratamento da dor e é um fenômeno relatado em todo o mundo, principalmente com a classe dos AINEs, sendo a dor o principal sintoma apresentado por diferentes condições de saúde, bem como o principal motivo que leva os indivíduos à procura a estes fármacos por ser de venda livre¹⁶.

3.2 Dipirona Sódica

O ácido 1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometanossulfônico, mais conhecido como dipirona, analgina, noramidopirona ou metamizol^{4,5,17}, é um dos derivados do pirazol hidrosolúvel introduzido para uso clínico na Alemanha em 1922^{3,4,18, 17} cuja ação terapêutica na dor e na febre foi comprovada em vários estudos¹⁹ e é um medicamento amplamente utilizado pela população brasileira na introdução de várias apresentações como, (soluções orais, injeções, comprimidos e supositórios^{20,11,21}), vendidos principalmente como medicamentos de venda livre (MIP)^{4,22, 23}

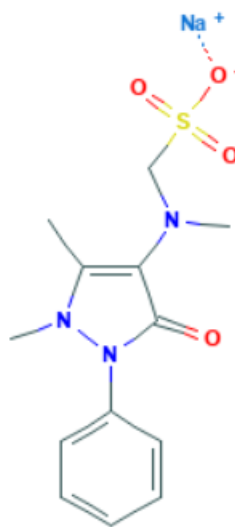


Figura 1- Estrutura química de dipirona sódica

Fonte: pubchem, 2019

Este fármaco é encontrado principalmente como um pó cristalino, quase branco e inodoro. É solúvel em água e em metanol, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter etílico, acetona, benzeno e clorofórmio^{22,24,25,11}.

As pirazolonas são amplamente utilizados como analgésicos e antipiréticos, mas são amplamente declarados fracos agentes anti-inflamatórios²⁶ e têm sido removido por causa do risco percebido de discrasias sanguíneas^{18,23}. É indicada para patologias como dores agudas e crônicas como a enxaqueca²⁷, cólica renal²⁸, pós-operatórias²⁹ e de outras origens¹⁷. Também é indicada para o combate à febres^{4,24} a qual apresentou efeito mais duradouro entre 3 e 6 horas que Ibuprofeno e Paracetamol de até 3 horas²⁸.

É rapidamente absorvida pelas diferentes vias de administração^{17, 30} e hidrolisada pelo suco gástrico no metabólito ativo 4-N-metilaminoantipirina²⁷, que é prontamente absorvido pelo organismo. O mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de prostaglandinas³¹, prostaciclina e tromboxanos, e pela inibição reversível e irreversível da enzima ciclooxigenase em suas isoformas conhecidas 1 e 2^{17,11}.

Alguns autores não recomendam o uso de dipirona, sendo este fármaco proibido em países como Austrália, Canadá, Dinamarca, Estados Unidos da América – EUA¹⁹, Noruega, Reino Unido, Suécia, entre outros^{32,20}. Isto é devido ao suposto efeito depressor da medula óssea¹⁹, o que poderia levar a uma anemia aplástica e, principalmente, agranulocitose²⁸. A agranulocitose se define por uma queda acentuada do número de granulócitos no sangue, podendo apresentar febre, calafrios, dor de cabeça, úlcera na garganta, no trato gastrointestinal e outras mucosas¹⁹. Agranulocitose é rara, com taxa de fatalidade em torno de 6-10%, o que motivou a retirada de dipirona de alguns países²⁸.

Segundo o Estudo Internacional de Agranulocitose e Anemia Aplástica (Estudo de Boston), publicado em 1986, não há associação com anemia aplástica^{21,33}, quanto ao risco de agranulocitose um estudo realizado por Huguley em 1964 apontou 0,79%, ou seja, 1 caso em cada 127 exposições^{19,34}. A ANVISA por meio da resolução n°. 1.260, de 15 de agosto de 2001, conduziu um estudo, aprofundou e discutiu dados da literatura, onde demonstrou um estudo de Boston, por sua perfeição metodológica e pelo seu vultoso tamanho, veio a encerrar as especulações sem base científica aceitável. Sob o comando de Sir Richard Doll, de Oxford, o estudo envolveu mais de 40 pesquisadores, entre eles os famosos David Kaufman e Samuel Shapiro e, nada menos que 300 hospitais e 22,2 milhões de pessoas, em 7 países: Alemanha, Itália, Hungria, Espanha, Israel, Bulgária, Suécia por um período de 4 anos, atingindo um total de 80 milhões de anos humanos³⁴.

As conclusões desse estudo foram que a agranulocitose e a anemia aplástica podem ser causadas uma variedade de medicamentos, bem como agentes químicos e pesticidas; a incidência global de agranulocitose é de 6 por milhões de habitante e ocorre muito raramente em crianças aumentando com a faixa etária; O excesso de risco de agranulocitose atribuído à dipirona é de 1,1 caso por milhão de pessoas expostas²¹, que tenham tomado o fármaco durante o período de 7 dias antes dos sintomas da doença³⁴. Segundo Ibañez et al., esse risco aumenta com a duração do tratamento com a droga e desaparece após dez dias da última dose administrada³⁵.

Considerando-se que no Brasil e países na América do Sul, África do Sul, Oriente Médio e alguns países europeus, ao contrário do que ocorre em 33 outros países mais desenvolvidos, associações à base de dipirona são utilizados indiscriminadamente²⁸. Segundo DIOGO 2003, em 2001, um dos analgésicos mais comercializados, 31,8% eram à base de dipirona; 29,7% paracetamol; 27,1% ácido acetilsalicílico¹⁷; 1% ibuprofeno. No Brasil, são comercializados 125 produtos a base de dipirona, 71 deles estão associados a outras substâncias, e mais de 80% das vendas ocorrem sem receita médica¹⁹.

Atualmente, faz parte da lista de medicamentos do programa Farmácia Popular do Ministério da Saúde e é a droga mais freqüentemente usada em unidades de saúde pública

é a dipirona intravenosa^{12, 27}. Por ser utilizado para a produção de MIPs de baixo custo¹¹, sua procura pela população para tratamento de febres e neuralgias, a experiência clínica é unânime em sugerir que a dipirona é o melhor antipirético que existe no mercado³⁴.

Desse modo, a dipirona tem incontestável eficácia, apresenta-se igual ou maior que ativos como paracetamol e aspirina, embora seu teto analgésico seja maior²⁹, mesmo com os dados levantados o insumo ativo precisa ser balanceada com as reações adversas que acarreta²⁸, apesar de alguns estudos demonstrarem que a utilização da dipirona apresenta um bom risco-benefício^{22,32,11}, se a qualidade do medicamento produzido com este medicamento for insuficiente, é inútil. A qualidade não é apenas entendida como a conformidade do laboratório com certas regulamentações, mas deve garantir que os consumidores possam comprar esses medicamentos eficazes com características de reação adversa bem conhecidas^{36,11}.

Qualquer medicamento deve, no momento do uso, ter sua ação farmacológica preservada, e a toxicidade da formulação deve se manter em níveis aceitáveis, considerando à implantação de normas sanitárias, que garantam a qualidade dos produtos medicamentosos disponíveis no mercado^{22,32,24}.

3.3 Desenvolvimento de métodos

O desenvolvimento do método envolve a avaliação e otimização das várias etapas de preparação da amostra, estabilidade da molécula, separação cromatográfica, detecção e quantificação³⁷.

Durante o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, alguns fatores importantes devem ser considerados, como: a amostra, a técnica de separação e o detector. A amostra usada para o desenvolvimento do método deve ser representativa, ou seja, deve conter a maior quantidade de produtos de degradação e impurezas possíveis para a avaliação da seletividade^{37,38}, também deve investigar a estabilidade dos analitos antes da validação do método, por exemplo, durante a extração, diluentes utilizados³⁹, limpeza. Cada passo deste estudo de estabilidade deve ser realizado em réplica³⁸ e será utilizado para avaliar as amostras provindas dos estudos de estabilidade.

A redução da estabilidade de um ativo químico geralmente promove a perda da potência, alterando a concentração de princípio ativo presente no medicamento e desta forma reduzindo a dose terapêutica destinada ao paciente, além de que o produto de degradação pode ser tóxico. Esse processo depende, não somente do princípio ativo, mas também da mistura de excipiente de veículos utilizados na produção do medicamento¹¹.

Fatores intrínsecos e extrínsecos alteram a estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. Os fatores extrínsecos, geralmente, causam as degradações físicas, que são aquelas relacionadas às condições externas ou ambientais como a luz, ar e umidade, no entanto pode alterar também as características físicas e químicas do fármaco³⁹. Já os fatores intrínsecos, são aqueles relacionados aos componentes do fármaco, que podem causar a degradação química, como a hidrólise²⁷, oxidação, isomerização, polimerização e reações fotoquímicas⁴⁰

Como é difícil selecionar uma única amostra com essas características, várias amostras diferentes podem ser usadas para o desenvolvimento, o que ajudará a desafiar a especificidade do método³⁷. O método deve ser capaz de detectar até concentrações baixas de impurezas e produtos de degradação^{23,38}, é desejável que tenha capacidade de separar adequadamente todas as substâncias presentes na amostras, se possível, identificá-las estruturalmente³³.

Principais técnicas atuais para análise de impurezas e/ou produtos de degradação é a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por UV-Visível (detector por arranjo de diodos – DAD)^{21,37,38}. O detector DAD é o mais utilizado para este tipo de análise, pois, além de ser um equipamento relativamente barato, ele é capaz de analisar as amostras injetadas em uma ampla faixa de comprimento de onda (200-800 nm) e por isso também gera informações importantes como a pureza de pico, a qual eleva a seletividade da detecção reduzindo a interferência por coeluição, e também o espectro de absorção das substâncias^{38,41}.

Observando a semelhança entre os produtos de degradação, impurezas orgânicas e o fármaco, o melhor detector, capaz de diferenciar os compostos através do peso molecular além de fornecer informações mais específicas sobre as estruturas das moléculas em análise, é o espectrômetro de massas (MS)³⁸.

3.4 Impurezas Orgânicas

Para trazer novos medicamentos ao mercado, a indústria precisa estudar as impurezas contidas nos medicamentos e os produtos de degradação que podem ser formados durante a produção, transporte e armazenamento de novos produtos^{39,42}.

A indústria que fabrica o medicamento de referência utiliza novos ativos químicos para realizar estudos de degradação e distribuição de impurezas no início do teste, o que permite entender melhor todas as substâncias interferentes na síntese de ativos e, assim, ajudar a otimizar o processo de produção reduzindo assim as impurezas e produtos de degradação do insumo ativo^{5,6,42}.

Segundo os guias do ICH, as impurezas pode ser classificadas em diferentes categorias: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e solventes residuais^{8,42}. As impurezas orgânicas podem ser obtidas durante a produção e/ou armazenamento de medicamentos e podem ser conhecidas ou desconhecidas, voláteis ou não voláteis e incluem: matérias-primas, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes, adesivos ou catalisador^{8,37}.

Com o intuito de monitorar a presença das diversas impurezas que podem ser encontradas nos fármacos ou no próprio medicamento, os guias do ICH⁸ para controle de impurezas, assim como os guias do Food and Drug Administration (FDA)⁴³ e mais recentemente os da ANVISA, especificam limites aceitáveis para impurezas, os quais estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1 – Limites especificados para impurezas em fármacos

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

Fonte: Guia Q3A (R2) ICH – Impurities in new drug substances⁸

Devido ao controle da qualidade das matérias-primas utilizadas na produção farmacêutica, as restrições às impurezas nos ativos farmacêuticos são muito rigorosas, portanto, nenhuma impureza será adicionada ao produto final².

3.5 Identificação de impurezas e produtos de degradação

De acordo com os guias do ICH para impurezas em ativos e em medicamentos, o menor limite especificado para impurezas deve ser empregado de acordo com a dose diária ingerida^{7,8}. Portanto, é importante que o limite de quantificação do método seja de acordo com a dose máxima diária e para isso o método deve ser sensível^{7,37,42}. Além desses limites, a substância descoberta deve ser identificada, ou seja, sua estrutura molecular deve ser descoberta e adequadamente relatada ao órgão regulador. A identificação de produtos de degradação é importante para melhorar o entendimento da formação dessa impureza e determinar seu mecanismo de degradação^{5,6,8}.

3.6 Cromatografia líquida de alta performance

3.6.1 Equipamento e parâmetros analíticos

Nos últimos 40 anos, a cromatografia líquida de alta performance (CLAE) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência⁴⁴.

O sistema de HPLC é identificado como o conjunto de componentes que estão num único aparelho e que permite a identificação e a quantificação dos compostos que estão presentes numa amostra. Um sistema de HPLC é, então, constituído pelos seguintes componentes: canais para fase móvel, uma bomba, um sistema de injeção de amostra, uma coluna cromatográfica, um detetor, descarte de resíduos e sistema para tratamento de dados, como estão representados na Figura 2^{44,45}.

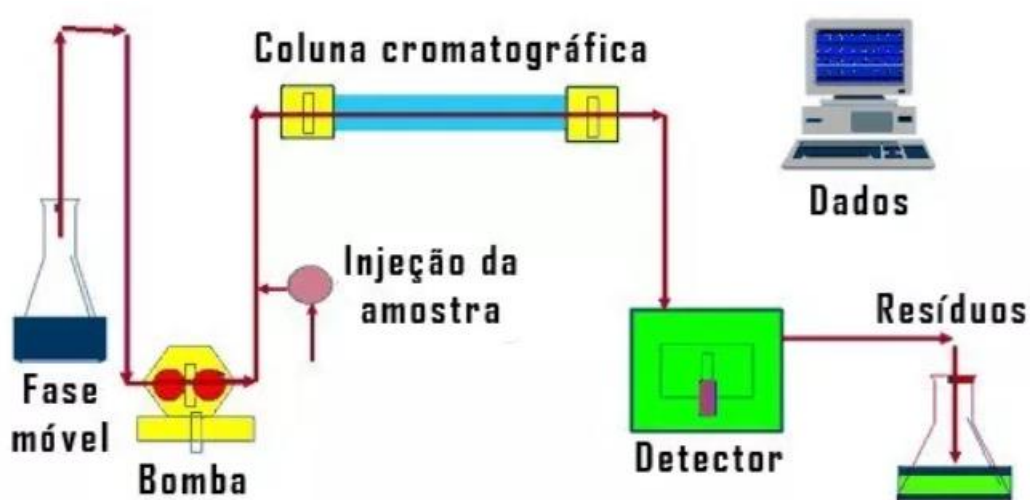


Figura 2 – Esquema do equipamento para análise por cromatografia líquida de performance HPLC⁴⁶

A bomba opera sob alta pressão o que é necessária para fazer a passagem da fase móvel, através da coluna, com um fluxo geralmente na ordem dos mililitros por minuto^{45,46}.

Quando há uma alteração gradual da composição da fase móvel ao longo do processo cromatográfico, por aumento e posterior diminuição de percentagem de solvente orgânico, diz-se que o sistema é de eluição gradiente ou programação de solvente. Neste sistema, a percentagem de fase móvel A e fase móvel B não é a mesma ao longo de todo o processo de separação cromatográfica, variando nas suas proporções⁴⁶.

O processo de separação cromatográfica começa quando a amostra, juntamente com a fase móvel, é injetada logo no início da coluna cromatográfica. A amostra é bombeada e percorre a coluna, onde vai ocorrer a separação dos analitos. O injetor é o responsável por introduzir a amostra na fase móvel, que está continuamente a passar na coluna do sistema de HPLC⁴⁵.

As separações são alcançadas por processos de partição, adsorção ou troca iônica, dependendo do tipo de fase estacionária usada na coluna cromatográfica. O empacotamento da coluna é designado por fase estacionária e é constituído por pequenas partículas porosas esféricas com uma superfície específica variável ou por um líquido específico. Este material de empacotamento da fase estacionária pode suportar pressões que podem ser superiores a 14000psi e vai contribuir para um desempenho no cromatograma^{41,42,45}.

Para quantificar e identificar os analitos é necessário um detector. Para o sistema de HPLC é utilizado os detetores espectrofotométricos (UV) que deve seguir alguns requisitos como; boa sensibilidade para todos os solutos, limite de detecção suficientemente baixo, boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal, resposta rápida do sensor. O detector deve ser adequado aos componentes que se pretendem analisar e que percorrem a coluna cromatográfica, para que a eficácia da detecção e quantificação dos mesmos seja eficaz^{41,45}.

3.6.1.1 Definições dos parâmetros analíticos

Cromatograma: Uma representação gráfica da resposta do detector, concentração de analito no efluente ou outra quantidade usada como uma medida de concentração de efluente versus volume ou tempo de efluente⁴².

Tempo morto (TM): É o volume entre o ponto em que os eluentes se encontram e o topo da coluna ou tempo que não elui nenhum pico de analito^{42,46}.

Número de pratos teóricos (N): Medida da eficiência da coluna. Para picos gaussianos, é calculado por: $N = 16 (tR / W)^2$, onde tR é o tempo de retenção da substância, e W é a largura do pico em sua base, obtida extrapolando o lados retos do pico até a linha de base. O valor de N depende da substância sendo cromatografada, bem como do condições de operação, como a fluxo da fase móvel, temperatura do forno, a uniformidade do empacotamento dentro da coluna⁴⁶.

Resolução (R): A resolução é a separação de dois componentes em uma mistura, calculada por: $R = 2 \times (tR2 - tR1) / (W1 + W2)$ onde $tR2$ e $tR1$ são os tempos de retenção dos dois componentes; e $W2$ e $W1$ são as larguras correspondentes nas bases dos picos obtidos extrapolando os lados relativamente retos dos picos para a linha de base^{41,46}.

Fator de simetria (T): Conhecido como o "fator de cauda", de um pico é calculado por: $T = W_{0,05} / 2f$ onde $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância do pico máximo até a linha de base do pico, a distância sendo medida em um ponto 5% da altura do pico a partir da linha de base^{41,46}.

3.7 Validação do método analítico

3.7.1 Conformidade do sistema

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se avaliar a adequação do sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável^{7,48,39}. Geralmente, envolvem testes como avaliação qualitativa do sistema cromatográfico obtida de uma mistura, resolução (R), número de pratos (N) e fator de assimetria (T)^{7,39}, juntamente com medidas quantitativas avaliações da calibração da curva dos padrões e controle de qualidade das amostras^{37,49}. Todas as especificações determinadas e avaliadas no sistema como por exemplo a estimativa do desvio padrão pode ser determinada durante a validação, (baseado nos resultados da exatidão e definidos na literatura) e devem ser garantidos durante o uso rotineiro^{7,49}.

3.7.2 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, identificar e quantificar de forma inequívoca o ativo de interesse na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa ou componentes presentes como diluentes, placebos, impurezas^{1,49,38,39}.

Portanto, a seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, e que possa distinguir o analito avaliado de outras substâncias presentes na amostra^{40,49,38,39}.

Existem várias maneiras de validar a seletividade, pode ser um teste para análise cromatográfica demonstrando a falta de resposta do analito na solução branco³⁹, avaliar o tempo de retenção de picos oriundos de sistema, diluente e matriz, garantindo resolução com os picos de interesse sendo capaz de identificar se os picos são puros³⁸.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método^{38,49}. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas⁴⁹.

Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse³⁷.

A avaliação da seletividade pode ser através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão^{1,39}, ou através de software específicos e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro^{37,39}. O método de adição padrão também

pode ser aplicado para os estudos de seletividade, porém este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse e para atingir o nível necessário de seletividade, pode ser necessária a combinação de dois ou mais métodos analíticos de identificação¹.

3.7.2.1 Avaliação de homogeneidade espectral

A RDC 53/2015⁵ da ANVISA - que dispõe dos parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências – preconiza que análises críticas do perfil de degradação do IFA devem contemplar a verificação da pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo no medicamento, e também, a avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento⁵.

Neste contexto, o Guia 04/2015⁶, traz que a pureza do pico principal deve ser avaliada, mesmo nos métodos de impurezas, para assegurar que não há coeluição de alguma impureza com o ativo, o que acarretaria na não-detecção desta impureza, mesmo que haja balanço de massas dentro de uma faixa aceitável, o que não elimina a possibilidade de coeluição de alguma impureza com o ativo, principalmente considerando a provável semelhança estrutural entre o produto de degradação e o ativo⁵.

Com base nisto, verifica-se a importância da realização da avaliação da homogeneidade espectral do pico principal e as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. Portanto, a utilização de testes de pureza de pico com auxílio de detector de arranjo de diodos são apresentados no estudo de degradação forçada (EDF) para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente, tendo em vista que a seletividade do método foi validada para o pior cenário possível, que é o possível aparecimento de todos os produtos de degradação⁵.

3.7.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer a área do pico ou altura do pico pode ser usada como função de resposta, definir a relação linear com a concentração conhecido como modelo de calibração^{1,37,39,50} resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação^{1,37,49,51}.

A linearidade é determinada por soluções de diferentes concentrações, abrangendo a faixa de trabalho⁵¹. Geralmente no mínimo cinco níveis de concentração (incluindo a

amostra zero) sejam aplicados na construção da curva analítica, deve-se ser descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e a regressão linear da curva³⁹. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear^{37,39,52}. A análise de regressão normalmente utiliza o método comum (por exemplo, método dos mínimos quadrados^{39,51}) assume que a variação da resposta é constante, independentemente de a concentração de analito (homoscedasticidade)⁴⁸

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão³⁷. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99^{1,51} e o INMETRO um valor acima de 0,90⁵³. Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida.

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão^{1,39,50}. A ANVISA especifica um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas^{1,54}.

A sensibilidade deve ser incluída na curva e demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica^{51,50}. não é considerada um parâmetro de validação nas diretrizes oficiais de alguns órgãos como ANVISA¹. No entanto, a sensibilidade é representada de forma indireta pela descrição da equação obtida através da regressão linear da curva analítica³⁹.

3.7.4 Precisão

Representa a concordância de resultados entre ensaios independentes, replicados de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado^{1,37,49,39}.

Métodos que identificam e quantificam compostos grande quantidades como de doseamento requerem um desvio padrão relativo de 1 a 2%⁴⁹. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade¹.

3.7.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade são as condições em que resultados independentes são obtidos com: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local, reagentes, analistas e repetições em um curto intervalo de tempo^{1,39,51}.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intra-corrída^{39,52} e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD)^{1,52}.

A ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado^{1,50}.

3.7.4.2 Precisão intermediária

Indica a resposta das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destas condições^{1,38,50}.

A finalidade da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ICH e ANVISA para o cálculo de repetitividade descrita acima. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD)^{1,50}.

3.7.4.3 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.)^{1,52}.

É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum, em estudos colaborativos. Frequentemente, altas variações são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método³⁷.

3.7.5 Exatidão

A taxa de recuperação absoluta do método analítico é medida como a resposta do padrão da matriz após o tratamento de pico, expressa como uma porcentagem da resposta do padrão puro, o padrão não foi pré-tratado como a amostra e indica se o método fornece

uma resposta aos analitos presentes⁴⁰ e deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método encontrados em relação a um valor aceito como verdadeiro e é expressa em porcentagem^{1,37,49}.

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão), na maioria das vezes a baixa recuperação na exatidão está atribuída a uma precisão insuficiente^{49,48,38} é então determinado a cada concentração, avaliando o acordo entre as concentrações medidas e nominais dos analitos nas amostras matriciais livres de drogas enriquecidas^{49,38}.

A ICH⁶ e ANVISA¹ estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração, ou seja, 3 pontos nos níveis baixo, médio e alto deve ser aplicado^{1,39,49}. Os materiais mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: padrão de referência química; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão⁴⁸.

3.7.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) expressa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada^{1,39,49}. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído¹, método baseado em parâmetros da curva analítica.

3.7.7 Limite de quantificação

Os limites de quantificação (LQ) ou faixa dinâmica de trabalho de um método bioanalítico representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida que pode ser determinado com precisão aceitável utilizando um determinado procedimento experimental^{1,37,39,49}.

Há muita preocupação sobre os termos relacionado à capacidade de testar baixas concentrações, uma avaliação freqüentemente utilizado é sensibilidade³⁸. Esse critério é uma boa regra a ser seguida, porém não se deve esquecer que a determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas³⁷. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser aplicada para o LQ³⁷. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação sinal/ruído 10:1^{1,38}.

3.7.8 Robustez

De acordo com o INMETRO⁵³, a robustez de um método (“*robustness*”) mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros^{1,37,55,53}. O ICH⁷ recomenda a avaliação da robustez (*robustness*) no desenvolvimento do método³⁹. A robustez de um método pode ser avaliada por estudando o efeito eventual de diferentes conjuntos de condições do método. Isso é feito através validação cruzada, como: a diferença de desempenho cromatográfico entre colunas da mesma especificação, variação de concentração de fase móvel, pH, temperatura da coluna, bem como o tempo de extração, agitação, fluxo da fase móvel, entre outros^{1,37,38,39,53}.

Trata-se de um teste que permite não só avaliar a variação do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão e seletividade aceitáveis^{1,37,53}, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento. Em trabalhos nos quais há mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação das metodologias, sem alteração significativa nos resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise^{37,55}.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Método Farmacopeia Mexicana de Dipirona Sódica - Substâncias Relacionadas⁵⁶

Fase Móvel: Misturou metanol:água:trietilamina (50:50:0,025), após filtrou e desgaseificou

Solução de 4-metilaminoantipirina: Preparou uma solução de 4-Metilaminoantipirina contendo 200 µg/mL em metanol.

Preparação da referência: Pesou uma quantidade de metamizol sódico equivalente a 40 mg de metamizol sódico monoidratado em um balão volumétrico, dissolveu em 40 mL de metanol, adicionou 2mL da solução de 4-metilaminoantipirina, ajustar o menisco com metanol e agitar. Essa solução contém 400 µg/mL de metamizol sódico monohidratado e 4 µg/mL de 4-metilaminoantipirina.

Preparação da amostra: Pesar não menos que 10 comprimidos, calcular o peso médio e triturar até se obter fino pó, pesou uma quantidade de pó equivalente a 200 mg de metamizol sódico monoidratado, passou o conteúdo para uma balão volumétrico de 100mL,

adicionou 50mL de metanol e filtrou com papel filtro. Passou uma alíquota de 20mL dessa solução para um balão volumétrico de 100mL e ajustou o menisco com metanol.

Condições do equipamento: Detector de luz UV; comprimento de onda 254 nm; precoluna de 5cm de comprimento, empacotada com C18 e tamanho de partícula de 3 µm a 10 µm de diâmetro interno; Coluna de aço inoxidável de fase reversa de C18 25cm x 4,6 mm e tamanho de partícula, 3 µm a 10 µm de diâmetro interno e fluxo de 0,3 mL/min.

4.2 Método Farmacopeia Britânica de Dipirona Sódica - Substâncias Relacionadas²⁴

Fase Móvel: Preparou-se uma mistura de metanol, 6 g/L de fosfato de sódio monoidratado e trietilamina nas proporções 28:72:1 v/v e ajustou o pH para 7,0 com hidróxido de sódio concentrada.

Solução teste: Dissolveu 50 mg da matéria-prima de Dipirona Monoidratada em metanol e ajustou o menisco para 10mL com o mesmo solvente.

Solução referência (a): Dissolveu 5 mg da Metamizole Impurity A CRS em metanol e ajustou o menisco para 10 mL com o mesmo solvente.

Solução referência (b): Diluiu 1 mL da solução referência (a) para 50 mL com a fase móvel, em seguida usou 1 mL dessa solução para dissolver o conteúdo de um vial de metamizole impurity E CRS.

Solução referencia (c): A fim de preparar a impureza C no local, dissolveu 40 mg da matéria-prima em metanol, diluiu para 20mL com o mesmo solvente e ferver sob refluxo por 10 min. Deixou resfriar em temperatura ambiente e diluiu para 20mL com metanol.

Solução referência (d): Diluiu 1 mL da solução referencia (a) para 100mL com metanol Coluna: C18 0.05m x 4.6mm e 1.8 µm de tamanho de partícula. Fluxo de 1,0 mL/min, detector 254 nm, volume de injeção 5 µL e tempo de corrida de 4,5 vezes o tempo de retenção de Dipirona.

4.3 Padrões e amostras

Foram utilizados padrões certificados de dipirona e impurezas orgânicas como: (Dipirona Sódica monoidratada 99,9% Farmacopéia Brasileira (CAS: 68-89-3); 4-(formylamino)-1,5-dimethyl-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-3-one, (Impureza A) 99,03% Farmacopéia Européia EP (CAS: 1672-58-8); 4-amino-1,5-dimethyl-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-3-one (Impureza B) 98,0% TRC (CAS: 83-07-8); 1,5-dimethyl-4-(methylamino)-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-3-one (Impureza C) 99,5% FELIM (CAS: 519-98-2); 1,5-dimethyl-4-(dimethylamino)-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-3-one (Impureza D) 98,0%

TRC (CAS: 58-15-1); [(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino]methanesulfonic acid (4-N-desmethylmetamizole) (Impureza E) 99,4% PGS (CAS: 117-38-4) e amostras foram cordialmente disponibilizadas pela empresa Prati donaduzzi Ltda.

4.4 Equipamentos

O desenvolvimento e validação do método analítico foi realizado no equipamento de cromatografia líquida de alta performance com detecção por UV-Visível (HPLC-DAD) da marca Shimadzu® (Japão) é constituído por uma controladora (CBM-30A), uma bomba quaternária (LC-30AT), degaseificador (DGU-30As), amostrador automático (SIL-30AC), detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M30A) e software Empower® 3.

4.5 Solventes

Todos os sais e solventes utilizados na cromatografia foram grau HPLC. Para a solução tampão foi utilizada água ultra pura (MilliQ®, Millipore®), fosfato de sódio monohidratado, Acetonitrila e Metanol grau HPLC (Bio-grade®), Sulfato de sódio, hidróxido de sódio e cloreto de ferro III (Synth®), peróxido de hidrogênio 35% e ácido clorídrico 36-38% (Neon®), ácido fosfórico e dimetilformamida (Scharlau®) e trietilamina (Sigma®).

4.6 Ajuste de sistema cromatográfico

Coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 100 mm x 4,6 mm (5,0 µm) condicionada a temperatura de 15 °C; 1,0 mL/min de fluxo de fase móvel; 2 µL de volume de injeção; 254 nm UV-Vis.

4.7 Preparo das soluções

4.7.1 Diluyente

Foi realizado uma mistura de 50 g/L de sulfato de sódio em metanol e homogeneizado. Esta solução ficou em repouso por 5 minutos afim de que todo o sal fique precipitado no fundo do frasco. Para o preparo das amostras e padrões foi utilizado apenas o sobrenadante, tomados os devidos cuidados evitando assim, que o sal fosse transferido junto com o solvente para as amostras.

4.7.2 Tampão

A solução tampão foi constituída de 1,20 g de fosfato de sódio monobásico dissolvido em 1000 mL de água purificada, após a completa solubilização filtrou-se em membrana hidrofílica. Em seguida adicionou 1 mL de trietilamina a solução e homogeneizou. O pH foi ajustado para 7,0 com ácido fosfórico 85%.

4.7.3 Curva analítica

Pesou 12,5 mg do padrão de Dipirona Sódica para um balão volumétrico de 10 mL, adicionou 7,5 mL de dimetilformamida (grau HPLC) e levou ao ultrassom sem aquecimento por 1 minuto para completa solubilização, após completou o menisco do balão volumétrico com diluente. Desta solução pipetou 136 μL para um balão de 20 mL, adicionou 15 mL de dimetilformamida (grau HPLC) e completou o menisco do balão com diluente, pipetou-se 136 μL desta solução para um balão volumétrico de 20 mL, adicionou 15 mL de dimetilformamida (grau HPLC) e ajustou o mesnico com diluente. Antes da injeção no equipamento, filtrou em membrana PET 0,22 μm . A concentração obtida foi de 8,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.7.4 Amostra

Pesou 85 mg de amostra (matéria-prima de dipirona sódica monoidratada) e transferiu para um balão volumétrico de 10 mL, adicionou 7,5 mL de dimetilformamida (grau HPLC) e levou ao ultrassom sem aquecimento por 1 minuto para completa solubilização. Após, ajustou o mesnico do balão volumétrico com diluente e filtrou em membrana PET 0,22 μm obtendo a concentração final de 8500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.7.5 Sensibilidade do sistema

Para garantir que o sistema mantenha-se apto para realizar a análise é necessário garantir que o mesmo possua detecção para níveis no limite de detecção da amostra, ou seja, a 0,03% de 8500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para o preparo da solução sensibilidade foi transferido 3,0 mL da solução preparada para a curva analítica de concentração 8,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para um balão volumétrico de 10 mL, adicionou 5,0 mL de dimetilformamida (grau HPLC) e ajustou o mesnico com diluente e antes da injeção, filtrou em membrana PET 0,22 μm obtendo a concentração final de 2,55 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Obs.: As soluções da curva analítica, amostras e sensibilidade do sistema foram acondicionadas em temperatura de 5 °C.

4.7.6 Solução de impurezas

Para avaliação da resolução e separação das impurezas e da dipirona, preparou-se uma solução com todas as impurezas no limite da especificação de 0,05 % para as impurezas A, B e D, 0,15 % para a impureza E e 0,5 % para a impureza C da concentração da amostra de dipirona ($8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Pesou 2,5 mg das impurezas A, B e D para balão volumétrico de 100 mL, adicionou 75 mL de dimetilformamida, solubilizou e ajustou o menisco com diluente para obter uma concentração de $25,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em outros dois balões volumétricos de 10 mL dissolveu 2,5 mg das impurezas C e E separadamente em 7,5 mL de dimetilformamida e ajustou o menisco com diluente obtendo uma concentração de $250,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em um balão volumétrico de 5 mL pesou 42,5 mg de matéria prima de dipirona, adicionou 255 μL da solução impureza E [$250 \mu\text{g.mL}^{-1}$], 850 μL da solução impureza C [$250 \mu\text{g.mL}^{-1}$] e 850 μL solução impureza A, B e D [$25,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$] dissolveu em 1,8 mL de dimetilformamida e ajustou o menisco com diluente. [dipirona] = $8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, [impureza A, B e D] = $4,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, [impureza C] = $42,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e [impureza E] = $12,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.8 Preparo da seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada submetendo as amostras dos fabricantes 1 e 2 em condições de estresse forçado. Foram expostas a agentes degradantes como: hidróxido de sódio (NaOH 1,0M coletado imediatamente), ácido clorídrico (HCL 0,02M reagindo durante 6 minutos), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,3% reagindo durante 6 minutos), cloreto de ferro III (FeCl₃ 4,0mM reagindo por 24 horas), térmico (60°C durante 10 dias), úmido (40 °C a 70 %UR durante 10 dias) e fotolítico (2 ciclos de 41 horas – tempo de calibração actinométrica com intensidade de 1,2 milhões lux/hora).

Devido a estabilidade da molécula frente ao solvente dimetilformamida, foram preparadas duas soluções estoques dos fabricantes 1 e 2 dissolvidas apenas com diluente resultando em uma concentração de $17000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ cada. Após o preparo das soluções estoques foram transferidas alíquotas de 2,5 mL para dois balões volumétricos de 5 mL e ajustado o menisco com dimetilformamida, resultando em 2 amostras controles com concentração de $8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona. Para avaliação dos teores das amostras foi transferido um alíquota de 1,47 mL de cada solução a $8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para dois balões volumétricos de 10 mL, adicionado 75% do volume de dimetilformamida e 25% de diluente, resultando em duas soluções amostras a $1249,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As soluções amostras degradadas em NaOH foram transferidas alíquotas de 2,5 mL das soluções estoques para dois balões volumétricos de 5 mL, adicionado 0,5 mL de NaOH 5,0 M e imediatamente ajustado o menisco com dimetilformamida, resultando em 2

amostras degradadas em uma concentração final de NaOH 1,0 M e 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona cada. Para avaliação dos teores das amostras foram transferidos uma alíquota de 1,47 mL de cada solução a 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para dois balões volumétricos de 10 mL, adicionado 75% do volume de dimetilformamida e 25% de diluente, resultando em duas soluções amostras a 1249,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As soluções amostras degradadas em HCl foram transferidas alíquotas de 2,5 mL das soluções estoques para dois balões volumétricos de 5 mL, adicionado 0,5 mL de HCl 0,1 M, manteve-se a solução protegida da luz e a temperatura ambiente durante 6 minutos e após o período de reação foi ajustado o menisco com dimetilformamida, resultando em 2 amostras degradadas em uma concentração final de HCl 0,02 M e 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona cada. Para avaliação dos teores das amostras foram transferidos uma alíquota de 1,47 mL de cada solução a 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para dois balões volumétricos de 10 mL, adicionado 75% do volume de dimetilformamida e 25% de diluente, resultando em duas soluções amostras a 1249,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As soluções amostras degradadas em H_2O_2 foram transferidas alíquotas de 2,5 mL das soluções estoques para dois balões volumétricos de 5 mL, adicionado 0,15 mL de H_2O_2 5,0 %, manteve-se a solução protegida da luz e a temperatura ambiente durante 6 minutos e após o período de reação foi ajustado o menisco com dimetilformamida, resultando em 2 amostras degradadas em uma concentração final de H_2O_2 0,3 % e 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona cada. Para avaliação dos teores das amostras foram transferidos uma alíquota de 1,47 mL de cada solução a 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para dois balões volumétricos de 10 mL, adicionado 75% do volume de dimetilformamida e 25% de diluente, resultando em duas soluções amostras a 1249,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As soluções amostras degradadas em FeCl_3 foram transferidas alíquotas de 2,5 mL das soluções estoques para dois balões volumétricos de 5 mL, adicionado 0,20 mL de FeCl_3 50 mM, manteve-se a solução protegida da luz e a temperatura ambiente durante 6 minutos e após o período de reação foi ajustado o menisco com dimetilformamida, resultando em 2 amostras degradadas em uma concentração final de FeCl_3 4,0 mM e 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona cada. Para avaliação dos teores das amostras foram transferidos uma alíquota de 1,47 mL de cada solução a 8500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para dois balões volumétricos de 10 mL, adicionado 75% do volume de dimetilformamida e 25% de diluente, resultando em duas soluções amostras a 1249,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As amostras acondicionadas na forma de pó nas condições térmica, úmida e fotolítica foram preparadas pesando 85 mg de amostras dos fabricantes 1 e 2 para dois balões volumétricos para cada condição, adicionado 75 % de dimetilformamida e ajustado o menisco com diluente, resultado em 2 amostras degradadas em cada condição com

concentração de $8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona. Para avaliação dos teores das amostras foi transferido um alíquota de 1,47 mL de cada solução a $8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para balões volumétricos de 10 mL, adicionado 75% do volume de dimetilformamida e 25% de diluente, resultando em soluções amostras degradadas a $1249,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.9 Preparo da linearidade

A linearidade foi verificada através da análise de uma curva analítica com nove níveis de concentração e três réplicas em cada nível, compreendendo um intervalo de 0,03% a 0,60% de dipirona e para as impurezas C e E com cinco níveis de concentração e três réplicas cada, compreendendo um intervalo de 0,03% a 0,60% e 0,03% a 0,18%, respectivamente da concentração nominal da solução amostra a ($8500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), abrangendo a concentração de 2,55 a $51,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de dipirona. Todas as soluções foram dissolvidas com 75 % de dimetilformamida e 25% de diluente.

4.10 Preparo da precisão/exatidão

Para avaliação de desvio padrão e recuperação a precisão e exatidão foi verificada através de nove determinações contemplando os níveis baixo, médio e alto (0,03 %, 0,05 % e 0,06 %) para impurezas inespecíficas, (0,03 %, 0,15 % e 0,18 %) para a impureza E e (0,03 %, 0,50 % e 0,60 %) para a impureza C dentro de um intervalo do limite de quantificação a 120% da especificação para as impurezas inespecíficas e específicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento do método analítico

Inicialmente em um desenvolvimento de método é necessário realizar uma pesquisa bibliográfica e avaliar os métodos já existentes na literatura. Diversas farmacopéias trazem em seus compêndios oficiais as monografias do insumo farmacêutico ativo dipirona sódica. A farmacopeia Brasileira dispõem ensaios como acidez e alcalinidade, metais pesados, doseamento por titulação e dentre outros testes, porém não possui método para a identificação e quantificação de impurezas orgânicas. Já nas farmacopéias Mexicana e Britânica apresentam métodos para este fim. Portanto, foram testadas as monografias da farmacopeia Mexicana e Britânica avaliando a seletividade das mesmas.

5.1.1 Farmacopeia Mexicana

O método foi testado e avaliado quanto a seletividade da dipirona e suas respectivas impurezas. Como pode observar na Figura 3, a impureza E (impureza específica) possui eluição no mesmo tempo de retenção que o ativo de interesse a dipirona. Diante desse resultado, pode-se comprovar que o método não é seletivo, demonstrando coeluição entre os dois picos avaliados e não sendo possível a identificação e quantificação com precisão e exatidão da impureza E e do insumo ativo dipirona.

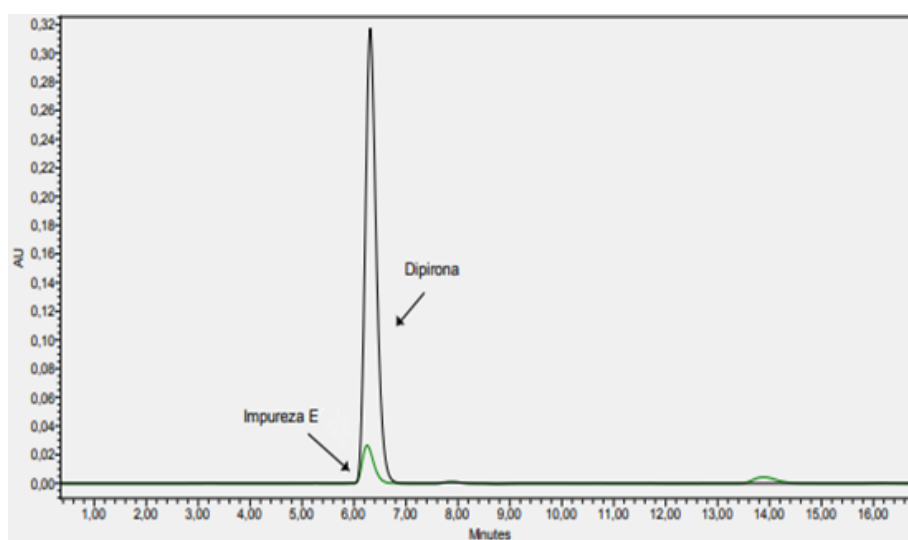


Figura 3 – Cromatograma sobreposto a solução de impureza E e da solução amostra de dipirona sódica monoidratada

Na Figura 4 refere-se ao gráfico purity plot extraído do software Empower 3 utilizado para tratar os dados cromatográficos e avaliação de pureza de pico e verifica-se a confirmação da coeluição dos picos de dipirona e da impureza E.

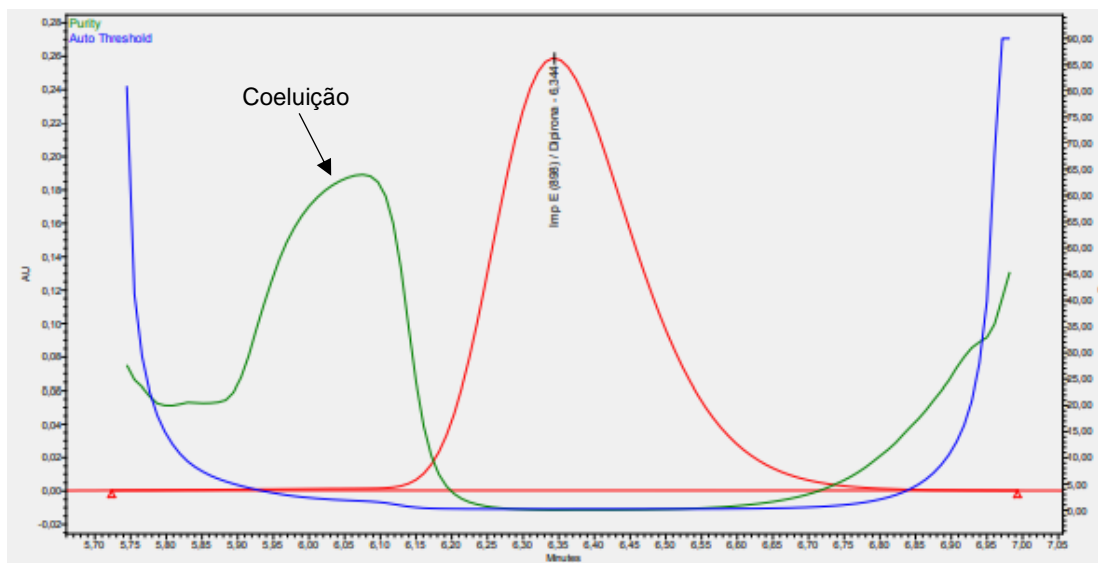


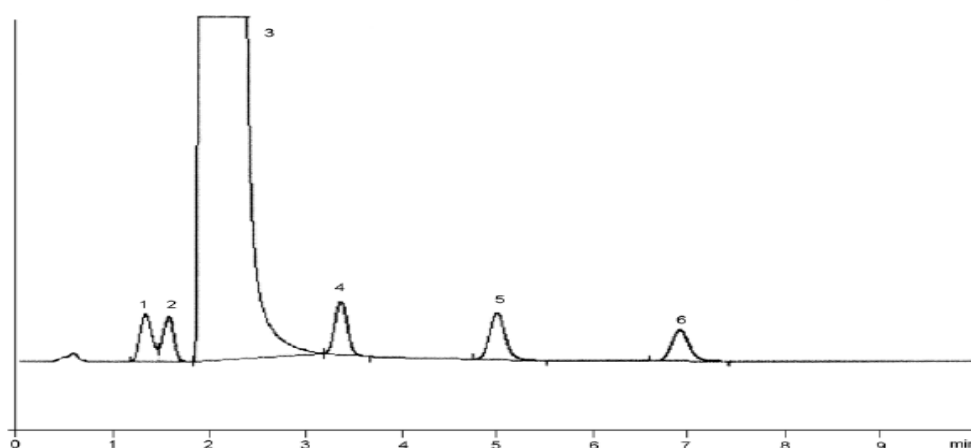
Figura 4 – Gráfico de pureza cromatográfica – purity plot do pico de Dipirona coelindo com a impureza E

5.1.2 Farmacopeia Britânica

O método presente na farmacopeia Britânica traz um cromatograma como base para posterior reprodução Figura 6.

METAMIZOLE SODIUM MONOHYDRATE Metamizolum natriicum monohydricum

The following chromatogram is shown for information but will not be published in the European Pharmacopoeia.



1. impurity A 2. impurity E 3. metamizole 4. impurity B 5. impurity C 6. impurity D

Figure 1346.-1. – Chromatogram for the test for related substances: solution of metamizole spiked with impurities A, B, C, D and E

Figura 5 – Cromatograma da amostra de dipirona com adição das impurezas orgânicas específicas e inespecíficas da farmacopeia Britânica¹¹

Foi realizado testes para avaliar a reprodutibilidade e seletividade do método analítico presente na farmacopéia britânica e constatou impurezas que não possui retenção, ou seja, elui no tempo morto, segue a Figura 7.

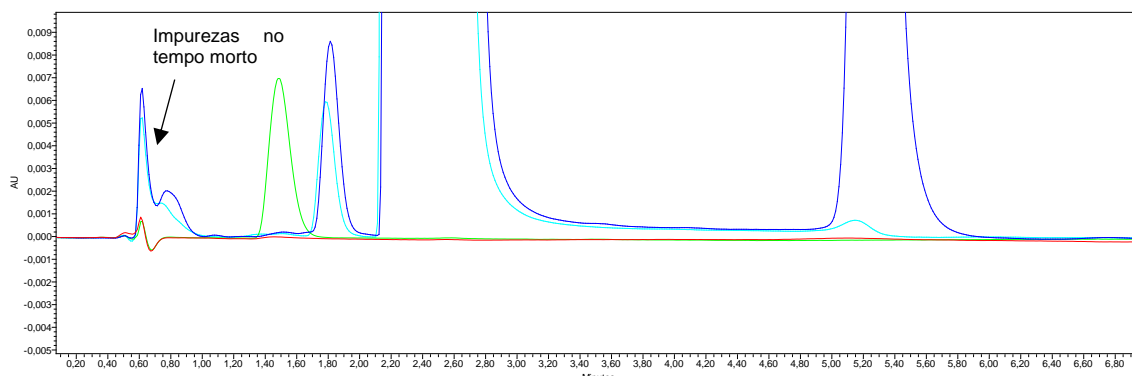


Figura 6 – Cromatograma da amostra de dipirona sobreposto com as impurezas orgânicas e com o diluente - farmacopéia Britânica

Obseva-se que o cromatograma do diluente (em vermelho) não possui eluição de nenhum pico e no cromatograma da amostra e das impurezas orgânicas possui eluição de um pico mais intenso em aproximadamente 0,6 minutos, indicando que o método não é capaz de separar e reter todos os picos provenientes de impurezas derivadas da dipirona. Portanto, o método não é seletivo para análise de impurezas orgânicas de Dipirona.

Diante dos resultados insatisfatórios com as monografias da farmacopéia mexicana e britânica, iniciou-se o desenvolvimento de um novo método partindo da monografia farmacopeia britânica que mesmo não sendo adequada foi o método avaliado que apresentou melhores resultados. Foram realizados alguns ajustes como: coluna com aumento do tamanho da partícula de 1,8 μm para 5,0 μm , tampão fosfato de sódio monobásico com alteração na concentração do sal, mudança na composição do diluente, gradiente de fase móvel e temperatura da coluna.

5.1.3 Testes de gradiente

Inicialmente foi realizado teste de gradiente para obter maior retenção e separação de todas as impurezas, garantindo assim que nenhum composto de interesse elua no tempo morto. Foi preparado uma solução mix com 11 impurezas conhecidas como utilizadas na síntese da matéria prima, como intermediário ou impurezas específicas e inespecíficas de dipirona. A proposta do teste se baseia em separar todas as 11 impurezas.

5.1.3.1 Gradiente 1

No primeiro teste de gradiente Tabela 2, iniciou-se com uma concentração de 90% de tampão e diminuindo gradualmente a 30% em 30 minutos, ajustando proporcionalmente a porcentagem de metanol no sistema e por fim voltando a concentração inicial para a estabilização do sistema, a fim de avaliar a interação das moléculas com cada solvente.

Tabela 2 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Canal A Tampão (%)	Canal B Metanol (%)
0	1,0	90	10
30	1,0	30	70
35	1,0	30	70
36	1,0	90	10
40	1,0	90	10

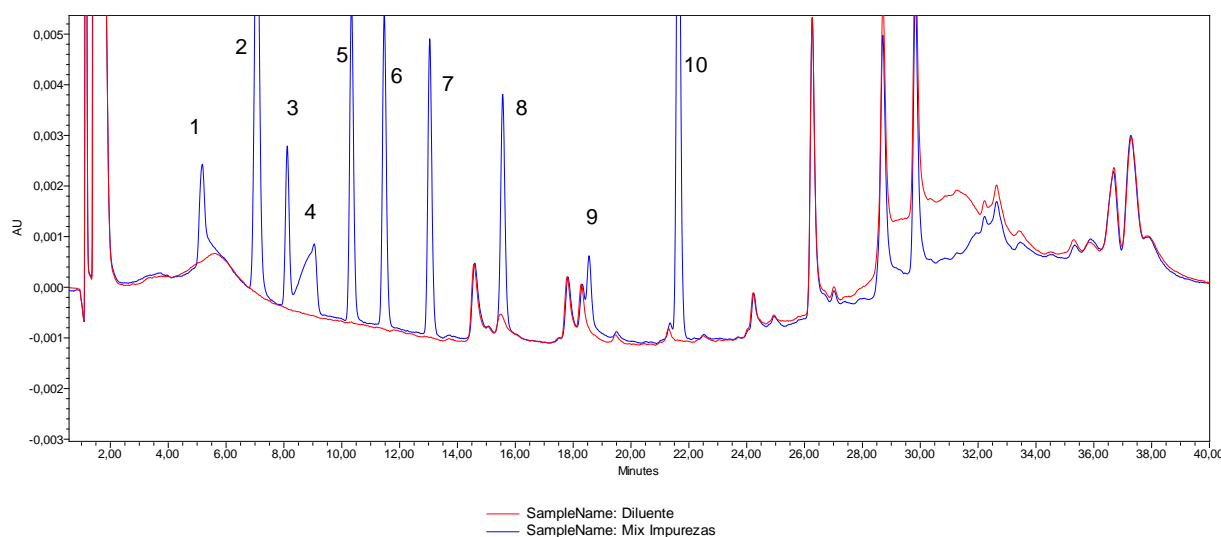


Figura 7 – Cromatograma sobreposto do mix de impurezas com a solução diluente (metanol 100%)

Como visto na Figura 8, possui impurezas que não separam completamente e coelindo com picos do diluente, foi feito mais testes diminuindo a rampa do gradiente para obter separação dos picos.

5.1.3.2 Gradiente 2

No segundo teste de gradiente Tabela 3, alterou-se a porcentagem do meio da rampa do sistema de tampão e diminuindo gradualmente até 50% em 30 minutos, ajustando proporcionalmente a porcentagem de metanol e por fim voltando a concentração inicial para a estabilização do sistema. O intuito desse gradiente é aumentar a interação com a solução tampão que é composta com concentração maior de água e sal fosfato pH 7,0.

Tabela 3 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Canal A Tampão (%)	Canal B Metanol (%)
-------------	-------------------------------	--------------------	---------------------

0	1,0	90	10
30	1,0	50	50
35	1,0	50	50
36	1,0	90	10
40	1,0	90	10

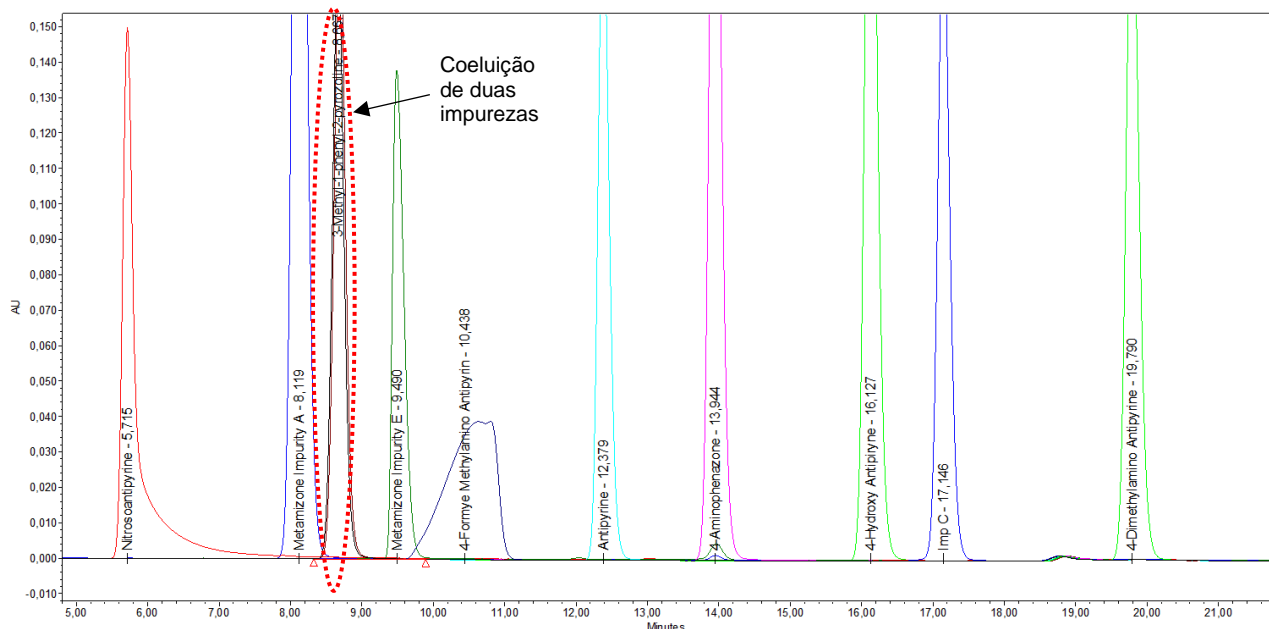


Figura 8 – Cromatograma sobreposto do mix de impurezas com a solução diluente (metanol 100%)

Na Figura 9 pode-se verificar melhor separação das impurezas com a diminuição da rampa do gradiente. A solução mix não tinha contaminação com a matrix de dipirona, portanto não foi possível avaliar a interferência da matrix na separação das impurezas com o ativo. Também pode verificar no cromatograma que não obteve sucesso na separação de 2 impurezas pois coeluem em aproximadamente 9 minutos.

Após os dois testes de gradiente, optou por separar apenas as impurezas específicas e inespecíficas as quais a farmacopéia Britânica trata e que são impurezas prováveis de surgir na matéria prima ou produto acabado que são as impurezas A, B, C, D e E.

5.1.3.3 Gradiente 3

No terceiro teste de gradiente Tabela 4, alterou-se a porcentagem do meio da rampa do sistema de tampão e diminuindo gradualmente até 60% em 30 minutos, ajustando proporcionalmente a porcentagem de metanol e por fim voltando a concentração inicial para a estabilização do sistema. O intuito desse gradiente é aumentar mais ainda a interação com a solução tampão que é composta com concentração maior de água e sal fosfato pH 7,0.

Tabela 4 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Canal A Tampão (%)	Canal B Metanol (%)
0	1,0	90	10
30	1,0	60	40
35	1,0	60	40
36	1,0	90	10
40	1,0	90	10

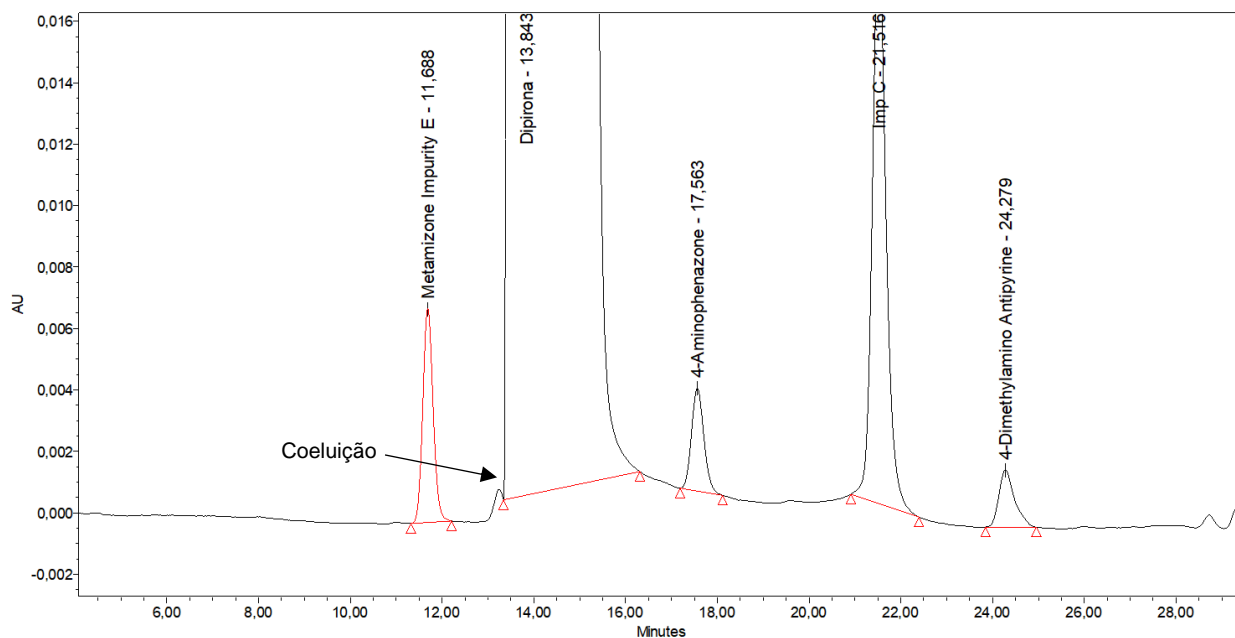


Figura 9 – Cromatograma da amostra de dipirona 8500 µg.mL⁻¹ solubilizada em diluente (metanol 100%) e contaminada com as impurezas A, B, C, D e E

Com a matrização da amostra com a dipirona e as impurezas, não obteve separação completa das impurezas. Observa-se coeluição da impureza A com o a dipirona Figura 10.

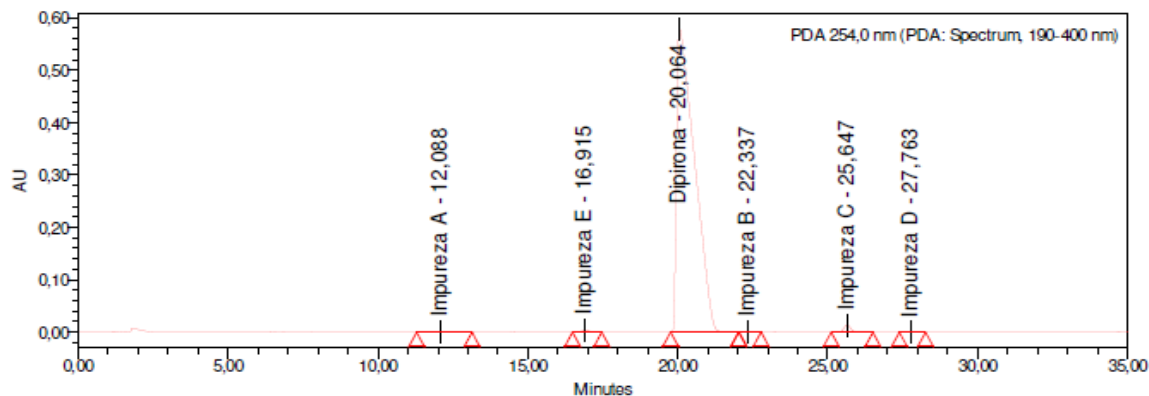
5.1.3.4 Gradiente 4

No segundo teste de gradiente Tabela 5, alterou-se a porcentagem do meio da rampa do sistema de tampão e diminuindo gradualmente até 85% em 5 minutos mantendo o sistema isocrático até 12 minutos e após depois diminuindo de forma gradual novamente até 60% em 30 minutos, ajustando proporcionalmente a porcentagem de metanol e por fim voltando a concentração inicial para a estabilização do sistema. O intuito desse gradiente é aumentar a separação da impureza A que no gradiente anterior estava coelindo com a Dipirona.

Tabela 5 – Gradiente para teste de separação das impurezas de Dipirona

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Canal A Tampão (%)	Canal B Metanol (%)
0	1,0	95	5

5	1,0	85	15
12	1,0	85	15
30	1,0	60	40
31	1,0	95	5
35	1,0	95	5



Resultados

	Nome	TR (min)	Tipo Integ.	Área ($\mu V \cdot \text{sec}$)	k	N	Fc	R	S/N	Pur. Pico (Angle)	Pur. Pico (Threshold)	Teor Ind. (%)	Manual
1	Impureza A	12,088	BB	22005	11,09	780	1,23			3,442	13,626	100,000	No
2	Impureza E	16,915	BB	63273	15,91	21146	1,05	5,38	6,87	0,389	1,614	100,000	No
3	Dipirona	20,064	BB	24101404	19,06	4103	3,31	3,66	1258,90	0,073	0,263	100,000	No
4	Impureza B	22,337	BB	20298	21,34	42495	1,15	2,69	1,71	0,987	3,909	100,000	No
5	Impureza C	25,647	BB	225359	24,65	59027	1,11	7,61	29,08	0,122	0,629	100,000	No
6	Impureza D	27,763	BB	18061	26,76	65049	1,11	4,96	1,38	1,266	5,029	100,000	No

Figura 10 – Cromatograma da amostra de dipirona 8500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ solubilizada em diluente (metanol 100%) e contaminada com as impurezas A, B, C, D e E – Gradiente 4

Foi realizado um teste com um novo gradiente conforme a Figura 11 e obteve sucesso na separação das 5 impurezas com boa resolução, seletividade e não houve coeluição entre os picos testados.

5.1.4 Testes de estabilidade e diluente

A estabilidade das amostras e os padrões usados devem se manter por um determinado tempo para que se tenha resultados confiáveis e reprodutíveis. Se uma solução não for estável em temperaturas ambientes, a diminuição da temperatura ou a troca do diluente pode ser necessárias para aumentar a estabilidade das amostras e padrões.

Em certos tipos de amostras, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem das amostras, devido a alta instabilidade frente a solventes e temperatura. Conhecendo a estabilidade dessas soluções, a análise pode ser finalizada antes de ocorrer a degradação do ativo.

Diversos artigos, trabalhos científicos e monografias oficiais da farmacopeia britânica trazem como diluente o metanol 100% ou mistura de metanol e água; uma das características do fármaco dipirona são grupos funcionais potencialmente reativos que a

torna bastante susceptível a degradação por reações de hidrólise. Diante desse problema foram feitos testes com alguns solventes como água (H₂O), metanol (MeOH) e dimetilformamida (DMF) para se obter um diluente que estabilize a molécula, ou seja, não favoreça a degradação da mesma.

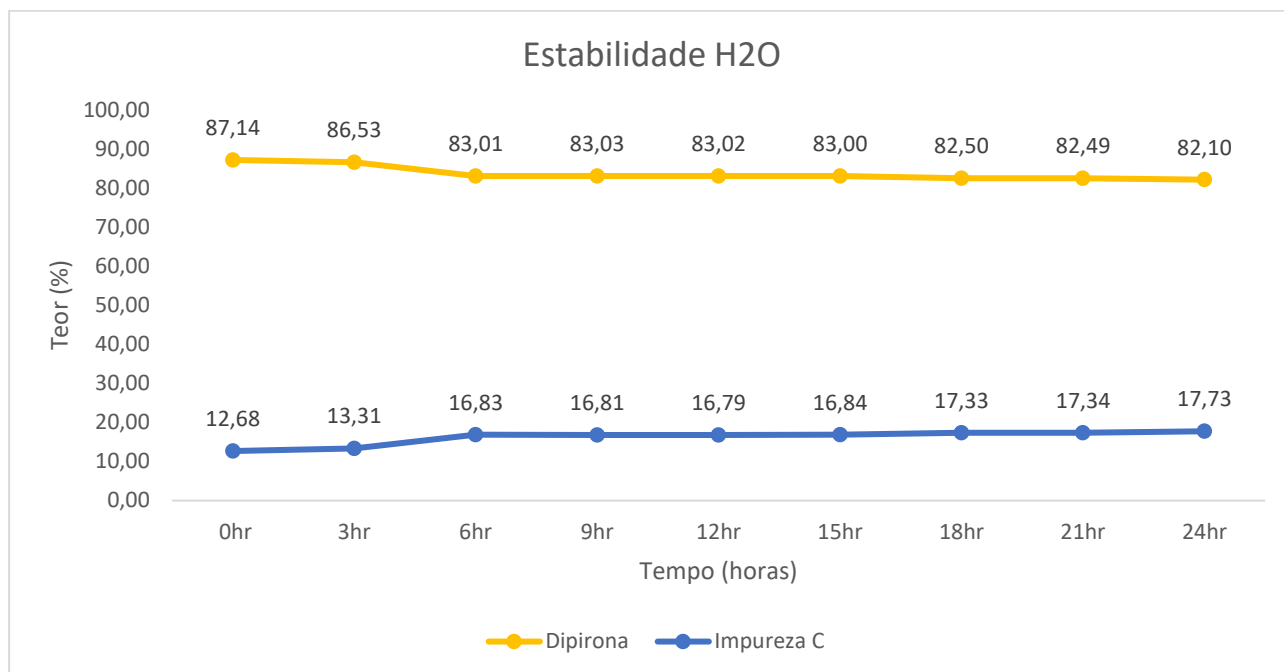


Figura 11 - Teste de estabilidade da amostra exposta a diluente 1 (H₂O)

Na Figura 12 apresenta as amostras que foram solubilizadas em água e imediatamente a dipirona degradou tendo recuperação de 87,14% e aumento de 12,68% da impureza C. Ao longo de 24 horas a molécula continuou a decair e aumentar proporcionalmente a impureza C resultado em 82,10% de dipirona e 17,73 da impureza C.

Estabilidade da amostra

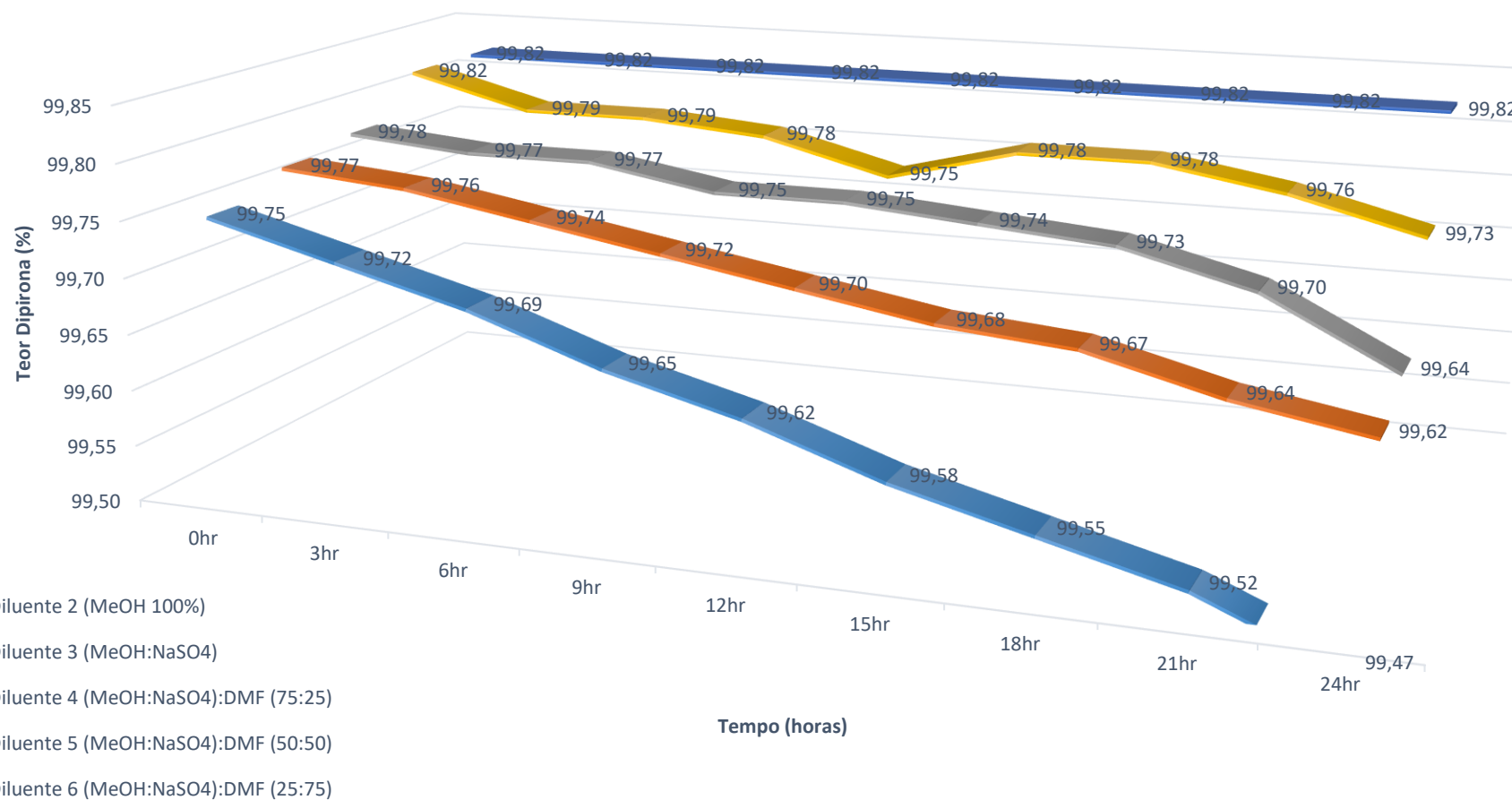


Figura 12 – Resultados de teor de dipirona obtidos nos testes de estabilidade da amostra exposta à diluente 2 (MeOH 100%), Diluente 3 (MeOH:NaSO4), Diluente 4 (MeOH:NaSO4):DMF (75:25), Diluente 5 (MeOH:NaSO4):DMF (50:50) e Diluente 6 (MeOH:NaSO4):DMF (25:75).

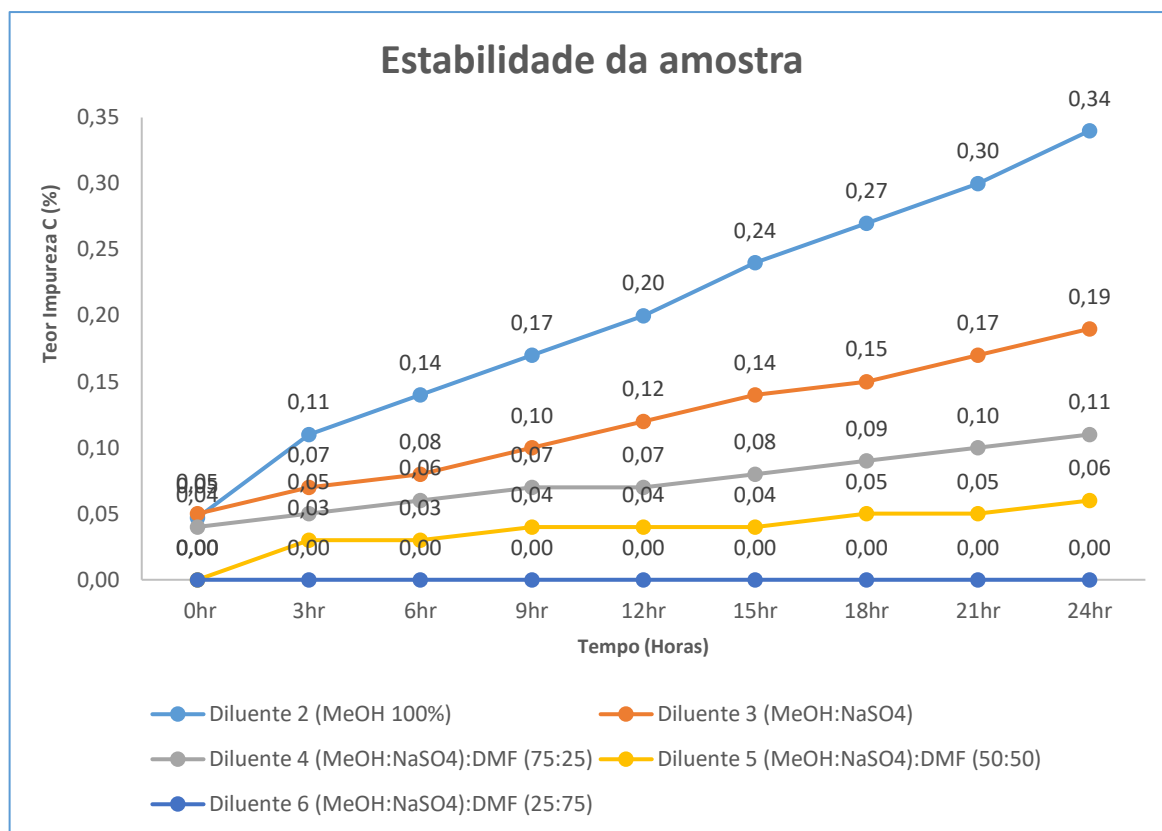


Figura 13 - Resultados de teor da impureza C obtidos nos testes de estabilidade da amostra exposta à diluente 2 (MeOH 100%), Diluente 3 (MeOH:NaSO₄), Diluente 4 (MeOH:NaSO₄):DMF (75:25), Diluente 5 (MeOH:NaSO₄):DMF (50:50) e Diluente 6 (MeOH:NaSO₄):DMF (25:75).

O solvente metanol apresenta em sua composição aproximadamente 0,05% de água e foi realizado teste com a amostra solubilizada em metanol 100% para verificar possível degradação da molécula e pode observar na Figura 13 e 14 a degradação da dipirona para 99,52% e com um aumento para 0,34% da impureza C conforme o tempo de exposição de 24 horas ao solvente. O diluente 3 demonstra o preparo do diluente com a adição de sulfato de sódio em metanol na proporção de 50g/L, um sal muito utilizado como agente dessecante para a retirada de água de óleos ou solventes orgânicos e ainda observou um aumento da impureza C para 0,19% e decaimento da dipirona.

Após a realização dos testes com metanol, iniciou testes com dimetilformamida que é um solvente apolar aprótico na intenção de diminuir a reação com a molécula de dipirona. Preparou-se 3 diluentes nas proporção de (75:25), (50:50) e (25:75) de metanol dessecado com sulfato de sódio e dimetilformamida que corresponde a diluente 4, 5 e 6, respectivamente. Conforme o aumento da proporção do solvente de dimetilformamida pode observar a estabilidade da molécula frente ao diluente, Figuras 13 e 14. Por fim, o melhor resultado para a estabilização da dipirona testado em 24 horas foi a proporção de (25:75) (diluente 6), a qual observa-se que não ouve mudança na recuperação de dipirona e nem aumento de produtos de degradação.

5.1.5 Robustez

As variações testadas foram: tempo de extração, estabilidade de padrão e amostra, fluxo da fase móvel, temperatura da coluna, pH da solução tampão e membrana filtrante.

As alterações analíticas foram comparadas frente ao método pré-determinado seguindo o gradiente 4 aprovado no item 5.5.3, o diluente 6 aprovado no item 5.5.4, preparo de soluções, amostras e sistema cromatográfico descritos no item 4.0. Analisando quantitativamente através do cálculo da recuperação de dipirona à 0,05% da solução teste para a avaliação no limite das impurezas inespecíficas, a recuperação da impureza C à 0,50% e da impureza E 0,15% da solução teste para a avaliação das impurezas específicas. Esta avaliação se refere a comprovação da robustez conforme os critérios de exatidão, demonstrando que a alteração proposta não resulta em diferença significativa na quantificação dos analitos de interesse.

Os impactos qualitativos das alterações realizadas, foram avaliados a pureza espectral na amostra disposta a condição térmica a 60 °C por 10 dias de exposição, não se utilizou uma solução de degradação da dipirona sódica em condição mais agressiva devido a sua rápida cinética de degradação e não sendo possível controlar a perda da molécula e formação de produtos secundários durante a análise.

Todos as especificações reportadas nesse trabalho foram baseadas no “Guidelines for standard method performance requirements, AOAC INTERNATIONAL, 2016⁵⁸”

5.1.6 Variação de pH da solução tampão

5.1.6.1 Condição pH 6,8 e pH 7,2

Na Tabela 62 são apresentados os dados referentes aos preparos das amostras conforme a exatidão na condição pré-determinada pH 7,0 e condição testada em pH 6,8 e pH 7,2.

Os dados para as impurezas na solução amostra de dipirona à 0,05%, mostram que não há interferência significativa no sinal analítico de maneira quantitativa quando avaliado em pH 6,8, mas a impureza C e a impureza E na solução amostra contaminada demonstraram fora da especificação, com recuperação de 106% e 125%. Quando avaliado o tampão preparado e ajustado em pH 7,2 apenas a solução amostra contaminada com a impureza E resultou fora da especificação com 107%.

A avaliação qualitativa foi verificado a pureza de pico na solução amostra com concentração de 1249,5 µg.mL⁻¹ exposta a 60°C durante 10 dias. Para que tenha um

resultado puro, o valor de *purity angle* deve ser menor que o valor de *purity threshold* para o pico avaliado. O resultado de *purity angle* foram de (0,022 e 0,020) e *purity threshold* de (0,218 e 0,264) para condição testada com pH 6,8 e pH 7,2, respectivamente, mostrando assim que não há coeluição de produtos de degradação, impurezas ou outros picos que não sejam de interesse, indicando uma boa separação cromatográfica.

Tabela 6 - Avaliação quantitativa condição pré-determinada pH 7,0 e testadas pH 6,8 e pH 7,2.

Amostra	Analito	Teor - pH 7,0 (%)	Teor - pH 6,8 (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Sol. amostra contaminada -	Impureza C	99	105	106	95 - 105
	Impureza E	102	128	125	
Sol. amostra 0,05%	Dipirona	100	97	97	90 - 107

Amostra	Analito	Teor - pH 7,0 (%)	Teor - pH 7,2 (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Sol. amostra contaminada -	Impureza C	99	95	94	95 - 105
	Impureza E	102	105	107	
Sol. amostra 0,05%	Dipirona	100	103	103	90 - 107

5.1.7 Variação da vazão da fase móvel

5.1.7.1 Condição 0,9 mL/min e 1,1 mL/min

Na Tabela 63 são apresentados os dados referentes aos preparos das amostras conforme a exatidão na condição pré-determinada de fluxo 1,0 mL/min e condição testada em fluxo 0,9 mL/min e 1,1 mL/min

Os dados para as impurezas na solução amostra de dipirona à 0,05% para as duas condições testadas, mostram que não há interferência significativa no sinal analítico de maneira quantitativa devido a recuperação ficar dentro do esperado, mas a impureza C e a impureza E na solução amostra contaminada resultaram em recuperações fora da especificação.

Os resultados de *purity angle* foram de (0,018 e 0,032) e *purity threshold* de (0,215 e 0,210) para as variações de vazão de fase móvel de 0,9 mL/min e 1,1 mL/min, respectivamente, mostrando também que não há coeluição de produtos de degradação, impurezas ou outros picos que não sejam de interesse, indicando uma boa separação cromatográfica.

Tabela 7 - Avaliação quantitativa condição pré-determinada fluxo 1,0 mL/min e testadas 0,9 e 1,1 mL/min.

Amostra	Analito	Teor - Fluxo 1,0 mL/min (%)	Teor - Fluxo 0,9 mL/min (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Sol. amostra contaminada -	Impureza C	99	104	103	95 - 105
	Impureza E	102	110	112	
Sol. amostra 0,05%	Dipirona	100	104	104	90 - 107

Amostra	Analito	Teor - Fluxo 1,0 mL/min (%)	Teor - Fluxo 1,1 mL/min (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Sol. amostra contaminada -	Impureza C	99	108	107	95 - 105
	Impureza E	102	128	131	
Sol. amostra 0,05%	Dipirona	100	95	95	90 - 107

5.1.8 Variação de temperatura do forno

5.1.8.1 Condição 13 °C e 17 °C

Na Tabela 64 são apresentados os dados referentes aos preparos das amostras conforme a exatidão na condição pré-determinada de temperatura do forno de 15 °C e condição testada em temperatura 13 °C e 17 °C.

As duas condições testadas, indicaram que não há interferência no sinal analítico de maneira quantitativa para a dipirona à 0,05% e impureza C à 0,50% demonstrando recuperação dentro do especificado, mas a impureza E resultou em recuperações fora da especificação.

Os resultados de *purity angle* foram de (0,009 e 0,015) e *purity threshold* de (0,190 e 0,225) para as variações de temperatura de forno de 13 °C e 17 °C, respectivamente, mostrando também que não há coeluição de produtos de degradação, impurezas ou outros picos que não sejam de interesse, indicando uma boa separação cromatográfica.

Tabela 8 - Avaliação quantitativa condição pré-determinada temperatura do forno de 15 °C e testadas 13 °C e 17 °C.

Amostra	Analito	Teor - Temp. do forno 15 °C (%)	Teor - Temp. do forno 13 °C (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Sol. amostra contaminada -	Impureza C	99	98	97	95 - 105
	Impureza E	102	115	117	
Sol. amostra 0,05%	Dipirona	100	107	107	90 - 107

Amostra	Analito	Teor - Temp. do forno 15 °C (%)	Teor - Temp. do forno 17 °C (%)	Recuperação (%)	Especificação (%)
Sol. amostra contaminada -	Impureza C	99	96	95	95 - 105
	Impureza E	102	110	112	
Sol. amostra 0,05%	Dipirona	100	97	97	90 - 107

5.1.9. Teste de membrana filtrante

A Tabela 5 e 6 mostra a adequação do sistema para o teste de filtro para a variação de filtro na solução padrão e solução amostra. Os teores do pico de dipirona na solução Padrão com diferentes volumes de descarte e diferentes membranas, foram comparadas com a área do pico de dipirona na solução padrão sem filtrar, e a porcentagem de interferência foi calculada, conforme descrito na Tabela 6. Verifica-se que o filtro PET com 0mL de descarte apresentou um teor acima da especificação de 5,0% de variação, portanto, deve-se atentar ao descarte do filtro para não comprometer a recuperação do padrão. Os outros filtros testados, apresentaram dentro da especificação, ou seja, aptos para o uso da filtragem da solução padrão.

Tabela 9 - Resultados da verificação do sistema na solução Padrão

Solução Padrão		
Parâmetros	Experimental	Especificação
DPR (%) - Reinjeções	0,33	≤ 5,0
ERA (%)	0,46	
Solução Sensibilidade	64	≥ 10

Tabela 10 - Teste de filtro solução padrão

Amostra	Filtro	Teor (%)	Varição (%)	Especificação (%)
Sol. Padrão	Sem Filtrar	100,66	-	5,0

PET 0mL	105,90	5,2
PET 2mL	101,37	0,7
PVDF 0mL	104,42	3,7
PVDF 2mL	101,00	0,3
PTFE 0mL	99,85	-0,8
PTFE 2mL	100,91	0,2

A recuperação do pico das impurezas C e E na solução amostra com diferentes volumes de descarte e diferentes membranas, ficaram dentro da especificação pré-determinadas conforme descrito na Tabela 7. Observa-se que todos os filtros testados com 0mL ou 2mL de descarte, apresentaram dentro da especificação para a impureza C e E, portanto, demonstraram aptos para o uso da filtragem da solução amostra.

Tabela 11 - Teste de filtro solução amostra

Amostra	Filtro	Impureza C (%)	Impureza E (%)	Especificação Impureza C (%)	Especificação Impureza E(%)
Sol. amostra	Sem Filtrar	0,023	0,102		
	PET 0mL	0,025	0,102		
	PET 2mL	0,025	0,099		
	PVDF 0mL	0,026	0,102	0,50	0,15
	PVDF 2mL	0,026	0,097		
	PTFE 0mL	0,025	0,096		
	PTFE 2mL	0,026	0,101		

Abaixo, nas Figuras 15 e 16, observa-se a sobreposição dos cromatogramas referentes a solução padrão e a solução amostra que não foi filtrada e as que foram submetidas ao teste de filtro e observa-se que não houve surgimento de picos secundários e nem mudança no perfil cromatográfico.

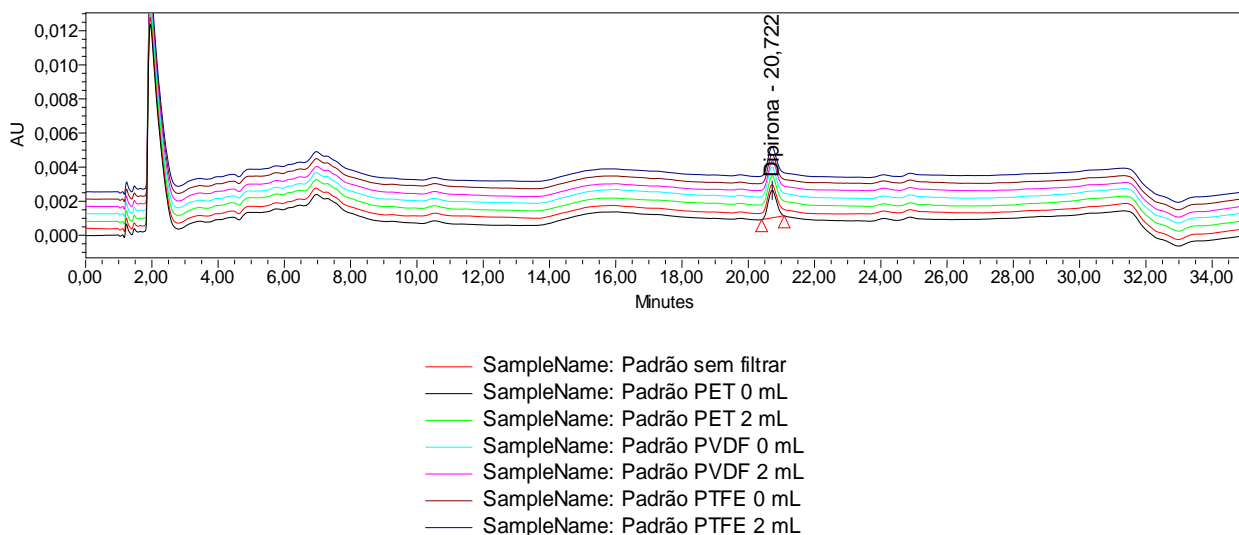


Figura 14 - Overlay dos cromatogramas das Soluções Padrões no teste de filtro

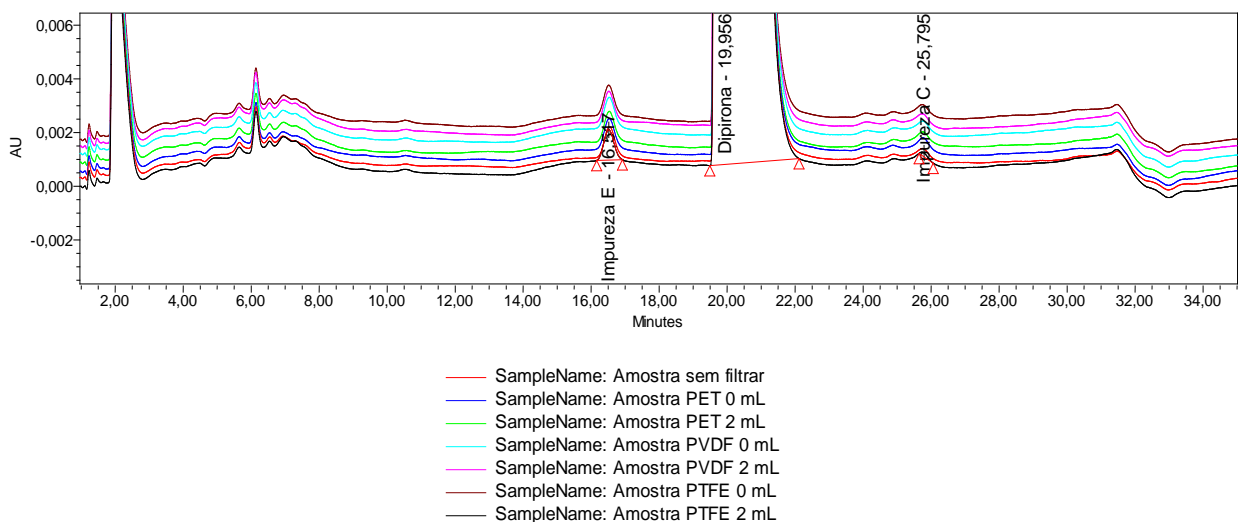


Figura 15 - Overlay dos cromatogramas das Soluções amostras no teste de filtro

Além disso, o teste de filtro foi avaliado quantitativamente para as impurezas inespecíficas utilizando a solução de dipirona à 0,05%, e para as impurezas específicas utilizando uma solução teste contaminada na concentração do ponto médio da exatidão 0,50% e 0,15% para as impurezas C e E, respectivamente.

Os resultados para o teste estão apresentados na Tabela 128, Tabela 9 e Tabela 10. Os dados mostram que todos os filtros são uma alternativa no processo de filtração podendo ser empregado na rotina laboratorial caso haja necessidade, uma vez que todos os critérios de recuperação foram atingidos para as impurezas, bem como o critério de pureza espectral.

Tabela 12 - Teste de filtro para impurezas específicas C - Matéria prima

Amostra	Filtro	Teor (%)	Recuperação (%) ¹	DPR (%) ²
	Sem Filtrar	98	-	-

Sol. amostra contaminada – Impureza C 0,5%	PET 0mL	98	100	0,00
	PET 2mL	99	101	0,72
	PVDF 0mL	99	101	0,72
	PVDF 2mL	99	101	0,72
	PTFE 0mL	98	100	0,00
	PTFE 2mL	99	101	0,72

¹Especificação para a média é de 95 - 105%.

²Especificação para o DRP é de 3,7%.

Tabela 13 - Teste de filtro para impurezas específicas E - Matéria prima

Amostra	Filtro	Teor - Alteração (%)	Recuperação (%)¹	DPR (%)²
Sol. amostra contaminada – Impureza E 0,15%	Sem Filtrar	102	-	-
	PET 0mL	105	103	2,05
	PET 2mL	101	99	0,70
	PVDF 0mL	103	101	0,69
	PVDF 2mL	103	101	0,69
	PTFE 0mL	99	97	2,11
	PTFE 2mL	103	101	0,69

¹Especificação para a recuperação é de 95 - 105%.

²Especificação para o DRP é de 3,7%.

Tabela 14 - Teste de filtro para impurezas inespecíficas – Matéria prima

Amostra	Filtro	Teor - Alteração (%)	Recuperação (%)¹	DPR (%)²
Sol. amostra contaminada – Impureza Inespecífica 0,05%	Sem Filtrar	104	-	-
	PET 0mL	104	100	0,00
	PET 2mL	105	101	0,68
	PVDF 0mL	104	100	0,00
	PVDF 2mL	105	101	0,68
	PTFE 0mL	100	96	2,77
	PTFE 2mL	104	100	0,00

¹Especificação para a média é de 90 - 107%.

²Especificação para o DRP é de 5,3%.

Abaixo, nas Figuras 17, 18 e 19, observa-se a sobreposição dos cromatogramas referentes a solução amostra contaminada com a impureza C a 0,5% e a impureza E 0,15% e Dipirona 0,05% que não foi filtrada e as que foram submetidas ao teste de filtro, observa-se que não houve surgimento de picos secundários e nem mudança no perfil cromatográfico.

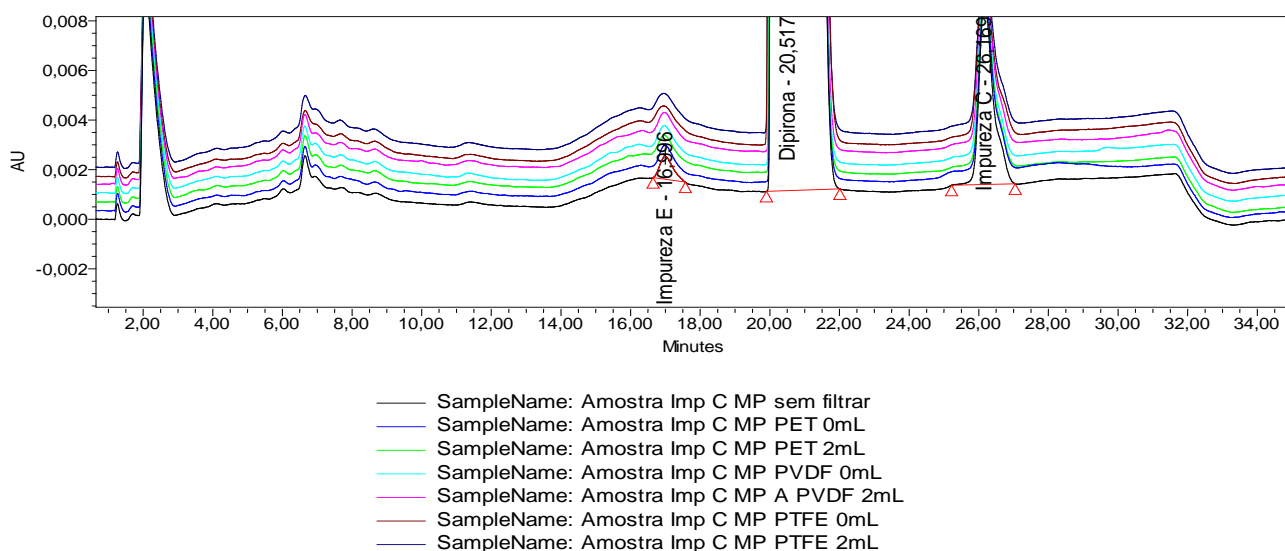


Figura 16 - Overlay dos cromatogramas das robustez de filtro das Solução contaminada – Impureza C

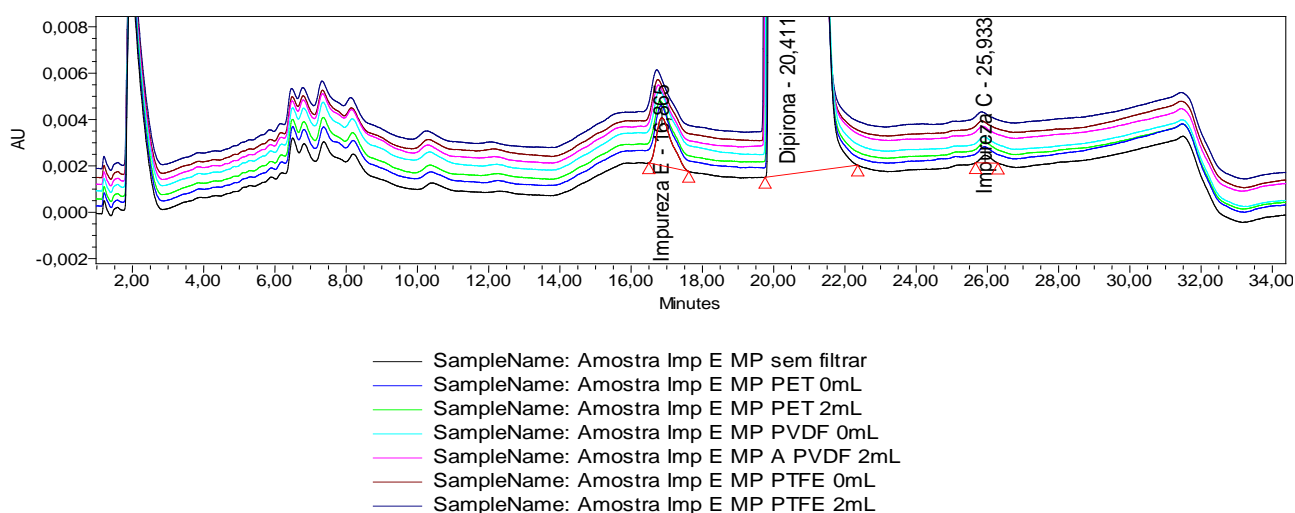


Figura 17 - Overlay dos cromatogramas das robustez de filtro das Solução contaminada – Impureza E

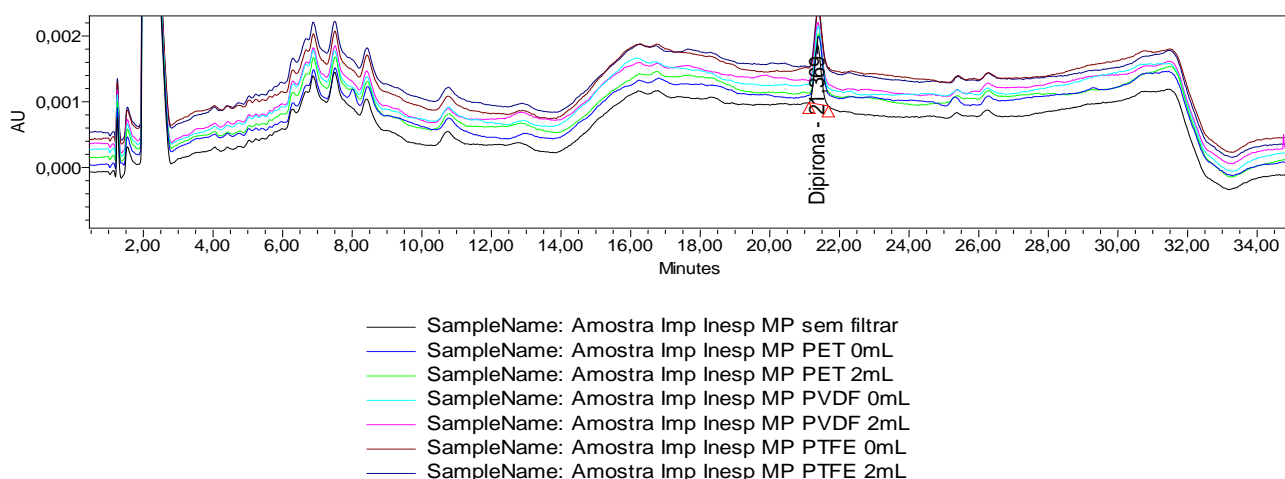


Figura 18 - Overlay dos cromatogramas das robustez de filtro de Dipirona 0,05% - Impureza Inespecíficas

5.1.10. Teste de extração

O teste de extração foi realizado no momento do preparo da solução amostra a concentração de $8,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ variando o tempo de ultrassom. Devido ao fato da molécula

de dipirona apresentar baixa estabilidade química, o preparo da amostra é um fator importante devido ao surgimento de impurezas que podem ser oriundas da degradação do fármaco. A Tabela 15 mostra o teor de impurezas específicas C e E e pode observar que não houve variação significativa entre sem uso de ultrassom, 1 minuto de ultrassom e 3 minutos de ultrassom, não comprometendo a extração do produto e suas impurezas.

Tabela 15 - Avaliação quantitativa de impurezas - teste de extração.

Amostra	Tempo	Teor – Impureza E (%)	DPR (%)	Teor – Impureza C (%)	DPR (%)	
Sol. amostra	Sem Ultrassom	0,12	1,3	0,04	2,0	
		0,12		0,04		
		0,12		0,04		
	1 min Ultrassom – Precisão II	0,13	1,5	0,03	5,0	
		0,13		0,03		
		0,13		0,03		
	3 min Ultrassom	0,13	1,3	0,04	3,5	
		0,13		0,04		
		0,13		0,04		
	Especificação		-	≤ 5,3%	-	≤ 5,3%

5.1.11. Teste de estabilidade

Para a análise da estabilidade do padrão e das amostras, preparou-se uma solução padrão e solução teste conforme o método analítico, com a finalidade de verificar por quanto tempo essas soluções podem ser utilizadas para quantificar as impurezas de Dipirona. O padrão foi injetado no tempo inicial e nos tempos aproximados de 7, 11, 15, 19, 28, 34 e 42 horas. Durante esse tempo, o padrão permaneceu armazenado no rack do equipamento, protegido da luz. Na Tabela 12 verifica-se os resultados da recuperação dos padrões ao longo do tempo, o teor médio dos padrões foi 102,48 % com um DPR de 0,85%, indicando uma boa estabilidade.

Tabela 16 - Avaliação quantitativa dos padrões - teste de estabilidade.

Amostra	Tempo (horas)	Média Padrões (%)	Teor médio (%)	DPR (%)
Sol. padrão	7	101,09	102,48	0,85
	11	102,19		
	15	102,26		

19	103,30
28	101,89
34	103,54
42	103,09

As soluções testes foram injetadas imediatamente após o preparo e depois com aproximadamente 4, 8, 12, 16, 24 e 30 horas novamente. Na tabela 13, comprova que a solução amostra se manteve estável por aproximadamente 30 horas, demonstrando a recuperação dentro da especificação em todas as injeções durante esse período de tempo.

Tabela 17 - Avaliação quantitativa de impurezas - teste de estabilidade.

Amostra	Tempo (horas)	Média Impureza C (%)	Especificação (%)	Média Impureza E (%)	Especificação (%)
Sol. amostra	0	0,02	0,5	0,12	0,15
	4	0,02		0,12	
	8	0,03		0,12	
	12	0,03		0,12	
	16	0,03		0,12	
	24	0,03		0,12	
	30	0,03		0,12	

Abaixo, nas Figuras 20 e 21, observa-se a sobreposição dos cromatogramas referentes a solução padrão e a solução amostra que foram submetidas ao teste de estabilidade, observa-se que não houve surgimento de picos secundários e nem mudança no perfil cromatográfico.

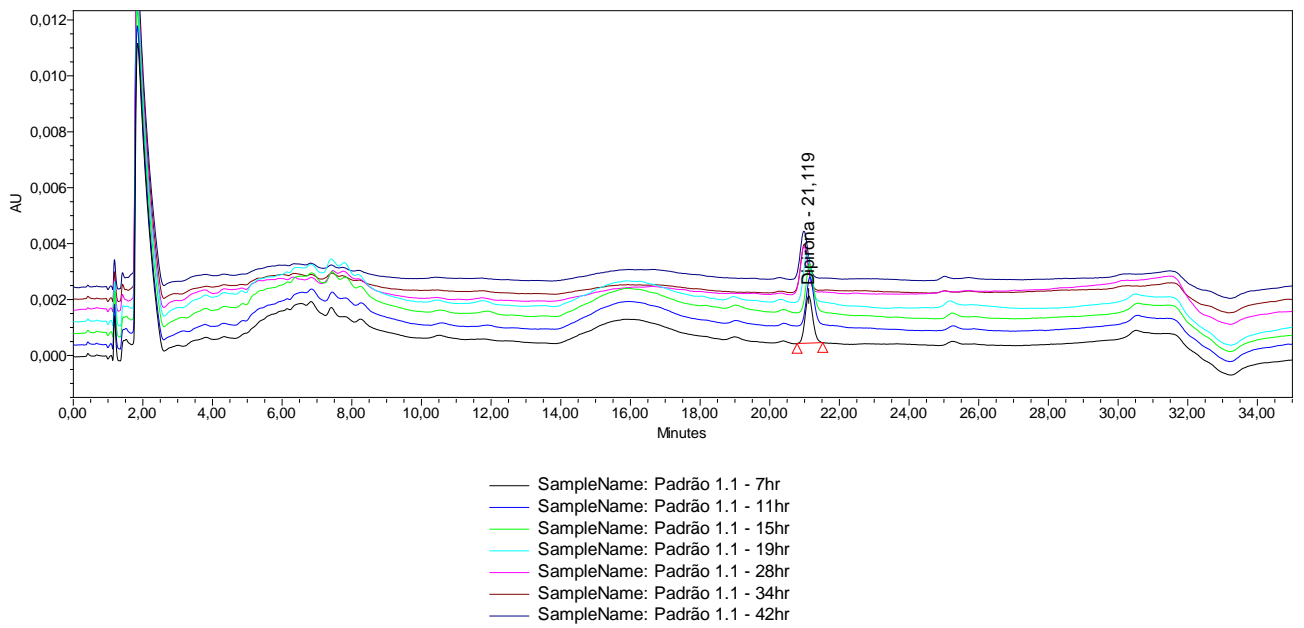


Figura 19 – Solução padrão em diferentes tempos de injeção - estabilidade.

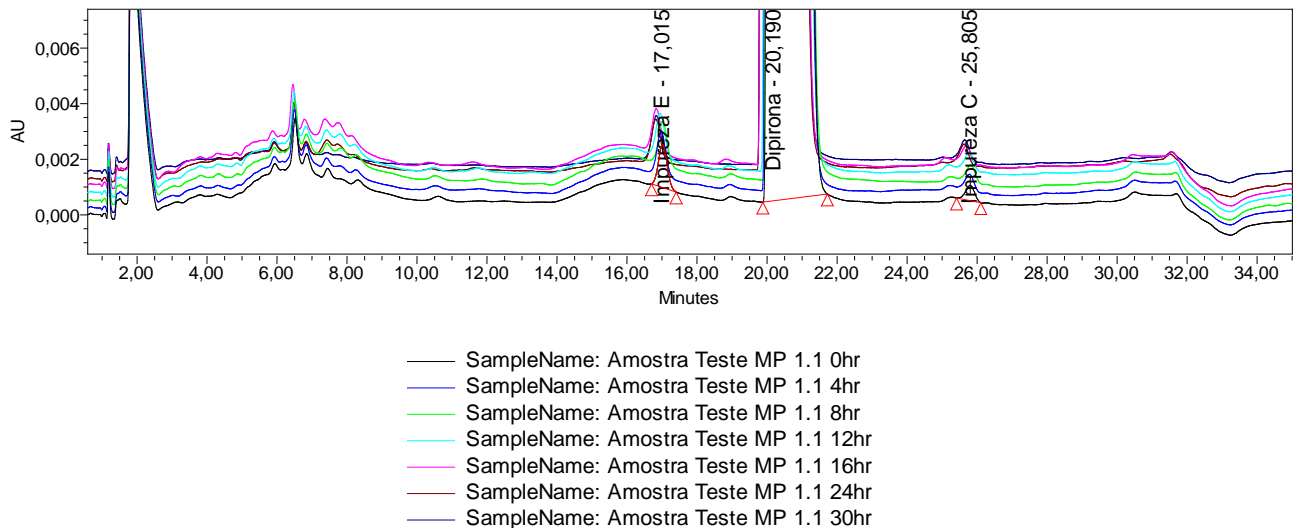


Figura 20 – Solução amostra matéria prima em diferentes tempos de injeção - estabilidade.

Os resultados apresentados demonstraram que o teste de estabilidade do padrão e da amostra não afetou a capacidade do método em determinar quantitativamente e qualitativamente as impurezas específicas e inespecíficas de dipirona. Dessa forma, pode-se afirmar a estabilidade do padrão de 42 horas e da amostra de 30 horas

6. SELETIVIDADE

6.1 Estrutura

A molécula de dipirona possui grupos funcionais: fenil, metassulfonato de sódio, amina terciária e pirazol, que podem ser visualizados na Figura 22. Os grupos mais susceptíveis a decomposição com a degradação forçada são as aminas terciárias e o grupo pirazol.

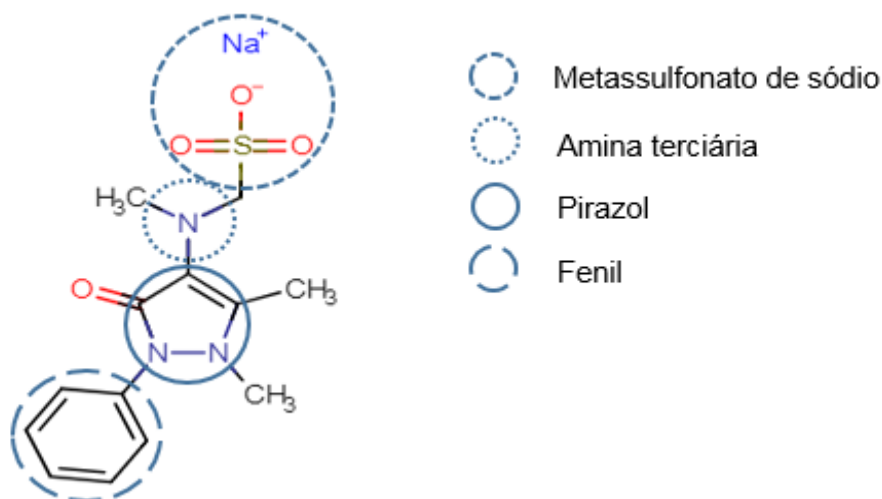


Figura 21 - Estrutura da Dipirona com seus grupos funcionais evidenciados.

6.1.1 Condições de degradação forçada para a estrutura da Dipirona

Para comprovar a seletividade do método a amostra de matéria-prima foi submetida à degradação forçada nas condições mencionadas na Tabela 14.

Tabela 18 – Condições de estresse e tempo de exposição da Dipirona.

Amostra	Condição de estresse	Tempo de exposição
Controle	-	-
Estresse ácido	HCl 0,01 M	6 minutos
Estresse alcalino	NaOH 0,50 M	Imediato
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂ 0,15 %	6 minutos
Estresse íons metálicos	FeCl ₃ 2,0 mM	12 horas
Estresse Fotolítico	1,2 milhões lux/h	Tempo suficiente para 2 ciclos
Estresse Climático	75% U.R. / 40 °C	10 dias
Estresse Térmico	60 °C	10 dias

6.1.2 Avaliação de homogeneidade espectral

Seguindo as recomendações de avaliação de homogeneidade espectral foi comprovada de acordo com as diretrizes do software *Empower*® 3, com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos, capazes de demonstrar a homogeneidade espectral do pico do ativo principal, avaliando todas as soluções (padrões e amostras) através da análise da pureza do pico cromatográfica, a qual verifica se um pico é espectralmente puro comparando-se o valor de *purity angle* (ângulo de pureza) com o de *purity threshold* (limite de pureza). Quando se obtém valores de *purity angle* inferiores a valores de *purity threshold* e as curvas não cruzam no *purity plot* em toda a extensão do pico, o mesmo é considerado espectralmente puro.

Verificou-se que o sinal analítico de dipirona (*Max Plot*) excedeu a faixa dinâmica do detector (Figura 24), a qual o fabricante recomenda estar entre 0,1 a 1 AU. Fora desta faixa, a avaliação da homogeneidade espectral é prejudicada devido à perda de sensibilidade do detector fotométrico.

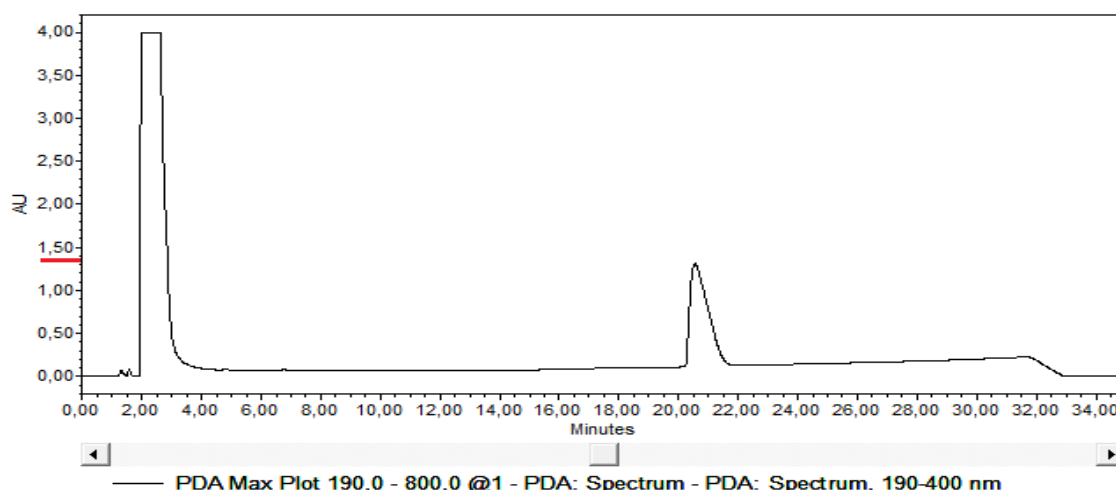


Figura 22 – Cromatograma da solução amostra verificada no Max Plot

Com isso, optou-se em fazer a análise da pureza espectral com a solução amostra de concentração $1249,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em todas as condições testadas, garantindo o sinal analítico da dipirona monoidratada dentro da faixa dinâmica do detector (Figura 25).

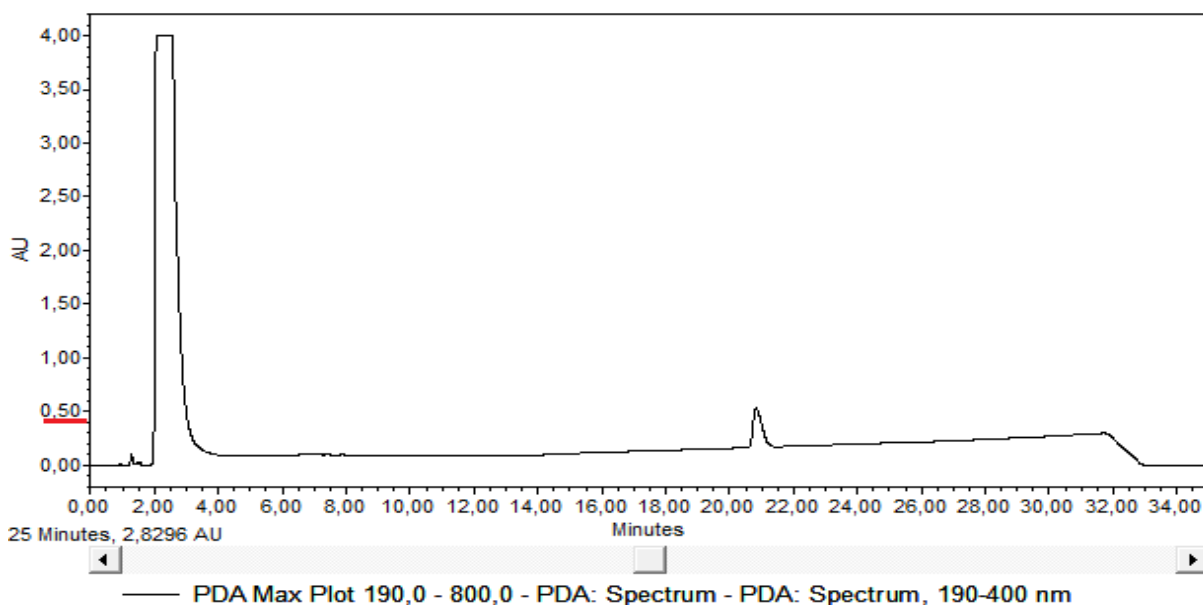


Figura 23 – Cromatograma da solução amostra 1249,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ verificada no Max Plot

O gráfico de *purity plot*, fornecem o valor de pureza, pode ser observado que a linha do *purity angle* não ultrapassa a linha do *purity threshold* no *purity plot* demonstrando a homogeneidade espectral do ativo. A pureza de pico foi avaliada na solução amostra controle e estressada com concentração de 1249,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos parâmetros de pureza apresentados na Figura 26.

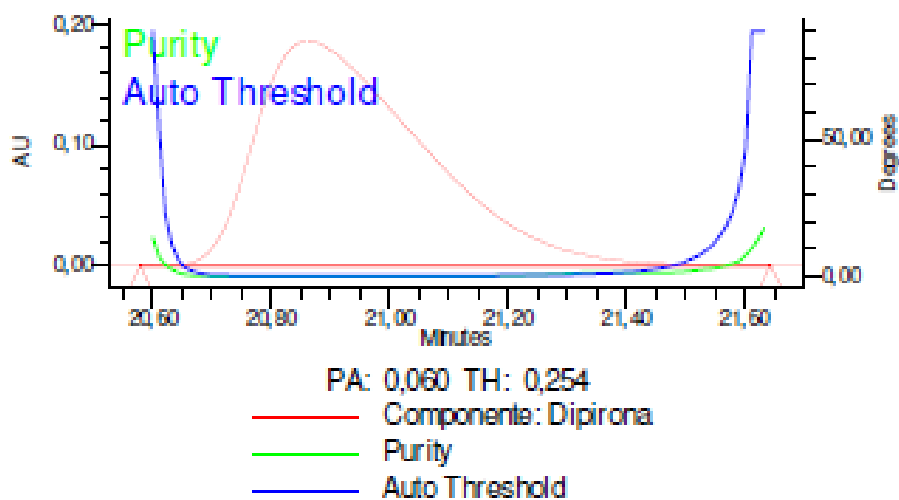


Figura 24 – Purity plot da Solução amostra 1249,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Dipirona Monoidratada para avaliação da homogeneidade espectral

A Figura 27 representa um típico cromatograma obtido com a solução padrão de dipirona, no método analítico em questão, que juntamente com o espectro de absorção no UV do ativo (Figura 28), são utilizados ao longo das análises para identificação do pico do ativo.

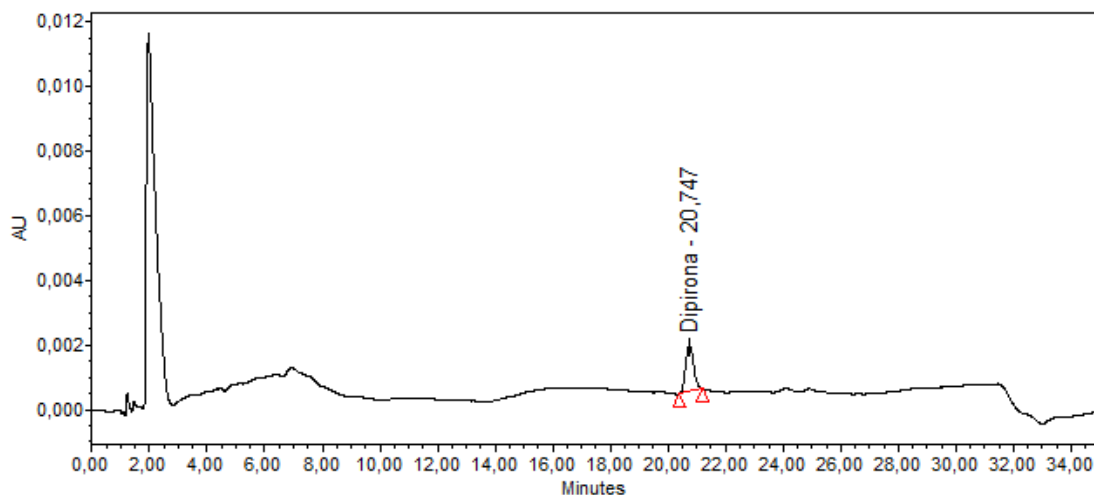


Figura 25 – Cromatograma da solução padrão de Dipirona.

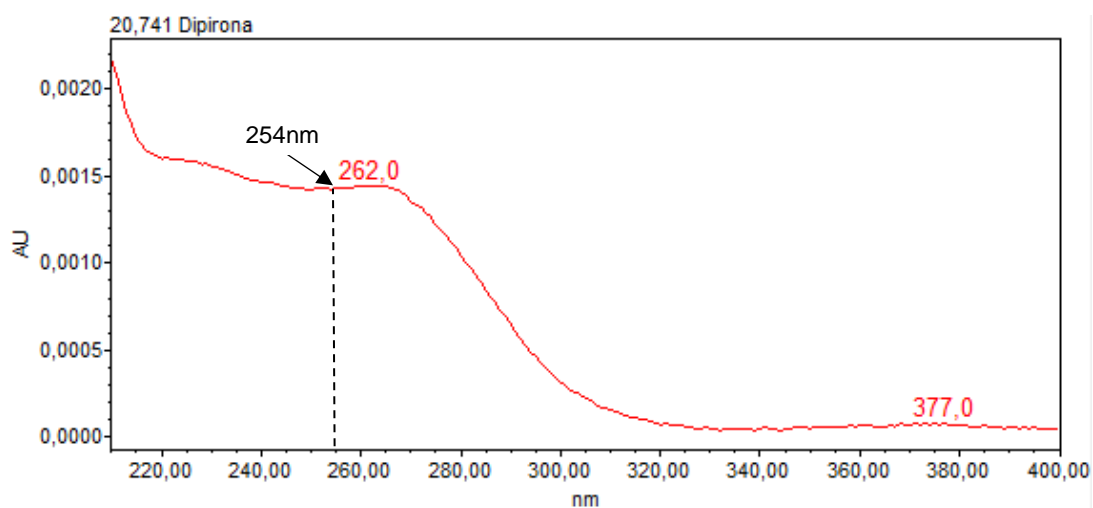


Figura 26 – Espectro de absorção na região UV-Vis para Dipirona na solução padrão.

O intervalo estipulado foi de 210 nm a 400 nm, uma vez que o solvente utilizado na análise, a trietilamina usada na solução tampão possui absorbância significativa antes de 210 nm. O noise spectrum da faixa estipulada (Figura 27) demonstra que não apresenta interferência.

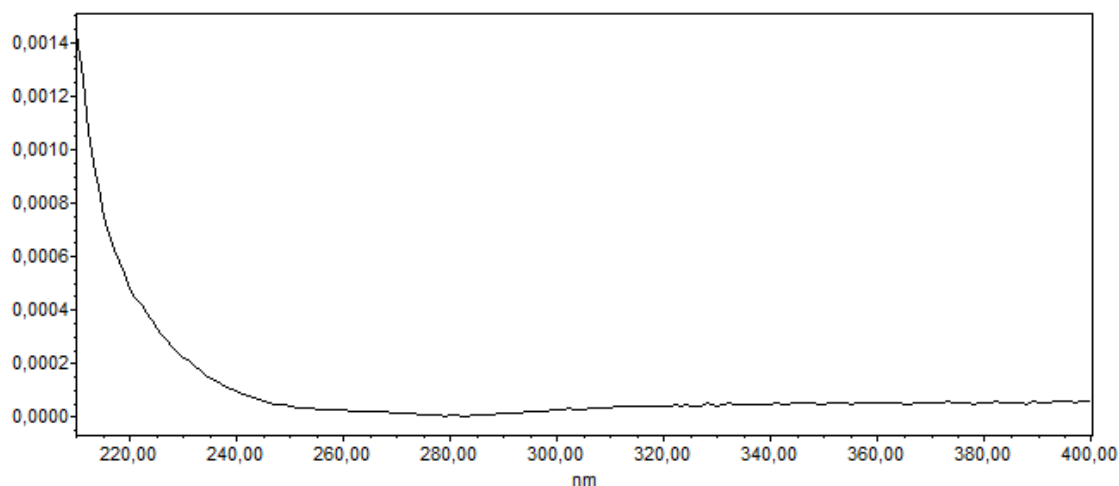


Figura 27 – Espectro de ruído (Noise Spectrum)

Seguem, na Tabela 15, os valores de *purity angle/ purity threshold* para o pico de dipirona nas soluções testes, bem como nas soluções submetidas a estresse químicos e físicos.

Tabela 19 – Resultados da avaliação de pureza de pico para o pico da dipirona na amostra para o fabricante 1 e fabricante 2 (*purity angle/ purity threshold*).

Lote da amostra	Tipo de Amostra	<i>Purity Angle</i>	<i>Purity Threshold</i>
1	Padrão	0,033	0,285
	Amostra Controle	0,037	0,289
	HCl 0,01M	0,034	0,310
	Amostra Controle	0,060	0,254
	NaOH 0,5M	0,044	0,276
	H₂O₂ 0,15%	0,032	0,278
	Amostra Controle	0,033	0,246
	FeCl₃ 2mM	0,040	0,251
	Amostra Controle	0,025	0,222
	Temperatura	0,022	0,218
	Umidade	0,020	0,216
Fotolítico (UV)	0,020	0,216	
2	Amostra Controle	0,033	0,284
	HCl 0,01M	0,039	0,300
	Amostra Controle	0,022	0,248
	H₂O₂ 0,15%	0,041	0,271
	Amostra Controle	0,034	0,247

NaOH 0,5M	0,045	0,258
FeCl₃ 2mM	0,039	0,256
Amostra Controle	0,022	0,219
Temperatura	0,022	0,219
Umidade	0,023	0,218
Fotolítico (UV)	0,022	0,218

Os valores de *purity angle* são menores que os de *purity threshold*, indicando que há homogeneidade espectral.

6.1.3 Amostras de degradação ácida, alcalina, oxidativa e íon metálico

6.1.3.1 Estresse Branco

Na Figura 30, apresenta a sobreposição dos cromatogramas referentes a Solução Branco submetida a estresse em meio ácido, básico, peróxido e íons metálicos (com zoom), observa-se que não houve surgimento de picos secundários e nem mudança no perfil cromatográfico quando comparado com o branco controle.

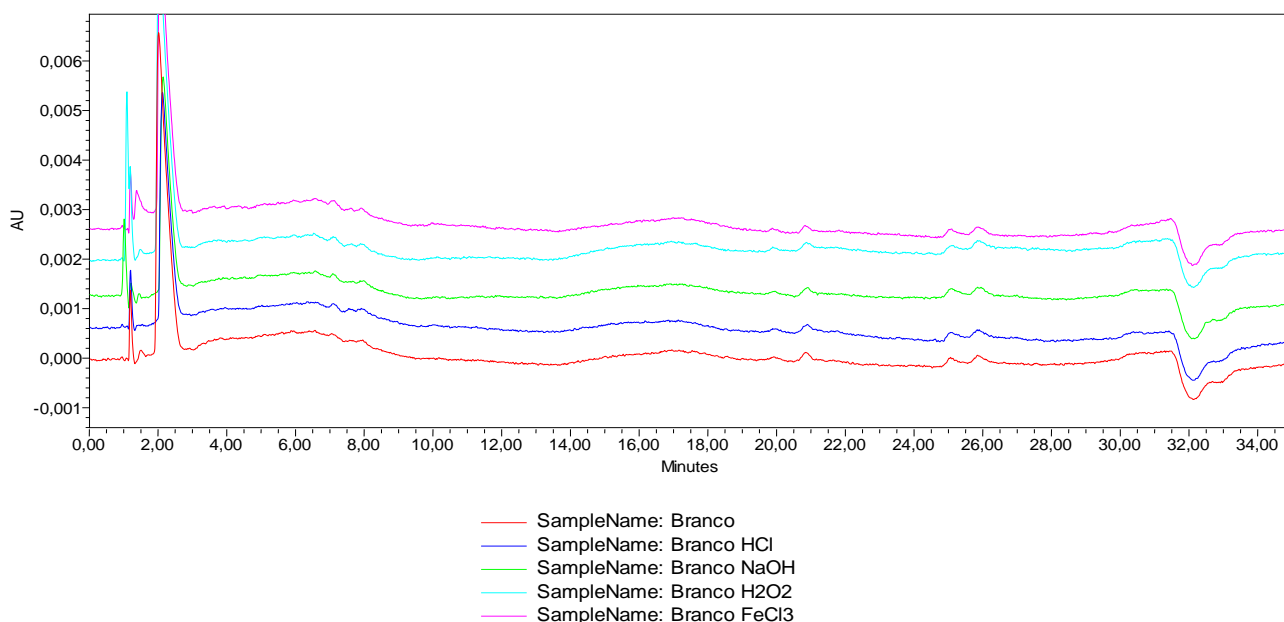


Figura 28 – Sobreposição dos cromatogramas da solução branco exposta a degradação ácida, básica, peróxido e íons metálicos

6.1.3.2 Estresse Ácido – HCl 0,01 M

As amostras de matéria-prima para o fabricante 1 e 2 foram mantidas sob estresse ácido com HCl 0,01 M por 6 minutos e depois neutralizadas antes da injeção com auxílio de solução alcalina a fim de cessar a degradação e não causar deformação nos picos. Os

resultados dos teores obtidos para as amostras de dipirona, tanto controles quanto amostras submetidas ao estresse ácido, estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultados das amostras submetidas a estresse ácido

Identificação	Tempo de exposição	Teor (%)	Impurezas Totais (%)	Balanço (%)
IFA Controle Fabricante 1 L: 1	N/A	103,95	0,16	-
IFA Fabricante 1 HCl 0,01 M L: 1	6 minutos	91,82	7,95	95,83
IFA Controle Fabricante 2 L: 2	N/A	102,85	0,16	-
IFA Fabricante 2 HCl 0,01 M L: 2	6 minutos	91,91	7,82	96,81

O ativo se mostrou susceptível a degradação ácida, resultando em decaimento superior a 10%. A formação da impureza apresentou teores de 7,95% e 7,82% e a recuperação da solução degradada em comparação a controle foi de 95,83% e 96,81% para os fabricantes Fabricante 1 e Fabricante 2 demonstrando dentro da especificação 95 - 105%. Nessa condição foi visualizado o pico predominante da impureza C aproximadamente 7,70% e o pico da impureza E 0,06%. É possível observar que a amostra controle apresentou o pico da impureza E em 0,13% e a amostra degradada na condição ácida 0,06%, demonstrando a degradação da impureza e possível formação de impurezas secundárias sem grupamento cromóforo. Foram geradas duas impurezas durante o estresse, a impureza E e a Impureza C que possui resolução de aproximadamente 11 em relação ao ativo. Assim, verifica-se que a dipirona é instável quando exposta a extrema condição ácida.

6.1.3.3 Estresse Alcalino – NaOH 0,50 M

As amostras em estresse básico ficaram expostas pelo ao degradante (NaOH 0,50 M) e foram neutralizadas imediatamente antes da injeção com auxílio de solução ácida a fim de cessar a degradação e não causar deformação nos picos. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 21 - Resultados das amostras submetidas a estresse básico.

Identificação	Tempo de	Teor (%)	Impurezas (%)	Balanço (%)
---------------	----------	----------	---------------	-------------

	exposição			
IFA Controle Fabricante 1 L: 1	N/A	103,26	0,20	-
IFA Fabricante 1 NaOH 0,50 M L: 1	Imediato	88,43	7,94	93,15
IFA Controle Fabricante 2 L: 2	N/A	101,68	0,15	-
IFA Fabricante 2 NaOH 0,50 M L: 2	Imediato	82,69	14,00	94,95

O ativo se mostrou susceptível a degradação básica, resultando em decaimento superior a 10%. A formação da impureza apresentou teores de 7,94% e 14,00% e a recuperação da solução degradada em comparação a controle foi de 93,15% e 94,95%. Nessa condição foi visualizado o pico predominante da impureza C aproximadamente 7,70 e 13% para os dois fabricantes e o pico da impureza E cerca de 0,07%. É possível observar que a amostra controle do fabricante da Fabricante 1 apresentou o pico da impureza E em 0,12% aproximadamente e a amostra degradada na condição básica 0,07%, demonstrando a degradação por hidrólise da impureza e possível formação de impurezas secundárias sem grupamento cromóforo.

6.1.3.4 Estresse Oxidativo – H₂O₂ 0,15%

As amostras matéria-prima foram mantidas sob estresse oxidativo com H₂O₂ 0,15% por 6 minutos. Os resultados dos teores obtidos para as amostras de dipirona, tanto controles quanto amostras submetidas ao estresse oxidativo, estão descritos na Tabela 208.

Tabela 22 - Resultados das amostras submetidas a estresse oxidativa.

Identificação	Tempo de exposição	Teor (%)	Impurezas (%)	Balanco (%)
IFA Controle Fabricante 1 L: 1	N/A	103,26	0,20	-
IFA Fabricante 1 H₂O₂ 0,15% L: 1	6 minutos	91,18	14,52	102,1
IFA Controle Fabricante 2 L: 2	N/A	101,03	0,15	-
IFA Fabricante 2 H₂O₂ 0,15% L: 2	6 minutos	83,66	16,86	99,36

A Dipirona foi rapidamente degradada nessa condição e gerou picos da impureza B cerca de 0,10%, impureza D entre 0,92 e 0,95% com resolução de 4,13 em relação a impureza C, impureza E entre 0,39 e 0,96% e a impureza C entre 12,01 e 13,32%, com resolução em torno de 5 em relação ao ativo. Houve maior variabilidade nas degradações entre os diferentes fabricantes que pode ser justificada pela rápida degradação. Como o tempo estipulado foi em torno de 6 minutos, a cinética de degradação é muito rápida e faz com que qualquer variação mínima no tempo do preparo entre as soluções já apresente variação nos resultados. Desta forma, é possível afirmar que a dipirona é instável quando exposta à condição oxidativa.

6.1.3.5 Estresse por íons metálicos – FeCl₃ 2 mM

As amostras matéria-prima foram mantidas sob estresse por íons metálicos com FeCl₃ 2 mM por 12 horas. Os resultados dos teores obtidos para as amostras de dipirona, tanto controles quanto amostras submetidas ao estresse por íons metálicos, estão descritos na Tabela 209.

Tabela 23 - Resultados das amostras submetidas a estresse íons metálicos

Identificação	Tempo de exposição	Teor (%)	Impurezas (%)	Balço (%)
IFA Controle Fabricante 1 L: 1	N/A	102,43	0,14	-
IFA Fabricante 1 FeCl₃ 2 mM L: 1	12 horas	92,12	3,39	93,12
IFA Controle Fabricante 2 L: 2	N/A	101,68	0,15	-
IFA Fabricante 2 FeCl₃ 2 mM L: 2	12 horas	91,20	3,38	92,88

A Dipirona foi susceptível a degradação metálica apresentando decaimento superior a 10%. Nesta condição houve o aparecimento da impureza A, o aumento da impureza E 0,39% com resolução de 4,87 em relação a impureza A e da majoritária impureza C com aproximadamente 3,0% com resolução de 7,13 em relação ao ativo.

A análise foi conduzida mantendo a Dipirona em estresse por um intervalo suficiente à geração de cerca de 3% de impurezas. Nos resultados obtidos o teor das impurezas manteve-se cerca de 3,4% e a recuperação frente a controle foi aproximadamente 93%. Durante esse estudo foi verificado que quando exposta a estresse íons metálicos, a dipirona passa a ter degradações secundárias e é possível que haja a perda de grupos cromóforos

na molécula. Assim, conclui-se que dipirona monohidratada é instável quando exposta a solução de íons metálicos.

6.1.4 Amostras de degradação fotolítico, temperatura e umidade

Na Tabela 20 observa-se as amostras sob as condições de estresse de temperatura, umidade e radiação UV, apresentaram-se estável durante o tempo de exposição trabalhado, mostrando uma boa estabilidade do fármaco e nenhuma degradação significativa foi observada.

Tabela 24 - Resultados das amostras em estresse fotolítico, térmico e úmido.

Lote da amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas (%)	Balanço (%)
1	Controle	98,71	0,16	-
	Temperatura	101,04	0,16	102,36
	Umidade	99,08	0,15	100,36
	Radiação UV	99,81	0,20	101,15
2	Controle	100,53	0,18	-
	Temperatura	100,50	0,25	100,04
	Umidade	101,22	0,16	100,67
	Radiação UV	99,25	0,22	98,77

6.1.5 Discussão da Seletividade

Nos cromatogramas referentes aos brancos e diluente utilizados na avaliação de seletividade não foram observados picos que afetassem a seletividade do método.

Com base nos resultados obtidos para as condições testadas, foi possível observar que o ativo se mostrou susceptível à degradação em meios ácido, básico, peróxido e íon metálico e demonstra que o produto permanece estável quando submetido ao estresse úmido, fotolítico e térmico, não apresentando variação significativa no seu teor durante o período de estudo.

Conforme descrito na literatura, a dipirona é facilmente hidrolisada em soluções aquosas, sendo que os principais produtos formados são o hidroximetanosulfonato e a 4-metilaminoantipirina^{35,36}, sugerindo uma decomposição de natureza hidrolítica (Figura 31). Moléculas contendo um átomo de carbono com quatro ligações simples a outros átomos, sendo pelo menos dois dos quais são oxigênio, nitrogênio ou enxofre, podem sofrer clivagem hidrofílica. A hidrólise, que pode ser acelerada pelo calor ou pela presença de um

catalisador de caráter ácido, libera o átomo de carbono como um derivado de carbonila e o átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre como um derivado protonado²⁷.

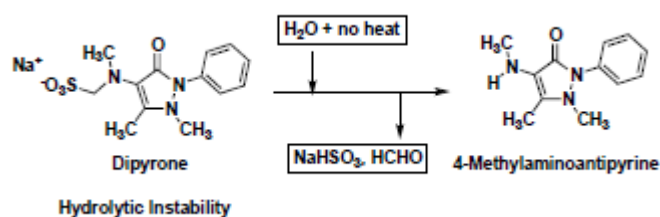


Figura 29 – Decomposição hidrolítica da Dipirona²⁸.

Através da administração oral, a dipirona é rapidamente hidrolisada na porção ativa 4-metilaminoantipirina, com biodisponibilidade absoluta de 90%²⁹ esse fato demonstra a suscetibilidade a degradação por meio hidrolítica³³⁻³⁷.

Outro estudo realizado por ERGUN. H, et al.⁵⁵ demonstra a degradação da molécula de dipirona por meio hidrolítico variando fatores como concentração, temperatura e pH. A Figura 16, demonstra a relação entre a área de Dipirona e 4-metilaminoantipirina (4-MAA) em função do tempo, a amostra foi diluída com água pH 7,4 e posteriormente analisada por cromatografia líquida. Na representação gráfica da Figura 32 é possível verificar a decomposição da Dipirona e a formação da 4-metilaminoantipirina resultado semelhante ao encontrado nesse estudo²⁶.

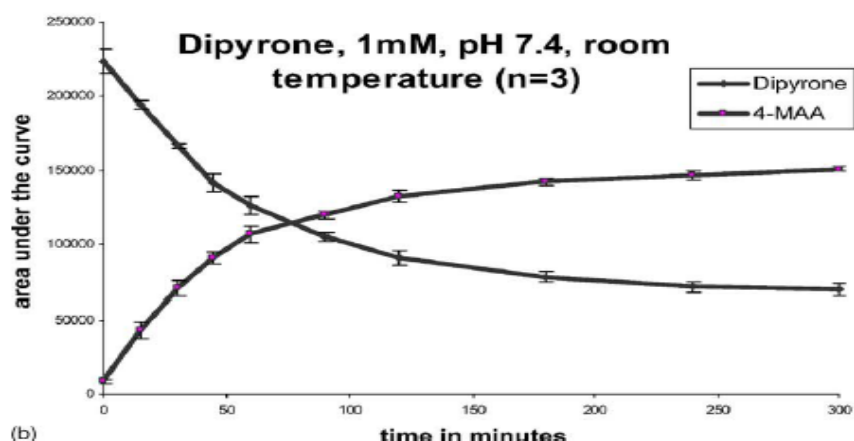


Figura 30 – Decomposição hidrolítica da Dipirona e aumento da 4-metilaminoantipirina²⁸

Segundo Diogo, 2003¹⁵, a Dipirona em sua forma sólida pode ser oxidada a 4-formilaminoantipirina. A hidrólise ácida leva a formação de 4-formilmetilaminoantipirina, enquanto em soluções aquosas neutras, a dipirona está em equilíbrio com hidroximetanossulfonato de sódio e 4-metilaminoantipirina (Impureza C). A 4-metilaminoantipirina (Impureza C) pode ser oxidada e hidrolisada por duas vias, uma levando a formação de ácido metilrubazônico através da 4-aminoantipirina (Impureza B) e

iminobisantipirina e a outra leva a bismetilantipirina obtida da reação entre a 4-metilaminoantipirina (Impureza C) e a 4-aminoantipirina (Impureza B).

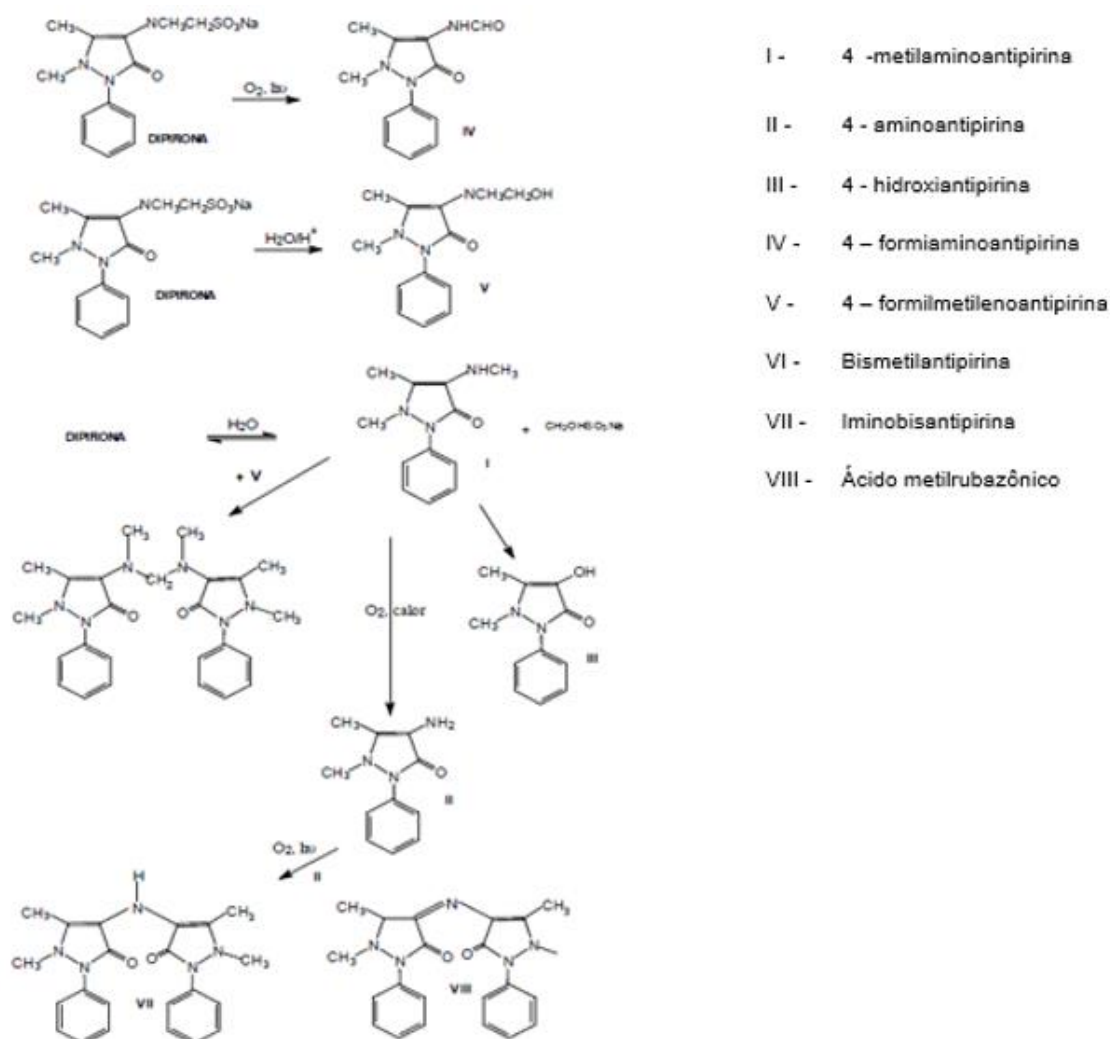


Figura 31 – Rota de degradação de Dipirona¹⁵

Todos os resultados citados acima reforçam os encontrados neste estudo. Para as condições forçadas de temperatura, umidade e radiação ultravioleta, a Dipirona demonstrou estabilidade, sem decaimento significativo no teor. Já para as condições ácida, básica, oxidativa e metálica o ativo demonstrou instabilidade. Com a exposição a esses degradantes, houve decaimento do teor superior a 10% e visualizou-se a formação de produto de degradação com resolução acima de 2 em relação ao ativo. Para todas as condições analisadas a Dipirona apresentou pureza cromatográfica.

Sendo assim, o método demonstra capacidade de identificar e separar o ativo dos seus produtos de degradação, quantificando o ativo com confiabilidade mesmo após a sua exposição a condições forçadas de degradação. O método é indicativo de estabilidade considerando sua performance frente as condições potenciais de degradação.

6.2. Linearidade

6.2.1 Avaliação fator resposta das impurezas C e E

A avaliação da linearidade foi efetuada mediante a obtenção de curva analítica com nove níveis de concentração e três réplicas em cada nível, compreendendo o intervalo de 0,03% a 0,60% para Dipirona e para as Impurezas C e E foi avaliado com cinco níveis de concentração e três réplicas em cada nível, compreendendo o intervalo de 0,03% a 0,60% e 0,03% a 0,18%, respectivamente, da concentração nominal da amostra ($8500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) abrangendo o intervalo de concentração de $2,55$ a $51,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dipirona monoidratada.

São apresentados nas Figuras 34, 35 e 36 os gráficos de linearidade, para avaliação da regressão linear com a respectiva equação da reta.

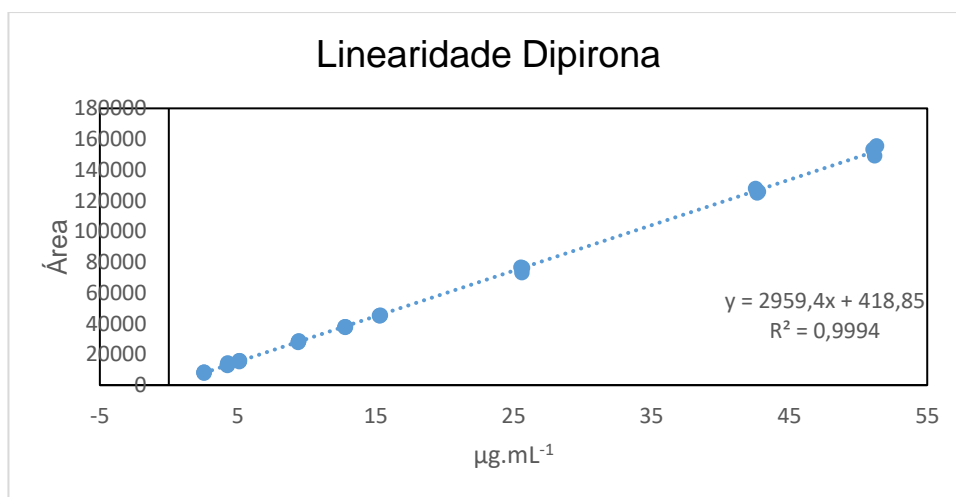


Figura 32 – Curva analítica para Dipirona.

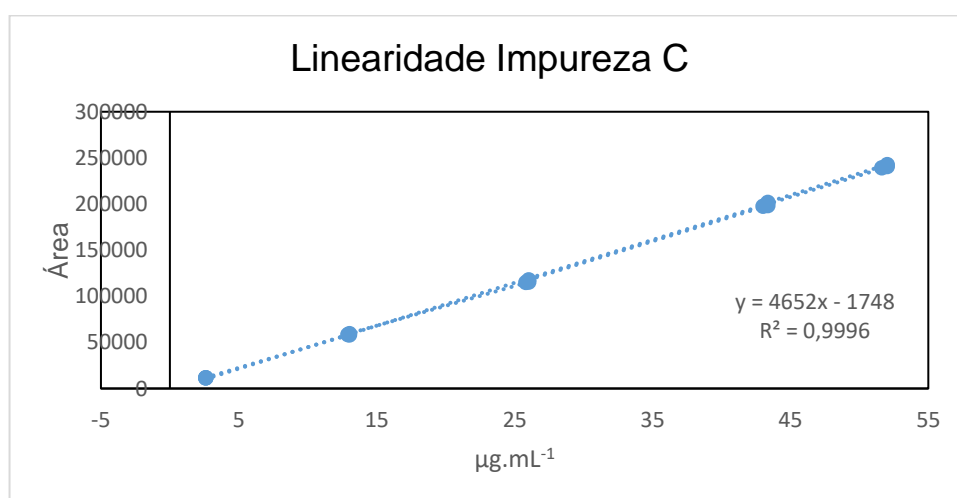


Figura 33 – Curva analítica para Impureza C.

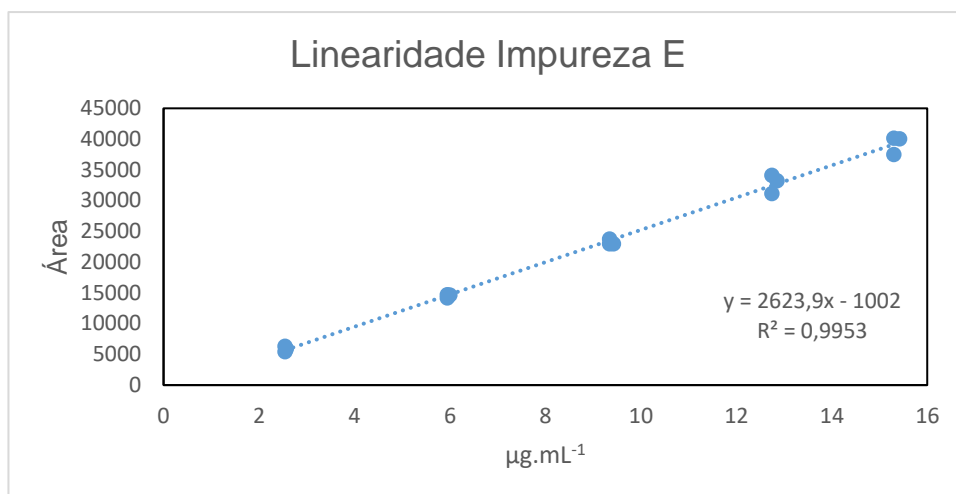


Figura 34 – Curva analítica para Impureza E.

Nas Tabela 25 a 23 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA) da regressão. Observamos que F calculado ($MQ_{\text{regressão}}/MQ_{\text{resíduo}}$) foi maior que F tabelado. Valores estatisticamente significativos ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) indicam uma relação linear entre as duas variáveis.

Tabela 25 – Resultados de teste ANOVA para Dipirona.

	MQ	Fcalculado	F de significação
Regressão	$6,48 \cdot 10^{10}$		
Resíduo	$1,68 \cdot 10^6$	38482,84	$2,26 \cdot 10^{-41}$
Total	-		

Tabela 26 – Resultados de teste ANOVA para Impureza C.

	MQ	Fcalculado	F de significação
Regressão	$1,09 \cdot 10^{11}$		
Resíduo	$3,72 \cdot 10^6$	29271,29	$3,50 \cdot 10^{-23}$
Total	-		

Tabela 27 – Resultados de teste ANOVA para Impureza E.

	MQ	Fcalculado	F de significação
Regressão	$2,17 \cdot 10^9$		
Resíduo	$7,91 \cdot 10^5$	2747,904	$1,63 \cdot 10^{-16}$
Total	-		

Pela avaliação dos dados apresentados na Tabelas 24 é possível verificar a significância dos coeficientes linear (interseção) e angular (variável X 1). Considerando que o p-valor foi maior que 0,05, concluí-se que o parâmetro não é significativo para o modelo, ou seja, o intercepto não é estatisticamente diferente de zero.

Tabela 28 – Dados dos coeficientes de regressão segundo teste ANOVA para Dipirona.

	valor-P Dipirona	valor-P Imp. C	valor-P Imp. E
Interseção	0,28	0,07	0,07
Variável X 1	$2,26.10^{-41}$	$3,50.10^{-23}$	$1,63.10^{-16}$

Na Tabela 25 são apresentados os resultados dos testes estatísticos da regressão linear obtida a partir da curva analítica.

Tabela 29 – Resultados da Estatística de regressão Dipirona, Impureza C e Impureza E

	Dipirona	Impureza C	Impureza E	Critério
R múltiplo	1,000	1,000	0,998	0,990
R-Quadrado	0,999	1,000	0,995	-
R-quadrado ajustado	0,999	1,000	0,995	-
Observações	27	15	15	-

Na regressão linear simples, o modelo ajustado precisa ser validado para que os resultados sejam confiáveis. A análise visual dos resíduos em conjunto com os testes de Cochran e Grubbs foram utilizados para validar a adequabilidade do modelo de regressão. Em um modelo bem ajustado, os resíduos devem ser independentes, apresentar variância constante para os diferentes níveis, possuir distribuição normal e aleatória⁵⁴.

De acordo com a avaliação da distribuição dos resíduos (Figura 35 a 39) conclui-se que os erros são independentes e de variância constante uma vez que os pontos se apresentaram distribuídos de forma aleatória em torno da reta de resíduo zero, com variância homogênea no início e no final das observações.

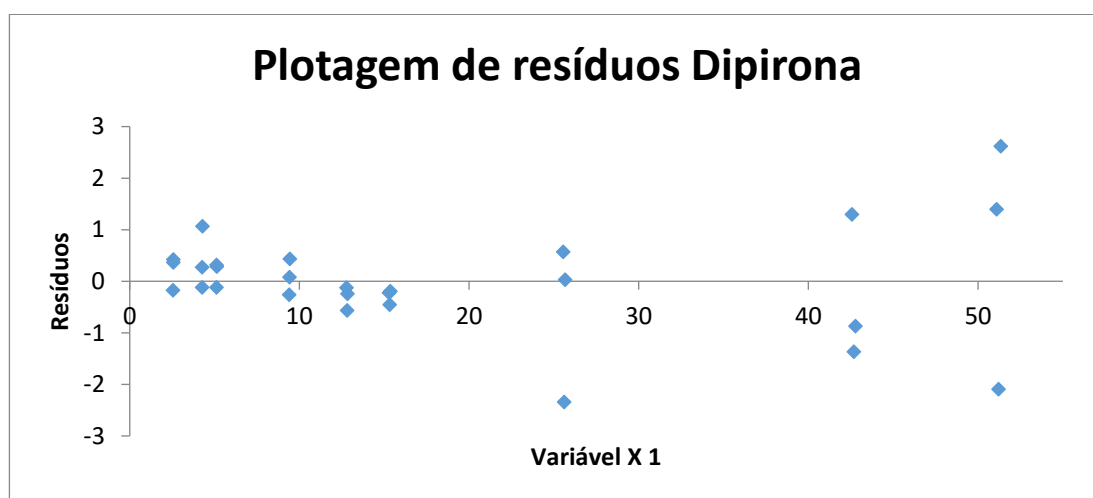


Figura 35 – Gráfico de Resíduos para Dipirona.

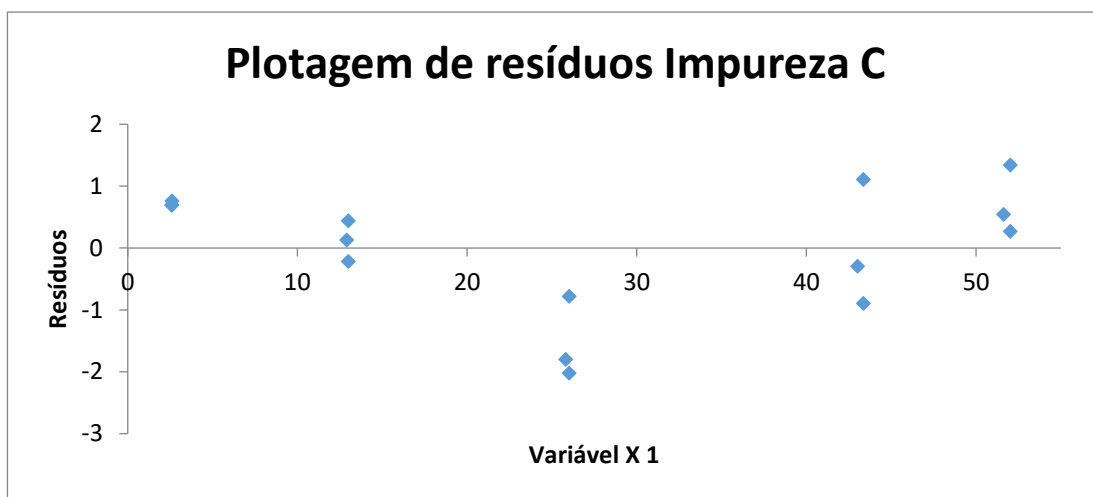


Figura 36 – Gráfico de Resíduos para Impureza C.

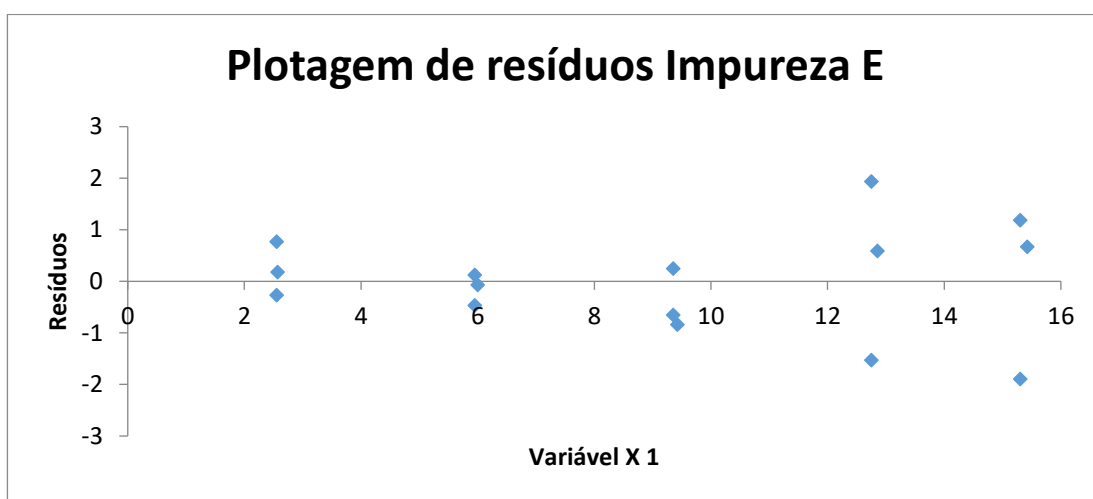


Figura 37 – Gráfico de Resíduos para Impureza E.

Adicionalmente os resultados do teste estatístico de Cochran para homogeneidade das variâncias demonstrou que os resíduos são homocedasticos em um nível de significância de 5% para Dipirona, impureza C e Impureza E o qual deve atender aos critérios ($C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$) (Tabela 26).

Tabela 30 – Resultados do teste estatístico de Cochran.

Composto	C calculado	C tabelado
Dipirona	0,4209	0,4775
Impureza C	0,2989	0,6838
Impureza E	0,5325	0,6838

Para verificar a ocorrência de valores extremos (*outliers*) utilizou-se o teste de *Grubbs*. Dentre os 27 resíduos obtidos na construção da regressão linear da Dipirona e 15 resíduos obtidos na construção da regressão linear das Impurezas C e E não houve a ocorrência de

nenhum valor extremo (*outlier*), pois nenhum valor calculado foi maior que o valor tabelado conforme as Tabelas 27 a 29.

Tabela 31 – Resultados de variância - teste de *Grubbs* para Dipirona.

Concentração (%)	G calculado	G tabelado (n = 27, P = 0,05)
0,03%	0,70	2,70
	0,43	
	0,36	
0,05%	0,77	
	0,54	
	0,56	
0,06%	0,77	
	0,54	
	0,50	
0,11%	0,57	
	0,33	
	0,83	
0,15%	0,77	
	0,60	
	0,15	
0,18%	0,63	
	0,67	
	0,31	
0,30%	0,15	
	0,90	
	2,30	
0,50%	0,86	
	0,27	
	0,95	
0,60%	0,99	
	2,68	
	1,96	

Tabela 32 – Resultados de variância - teste de *Grubbs* para Impureza C.

Concentração (%)	G calculado	G tabelado (n = 15, P = 0,05)
0,03%	0,19	2,41
	0,18	
	0,07	
0,15%	1,04	
	1,18	
	0,64	
0,30%	2,17	
	1,77	
	0,04	
0,50%	0,17	
	0,90	
	0,55	
0,60%	0,97	
	0,45	
	0,94	

Tabela 33 – Resultados de variância - teste de *Grubbs* para Impureza E.

Concentração (%)	G calculado	G tabelado (n = 15, P = 0,05)
0,03%	0,80	2,41
	0,95	
0,07%	0,02	
	1,03	
	1,13	
0,11%	0,48	
	0,83	
	0,12	
0,15%	0,18	
	1,91	
	0,27	
0,18%	1,24	
	0,69	
	0,15	
	1,84	

A partir dos dados apresentados, podemos concluir que o método analítico em validação é capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de dipirona. A conclusão é fundamentada na relação linear comprovada na faixa de 2,55 a 51,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ estabelecida para o método para as impurezas C e E. Com estes resultados foi possível determinar o fator resposta de cada impureza conforme a Tabela 30.

Tabela 34 – Determinação do fator resposta

Curva	Coefficiente angular	Fator resposta relativo
Dipirona	2959,431398	-
Impureza C	4652,032117	1,57
Impureza E	2623,886525	0,89

6.3. Exatidão/Precisão

6.6.1 Precisão 1º dia e 2º dia / Exatidão – Impurezas Inespecíficas

Os resultados de recuperação e repetibilidade no preparo das amostras estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 – Exatidão/Precisão 1º dia (repetibilidade) e 2º dia (intermediária) para impurezas inespecíficas.

Nível	Recuperação (%)	Média rec. (%)	Especificação (%)	DPR 1º dia (%)	DPR 2º dia (%)	Especificação (%)
0,03 %	96	102		5,0	1,0	
	106					
	103					
0,05%	98	101	90 - 107	3,0	2,2	≤ 5,3%
	101					
	104					
0,06%	100	101		1,0	2,3	
	101					
	102					

Conforme os resultados apresentados na Tabela 35, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR%) entre os preparos das amostras de dipirona nas concentrações avaliadas estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de exatidão e precisão repetibilidade e intermediária. Sendo assim, o método desenvolvido possui exatidão e precisão adequada nos níveis de concentração entre 2,55 µg.mL⁻¹ a 5,10 µg.mL⁻¹ para as impurezas inespecíficas em dipirona monoidratada.

6.6.2 Reprodutibilidade – Impurezas Inespecíficas

A Tabela 3632 apresenta os dados compilados da precisão 1º dia e 2º dia para avaliação da reprodutibilidade do método, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações.

Tabela 36 – Reprodutibilidade – impurezas inespecíficas.

Nível (%)	Teor 1º dia (%)	Teor 2º dia (%)	DPR (%)	Especificação (%)
0,03 %	95	101	3,3	
	104	99		
	102	100		
0,05%	97	100	3,0	DPR ≤ 8
	100	105		
	103	105		
0,06%	99	100	1,7	

100	104
101	100

6.6.1 Precisão 1º dia e 2º dia / Exatidão – Impureza C – Impureza Especifica

Os resultados de recuperação e repetibilidade no preparo das amostras estão apresentados na *Tabela 3533*.

Tabela 37 – Exatidão/Precisão 1º dia (repetibilidade) e 2º dia (intermediária) para Impureza C

Nível (%)	Recuperação (%)	Média (%)	Especificação (%)	DPR 1º dia (%)	DPR 2º dia (%)	Especificação (%)
	96					
0,03 %	96	96	90 - 107	0,2	3,0	≤ 5,3%
	96					
	101					
0,50%	98	99		1,7	0,7	
	98		95 - 105			≤ 3,7%
	101					
0,60%	103	101		1,8	1,6	
	100					

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3533, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR%) entre os preparos das amostras de impureza C matrizada com Dipirona nas concentrações avaliadas estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de exatidão e precisão repetibilidade e intermediária. Sendo assim, o método analítico possui exatidão e precisão adequada nos níveis de concentração entre 2,55 µg.mL⁻¹ a 51,00 µg.mL⁻¹ para a Impureza C em dipirona monoidratada matéria-prima.

6.6.2 Reprodutibilidade – Impureza C – Impureza Especifica

A Tabela 3634 apresenta os dados necessário para determinação da reprodutibilidade do método, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações.

Tabela 38 – Reprodutibilidade – Impureza C

Nível (%)	Teor 1º dia (%)	Teor 2º dia (%)	DPR (%)	Especificação (%)
0,03 %	96	95	2	≤ 8
	96	98		
	96	93		
0,50%	101	104	3	≤ 6
	98	103		
	98	103		
0,60%	101	105	2	
	103	104		
	100	102		

6.6.3 Precisão 1º dia e 2º dia / Exatidão – Impureza E – Impureza Específica

Os resultados de recuperação e repetibilidade no preparo das amostras estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 39 – Exatidão/Precisão 1º dia (repetibilidade) e 2º dia (intermediária) para Impureza E

Nível (%)	Recuperação (%)	Média (%)	Especificação (%)	DPR 1º dia (%)	DPR 2º dia (%)	Especificação (%)
0,03 %	101	103	90 - 107	3,6	4,1	≤ 5,3%
	102					
	107					
0,15%	104	102	95 - 105	1,9	1,9	≤ 3,7%
	102					
	100					
0,18%	104	102		2,5	1,1	
	103					
	99					

Conforme os resultados apresentados na Tabela 35, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR%) entre os preparos das amostras de Impureza E nos níveis avaliados estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de exatidão e precisão repetibilidade e intermediária. Concluindo assim, o método analítico possui exatidão e precisão (repetibilidade) adequada nos níveis de concentração entre 2,55 µg.mL⁻¹ a 15,30 µg.mL⁻¹ para a Impureza E em Dipirona Monoidratada matéria-prima.

6.6.4 Reprodutibilidade – Impureza E – Impureza Especifica

A Tabela 3636 apresenta os dados necessário para determinação da precisão intermediária, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações.

Tabela 40 – Reprodutibilidade – Impureza E

Nível (%)	Teor 1º dia (%)	Teor 2º dia (%)	DPR (%)	Especificação (%)
0,03 %	101	93	5	≤ 8
	102	100		
	107	94		
0,15%	104	99	2	≤ 6
	102	102		
	100	103		
0,18%	104	103	2	
	103	103		
	99	101		

6. CONCLUSÃO

Uma das particularidades do fármaco dipirona são grupos funcionais potencialmente reativos que a torna bastante susceptível a degradação por reações de hidrólise. Com os testes realizados para determinação de um diluente ou uma condição mais estável para a molécula, concluiu-se nos estudos que a mistura de metanol seco com sulfato de sódio e dimetilformamida nas proporções (25:75) apresentou o melhor resultado, não demonstrando interferência na estrutura da dipirona. Após a realização do teste de estabilidade das soluções, concluiu-se que a solução padrão, sendo armazenadas em vial, no rack do equipamento, são estáveis por aproximadamente 42 horas e a solução amostra por 30 horas diluídas na condição aprovada de diluente.

Com a realização do estudo de degradação forçada (EDF), o método se mostrou capaz de separar e quantificar todas as impurezas da matéria-prima para os dois fabricantes testados de dipirona monoidratada, garantindo qualidade e segurança. É importante destacar que as presenças de degradações observadas nos estudos de degradação forçada não comprometem a capacidade do método de separar e quantificar os diferentes produtos formados, uma vez que nenhum produto de degradação coeluiu com a Dipirona, Impureza C e Impureza E, o que pode ser confirmado durante a análise de pureza cromatográfica através dos valores de *purity angle* e *threshold*.

Com base nas avaliações preliminares da literatura, o estudo conduzido corrobora com os mesmos. Assim, os resultados experimentais juntamente com avaliação da literatura e da estrutura molecular do composto permite afirmar que a Dipirona monoidratada é muito susceptível à hidrólise ácida e hidrólise alcalina, oxidável frente a ação de composto inorgânico (peróxido) e a ação de íons metálicos, porém mostrou-se praticamente estável às demais condições avaliadas como temperatura, fotolítico e úmido.

Durante a avaliação da variação de sistema cromatográfico verificou-se que as amostras apresentaram recuperação, seletividade e pureza de pico nas condições principais de pH, temperatura do forno, vazão de fase móvel e tempo de extração. Todos os filtros testados na validação como PVDF, PTFE e PET 0,22 µm sem descarte e com 2 mL de descarte, apresentaram variação baixa e dentro da especificação. A coluna que foi utilizada e aprovada no desenvolvimento e validação foi a Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 100 mm x 4,6 mm x 5,0 µm.

O método também demonstrou linearidade, precisão e exatidão devido a todos os resultados observados estarem dentro dos critérios de aceitação definidos, os quais estão de acordo com a literatura utilizada a AOAC.

7. REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166 de 24 de julho de 2017.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019.
3. IMAGAWA, V. H. Avaliação da eficácia analgésica de três doses diferentes da dipirona sódica em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 12. 2006.
4. NASCIMENTO, A. P. Desenvolvimento e validação de metodologia para medicamentos contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e em associação. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 11. 2005
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015.
6. Guia Nº 04/2015. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Versão 01, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 2015
7. ICH. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Producers - Methodology: Rockville, 1996.
8. ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in new drug substances – Q3A
9. AOAC INTERNATIONAL. Guidelines for standard method performance requirements. AOAC official methods of analysis, 2016
10. HALFELD G. Uma análise crítica sobre benefícios e riscos da dipirona. Rev Paul Odontol 1992; 14:20-32
11. FORNARI, A. Qualidade de soluções orais de Dipirona 500mg.mL⁻¹ armazenadas em farmácias domiciliares. Faculdade Assis Gurgacs, 2012
12. ALONZO H. G. A, CRISTIANA L, CORRÊA C. L, ZAMBRONE F. A. D. Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios não-esteroidais: dados epidemiológicos em seis centros de controle de intoxicações do Brasil. Rev Bras Toxicol 2001; 14:49-54
13. BENNETT W. M, HENRICH W. L, STOFF J. S. The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations. Am J Kidney Dis 1996; 28:S56-S6
14. MAUNUKSELA E. L. Nonsteroidal anti-inflammatosy drugs in pediattrick pain management. In: Shechter NL, Beroe CB, Yaster M, organizadores. Pain in infants, children, and adolescents. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993. p. 135-143
15. FLORES, M. P. CASTRO, A. P. C. R. NASCIMENTO, J. S. Analgésicos tópicos. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 62, n. 2, p. 248–252, 2012

16. DEMÉTRIO, G. S. RODRIGUEZ, G. G. TRAEBERT, J. PIOVEZAN, A. P. Prevalência de automedicação para tratamento de dor em município do sul do Brasil. *Arq. Catarin. Med.* 2012; 41(3): 54-59
17. GONZÁLEZ, T. P. B. *et al.* Dipirona: Benefícios subestimados o riesgos sobredimensionados: Revisión de la literatura. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 43 (1), 173-195, 2014
18. GRAHAM GG, SCOTT KF. Mechanisms of action of paracetamol and related analgesics. *Inflammopharmacology* 2003; 11:401-413
19. HALFELD G. Uma análise crítica sobre benefícios e riscos da dipirona. *Rev Paul Odontol* 1992; 14:20-32
20. ISAACS, R. C. A.; HARPER, M. M.; MILLER, E. C. Analytical challenges in the confirmative identification of dipyrone as an adulterant in illicit drug samples. *Forensic Science International*, 270:185-192, 2017
21. SIEBEL J. S, BIRITH A, CALIXTO J. B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Brain Res* 2004; 1003:61-6
22. KNAPPMANN A. L, MELO, E. B. Qualidade de medicamentos isentos de prescrição: um estudo com marcas de dipirona comercializadas em uma drogaria de Cascavel (PR, Brasil). *Rev Ciênc. Saúde coletiva* 15(Supl. 3):3467-3476, 2010
23. MARRA, M. C. *et al.* Ultra-fast determination of caffeine, dipyrone, and acetylsalicylic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection and identification of degradation products. *Journal of Chromatography A*, 1327: 149-154, 2014
24. Dipirona [monografia]. In: *British Pharmacopoeia*, 2018.
25. Dipirona [monografia]. In: *Farmacopeia Brasileira*. 6ª ed. Parte 3. São Paulo: Atheneu; 2019
26. MAO, S. YANG, S. BI, D. Pharmacodynamics and potential toxicity of intranasally administered dipyrone, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 7 (2006)
27. BIGAL, M. E. *et al.* Intravenous dipyrone in the acute treatment of migraine without aura and migraine with aura: A randomized, double blind, placebo controlled study, *Headache*, 42, 9 (2002)
28. WANNMACHER, L. Paracetamol versus Dipirona: como mensurar o risco?. *Brasilia*, abril de 2005
29. ARELLANO F, SACRISTÁN J. A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 38:617-619
30. ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D. A. C.; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 35, n. 3, p. 479-487, May 2004
31. TORRES, L.M. RODRÍGUEZ, *et al.* Efficacy and safety of dipyrone versus tramadol in the management of pain after hysterectomy, *Reg. Anesth. Pain Med.*, 26, 2 (2001)
32. DIOGO, A. N. M. Dipirona: Segurança de uso e monitoramento da qualidade de comprimidos orais. Dissertação (Mestrado)-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ. 2003

33. The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study. Risks of agranulocytosis and aplastic anemia: a first report of their relation to drug use with reference to analgesics. JAMA 1986; 256:1749-1757
34. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº. 1.260, de 15 de agosto de 2001. Determina a publicação do relatório final do Painel internacional de avaliação da segurança da dipirone. DiOficial da União, Brasília, 2001
35. IBAÑEZ L, VIDAL X, BALLARIN E, LAPORTE J. R. Agranulocytosis associated with dipyrone (metamizol). Eur J Clin Pharmacol 2005; 60:821-829
36. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas para ampliar qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. Rev Saude Publica 2003; 37:821-824
37. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997
38. BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. J. Chromatogr. B, v.686, p.3-10, 1996
39. CASSIANO, N. M. et. al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. Quim. Nova, Vol. 32, No. 4, 1021-1030, 2009
40. Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2ª ed. São Paulo: Pharmabooks; 2007
41. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; Practical HPLC Method Development, 2ª ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15
42. ADAMOVIĆ, J. A. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, 2ª ed., Cytogen Corporation. Princeton: New Jersey, 1997, cap. 1
43. United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001
44. MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Química Nova, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.
45. PORTO, H. S. M. HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos. Tese (Mestrado) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra, 2014
46. Princípios de Cromatografia Iônica e sua importância – Freitag Laboratórios. Disponível em: <<https://freitag.com.br/blog/principios-de-cromatografia-ionica-e-sua-importancia/>>. Acesso em: 27 out. 2020.
47. usp31nf26s1_c621, General Chapters: <621> CHROMATOGRAPHY. Disponível em: <http://www.uspbpep.com/usp31/v31261/usp31nf26s1_c621.asp>. Acesso em: 27 out. 2020
48. HUBERT, P. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. Anal. Chim. Acta, v. 391, p.135-139, 1999
49. MARTINS, I. L. Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para quantificação da amoxicilina, norfloxacino e oxcabazepina em estudos

farmacocinéticos. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Ceará, p. 50. 2009

50. AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, v. 12, p. 116-131, 2001
51. CHASIN, A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *R. Farm. Bioquim.*, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994
52. FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. *J. Chromatogr. B*, v. 686, p. 77-80, 1996
53. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ–CGCRE–008, 2003
54. Guia Nº 10/2017. Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Versão 01, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 2017.
55. VANDER-HEYDEN, Y. NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J. VANDEGINSTE, B. G. M. MASSART, D. L. J. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24, 723 (robustez)
56. Dipirona [monografia]. In: *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 11ª ed. FEUM; 2014