



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

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
ANÁLISE DE SOLVENTES RESIDUAIS NA MATÉRIA PRIMA
INDAPAMIDA POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Anderson Luiz Fiorentin

Toledo – PR

2021



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

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
ANÁLISE DE SOLVENTES RESIDUAIS NA MATÉRIA PRIMA
INDAPAMIDA POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Anderson Luiz Fiorentin

Artigo apresentado 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(a): Dra. Josiane Caetano Dragunski

**Toledo – PR
2021**

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

Fv Fiorentin, Anderson Luiz
 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE
 DE SOLVENTES RESIDUAIS NA MATÉRIA PRIMA INDAPAMIDA
 POR CROMATOGRAFIA GASOSA / Anderson Luiz
 Fiorentin; orientadora Josiane Caetano Dragunski. -
 - Toledo, 2021.
 44 p.

 Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de
 Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do
 Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas,
 Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

 1. Contaminantes farmacêuticos. 2. IFA. 3.
 Headspace. 4. Transferline. I. Dragunski, Josiane
 Caetano, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

A COMISSÃO EXAMINADORA ABAIXO ASSINADA, APROVA O ARTIGO

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE SOLVENTES
RESIDUAIS NA MATÉRIA PRIMA INDAPAMIDA POR CROMATOGRÁFIA
GASOSA**

ELABORADO POR:

Anderson Luiz Fiorentin

COMO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra Josiane Caetano Dragunski - UNIOESTE

Prof. Dra Maria Cristina Milinski - UNIOESTE

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara - UTFPR

Toledo - PR, 2021

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DE SOLVENTES RESIDUAIS NA MATÉRIA PRIMA INDAPAMIDA POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Anderson Luiz Fiorentin

Resumo

Solventes são reagentes químicos utilizados dentro do processo de síntese do IFA (Insumo Farmacêutico Ativo), entretanto, após os processos para retirada dos mesmos, parte destes reagentes podem permanecer no IFA formado. Devido a toxicidade destes, torna-se necessário avaliar se a quantidade residual segue as especificações de concentração impostas pelo ICH (do inglês "*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*"). Estas especificações foram obtidas por estudos e testes os quais estabelecem a concentração limite para o consumo humano sem causar danos à saúde. Desta forma, este trabalho visa validar uma metodologia analítica para o controle dos solventes residuais etanol, 2-propanol, clorofórmio e tetrahydrofurano (THF) utilizando a técnica cromatografia gasosa com injeção *headspace* e detector FID ("Flame Ionization Detector") na matéria prima Indapamida. Para realizar o controle destas substâncias foi necessário validar a metodologia analítica utilizando os experimentos recomendados pelo órgão regulador a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), os testes avaliados estão descritos na resolução RDC 166 de 24 de julho de 2017. O teste da seletividade mostrou que a presença dos solventes juntos não interfere na quantificação dos mesmos individualmente, obtendo um cromatograma com picos bem resolvidos. Todos os solventes analisados apresentaram dados lineares do coeficiente de correlação de Pearson (r) superiores a 0,99, estes valores foram calculados para a faixa linear de concentração estudada, com valores partindo de 40% até 240%, dentro desta faixa foram avaliados 7 níveis e 3 curvas para os 4 solventes. Os resultados de exatidão foram avaliados em 3 faixas: 40% (ponto baixo), 120% (ponto médio) e 240% (ponto alto), apresentando uma variação de 97 a 105% nos valores de recuperação para os 4 solventes. Todos solventes apresentaram uma boa repetibilidade e reprodutibilidade, com valores de DPR (Desvio Padrão Relativo) inferiores a 5,3%. Os maiores valores de DPR pertencem ao clorofórmio, devido sua concentração de trabalho ser menor (60 ppm) em reflexo da sua especificação de acordo com o ICH. Para o teste de robustez, a metodologia apresentou-se robusta para alterações de rampa inicial do forno, marca de coluna e faixa do fluxo do gás de araste. A partir dos dados obtidos, a metodologia validada se mostrou eficiente para a determinação do resíduo:

solventes estudados etanol, 2-propanol, clorofórmio e THF no insumo farmacêutico ativo, indapamida.

Palavras chave: Contaminantes farmacêuticos, IFA, *Headspace*, *Transferline*.

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF RESIDUAL SOLVENTS IN RAW MATERIAL INDAPAMIDE BY GAS CHROMATOGRAPHY

Anderson Luiz Fiorentin

Abstract

Solvents are chemical reagents used within the synthesis process of IFA (active pharmaceutical input), however, after the withdrawal processes, part of these reagents may remain in the formed IFA. Due to their toxicity, it is necessary to assess whether the residual quantity follows the concentration specifications imposed by ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). These specifications were obtained by studies and tests stating the limit concentration for human consumption without causing damage to health. Thus, this study aims to validate an analytical methodology for the control of residual solvents ethanol, 2-propanol, chloroform and tetrahydrofuran (THF) using the gas chromatography technique with "transferline" injection and FID detector ("Flame Ionization Detector") in the raw material of Indomatography. To carry out the control of these substances it was necessary to validate the analytical methodology using the experiments imposed by the regulatory body to ANVISA (National Health Surveillance Agency), the evaluated tests are described in resolution DRC 166 of July 24 of 2017. O selectivity test showed that the presence of solvents together does not interfere in the quantification of the same individually, obtaining a chromatogram with well resolved peaks. All solvents analyzed presented linear data of the Pearson correlation coefficient (r) greater than 0.99, these values were calculated for the linear concentration range studied, with values starting from 40% up to 240%, within this range 7 levels and 3 curves were evaluated for the 4 solvents. The accuracy results were evaluated in 3 ranges: 40% (low point), 120% (midpoint) and 240% (high point), showing a variation from 97 to 105% in the recovery values for the 4 solvents. All solvents showed good repeatability and reproducibility, with DPR (Relative Standard Deviation) values of less than 5.3%. The highest DPR values belong to the chloroform, due to its concentration of work being lower (60 ppm) reflecting its specification according to the ICH, which determines which concentration is safe to the health of the patients. For the robustness test, the methodology was robust for initial ramp changes of the furnace, column mark and stream range of the plough gas $3.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ up to $4.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, however did not present good robustness for the drag gas flow range greater than $4.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ up to $4.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. It is possible to prove by the results that the methodology has proved

precise, accurate and linear, proving the validation of the methodology and consequently its use as solvent control method in the raw material of IFA Indapamida.

Keywords: Pharmaceutical Contaminants, IFA, Headspace, Transfer line.

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classe 1 dos solventes residuais..... | 15 |
| Tabela 2 – Classe 2 dos solventes residuais..... | 15 |
| Tabela 3 – Classe 3 dos solventes residuais..... | 16 |
| Tabela 4 – Solventes residuais Classe 4..... | 16 |
| Tabela 5 – Condições “Headspace Sampler”..... | 22 |
| Tabela 6 – Critérios de aceitação para desvio padrão relativo..... | 27 |
| Tabela 7 – Critérios de aceitação para recuperação..... | 27 |
| Tabela 8 - Tempos de retenção e resoluções dos solventes na Seletividade Teste.... | 29 |
| Tabela 9 – Resultados estatísticos de Rp e equação da reta na Linearidade..... | 30 |
| Tabela 10 – Resultados estatísticos da Linearidade para todos os solventes..... | 31 |
| Tabela 11 – Resultados de Limite de Quantificação e da relação Sinal/Ruído..... | 33 |
| Tabela 12 – Resultados da precisão repetibilidade 1º e 2º dia..... | 34 |
| Tabela 13 – Resultados do DPR na precisão reprodutibilidade..... | 34 |
| Tabela 14 – Resultados das recuperações do parâmetro exatidão..... | 35 |
| Tabela 15 – Resultados de recuperação para robustez..... | 37 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA | 14 |
| 4. ARTIGO CIENTÍFICO | 19 |
| 4.1 Introdução | 19 |
| 4.2 Materiais e Métodos | 21 |
| 4.2.1 Reagentes..... | 21 |
| 4.2.2 Preparo das soluções..... | 21 |
| 4.2.3 Instrumentos..... | 21 |
| 4.2.4 Condições cromatográficas..... | 22 |
| 4.2.5 Parâmetros de Avaliação..... | 23 |
| 4.2.6 Parâmetros Analisados Na Validação..... | 25 |
| 4.2.6.1 Seletividade..... | 25 |
| 4.2.6.2 Linearidade..... | 25 |
| 4.2.6.3 Precisão..... | 25 |
| 4.2.6.4 Limite de Quantificação..... | 26 |
| 4.2.6.5 Robustez..... | 26 |
| 4.2.7 Especificações dos equipamentos..... | 26 |
| 4.3 Resultados e Discussão | 27 |
| 4.3.1 Seletividade..... | 27 |
| 4.3.2 Linearidade..... | 29 |
| 4.3.3 Limite de Quantificação..... | 32 |
| 4.3.4 Precisão..... | 34 |
| 4.3.5 Exatidão..... | 35 |
| 4.3.6 Robustez..... | 35 |
| 4.3.6.1 Sem Alteração..... | 36 |
| 4.3.6.2 Variação na temperatura inicial do forno da coluna..... | 36 |
| 4.3.6.3 Variação no fluxo do gás de arraste..... | 36 |
| 4.3.6.4 Troca do lote da coluna cromatográfica..... | 36 |
| 4.4 Conclusão | 37 |
| 4.5 REFERÊNCIAS | 38 |

1. INTRODUÇÃO

A indapamida é uma substância a qual pertence à classe dos IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) estes são utilizados na produção do medicamento, sendo substâncias responsáveis por entrar em contato com organismo para promover algum tipo de bem estar ao paciente. A Indapamida é utilizada no tratamento da hipertensão arterial a qual é uma doença que atinge milhões de pessoas no Brasil e no mundo. A hipertensão é uma doença que necessita de um tratamento contínuo que em muitos casos se estende até o final da vida do paciente (SILVA, 2018 p. 435-452).

É de extrema importância que os pacientes que necessitam fazer o uso destas substâncias recebam um medicamento de qualidade, porém é impossível que cada cidadão que necessite do medicamento consiga fazer tal avaliação, sendo necessário uma série de análises de alta complexidade, que requerem alto investimento e necessitam de uma estrutura de alta tecnologia, e é neste momento que vale ressaltar a importância de agentes fiscalizadores, o qual no Brasil o responsável para realizar estes serviços à população é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)(ANVISA, 2021).

O avanço tecnológico científico vem contribuindo para atualizações nos conceitos de controle de qualidade em diversas áreas incluindo a farmacêutica. As frequentes atualizações de compêndios e resoluções da ANVISA para o ramo farmacêutico mostram essa realidade. Essas atualizações estão mostrando uma maior criticidade com as indústrias farmacêuticas, com objetivo de comprovar e atestar a qualidade dos medicamentos e insumos farmacêuticos buscando aumentar a segurança do consumo frente a saúde da população (PRADO, 2008 p. 36-38; SILVA, 2018 p. 435-452).

Observando a legislação vigente RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 166 de 24 de julho de 2017 é possível compreender a complexidades de itens que devem ser seguidos para o deferimento do medicamento, como atender inúmeras especificações de qualidade da parte analítica, as quais devem ser comprovadas por metodologia validadas ou utilizar metodologias de farmacopeias que atendem as mesmas especificações estabelecidas pelo órgão regulador, dentre elas a de solventes residuais provenientes de síntese ou processos produtivos de medicamentos ou de insumos farmacêuticos ativos (ANVISA, 2017).

Durante a produção de um IFA os materiais podem passar por diversos processos químicos, físicos e/ou biológicos, onde o objetivo é a produção com altíssima pureza, para que esse processo possa ser concretizado, o IFA passa por etapas de purificação, diversas reações e adições de componentes necessários na sua construção, estes processos

utilizam reagentes químicos que mesmo após etapas para retirada dos mesmos, podem ser encontrados uma pequena parcela contido no IFA, estes reagentes são chamados de solventes residuais. Desta forma é de extrema importância o monitoramento destas quantidades, e a empresa responsável pela fabricação e entrega do medicamento final devem comprovar que estas substâncias estão em concentrações baixas e são seguras para o consumo no tratamento dos pacientes (MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001 p. 16-22).

Muito dos solventes residuais utilizados possuem potenciais graves a saúde de seres humanos e também da fauna e flora como um todo, dentre os que se destacam temos que o benzeno e similares, este são resíduos que já estiveram muito presente dentro dos processos produtivos farmacêuticos, seja por estar presente como contaminantes de outros reagentes, ou até mesmo como próprio reagente que participa de alguma etapa de síntese. Estes reagentes apresentam potencial tóxico e carcinogênico, por este motivo a concentração de controle deste solvente é bem rígida, e muitas produtoras de IFA estão optando por rotas alternativas que não fazem o uso destas substâncias (SINGH, 2015 p.185-187).

A RDC 166 de 2017 define que as especificações adotada aos solventes residuais devem ser referenciadas e justificadas sobre a sua utilização, após 17/10/2018 a ANVISA passou a fazer parte Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH, do inglês "*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*"). O guia do ICH que aborda os solventes residuais é o apêndice Q3C (R6) o qual o mesmo apresenta as especificações que foram definidas pelo conselho após análises e avaliações da complexidade de cada solvente, este guia classifica os solventes em 4 classes conforme toxicidade das substâncias, dentro das classes os solventes possuem especificações individuais (ICH, 2011).

Para avaliar a presença de solventes residuais em fármacos dentro dos limites estabelecidos pela RDC 166 a técnica que atende os critérios é a cromatografia gasosa, esta técnica possui enorme capacidade de separação devido a infinidade de fases estacionárias disponíveis no mercado atual, e uma boa capacidade de quantificação de sinal dos solventes, quando utilizado o detector "*flame ionization detector*" (FID) é capaz de quantificar solventes na concentração na casa da parte por milhão (ppm) (BONATO, 1997, p. 141-180).

A cromatográfica gasosa vem mostrando seu potencial no cenário farmacêutico, sendo utilizado em algumas metodologias farmacopéica para quantificação do doseamento

de fármacos (quantidade de fármacos presente por dose independente da forma farmacêutica) e também para monitoramento e quantificação de impurezas específicas e inespecíficas presente nos fármacos, porém seu maior destaque vem sendo no controle de solventes residuais em fármacos (USP,2020). Ao longo da última década está técnica contou com avanços enorme em tecnologia de equipamentos como a frequente atualização dos cromatógrafos gasosos o qual contribui com a crescente melhora na qualidade, confiabilidade das análises e poder de detecção de substancias utilizando está técnica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método analítico por cromatografia gasosa com detecção por FID (*Flame Ionization Detector*) e injeção *headspace transferline* para determinação de solventes residuais em Indapamida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter um método cromatográfico com seletividade entre os solventes analisados no método.

Avaliar a linearidade, precisão e exatidão do método para os solventes analisados.

Investigar a presença de solventes residuais em IFA de Indapamida usando a metodologia validada por Cromatografia Gasosa.

Quantificar os solventes encontrados avaliando se a concentração respeita os limites estabelecidos pelo ICH.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Com a Resolução RDC nº 57 de 18 de novembro de 2009, ficou estabelecido que as análises de solventes residuais serão obrigatórias para liberação de medicamentos e insumos farmacêuticos para o consumo da população, esta metodologia também poderá ser aplicada na liberação desses solventes para indústrias farmacêuticas.

Segundo a (ANVISA, 2017)

Insumos farmacêuticos ativos (IFAs), são uma substância química ativa, fármaco, droga ou matéria-prima que tenha propriedades farmacológicas com finalidade medicamentosa, utilizada para diagnóstico, alívio ou tratamento, empregada para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos, em benefício da pessoa na qual se administra. É determinado como princípio ativo do medicamento.

Esta determinação é de extrema importância, pois na rota sintética de IFAs de fármacos sintetizados são utilizados solventes em quantidades consideráveis, em que na sua maior parte permanecem na matéria prima mesmo no decorrer de todo o processo. Porém, no produto final (medicamento) ou matéria prima (IFA), determina-se que certa quantidade destes solventes residuais, são legalmente aceitáveis sem prejudicar a saúde do consumidor, essas quantidades foram determinadas pelo guia de solventes residuais, o *International Council on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (FERRAZ, 2016, p. 11-19).

Os solventes residuais são classificados em 4 classes sendo elas, classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4. Esta classificação foi realizada pelo ICH de forma a definir a quantidade aceitável e permitida internacionalmente destes solventes. (GRIMM et al. 2010, p. 428; ICH, 2011, p. 5).

Solventes de classe 1 são classificados como alto potencial nocivo ao meio ambiente, e níveis tóxicos elevados a saúde humana, sendo preconizado a não utilização em processos produtivos de medicamentos ou IFA. Caso sua utilização seja indispensável na produção, devem seguir as especificações rigorosamente conforme a Tabela 1. O tricloroetano entra nesta classificação por apresentar um risco ambiental e ter seu limite de 1500 ppm que foi estabelecido pelos dados de segurança referentes (ICH, 2011, p. 5).

Tabela 1 – Classe 1 dos solventes residuais

| Solvente | Concentração limite (ppm) | Considerações |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Benzeno | 2 | Cancerígeno |
| Tetracloroeto de carbono | 4 | Tóxico e perigoso ambientalmente |
| Dicloroetano | 5 | Tóxico |
| 1,1 Dicloroetano | 8 | Tóxico |
| 1,1,1 Tricloroetano | 1500 | Nocivo ao meio ambiente |

Fonte: Tabela retirada do ICH, 2011, p. 5,

Os solventes classe 2, classificados por apresentar uma toxicidade que permite uma exposição diária (PDE) de níveis próximos de 0,5 a 22 mg. A Tabela 2 apresenta quais solventes pertencem a esta classe. (ICH, 2011, p. 6,).

Tabela 2 – Classe 2 dos solventes residuais

| Solventes | PDE (mg/dia) | Concentração limite (ppm) |
|-----------------------|--------------|---------------------------|
| Acetonitrila | 4,1 | 410 |
| Clorobenzeno | 3,6 | 360 |
| Clorofórmio | 0,6 | 60 |
| 1,2 dimetoxietano | 1,0 | 100 |
| Diclorometano | 6,0 | 600 |
| Metilciclohexano | 11,8 | 1180 |
| N-Metilpirrolidona | 5,3 | 530 |
| Nitrometano | 0,5 | 50 |
| Piridina | 2,0 | 200 |
| Sulfolano | 1,6 | 160 |
| Tetraidrofurano | 7,2 | 720 |
| Tetralin | 1,0 | 100 |
| Tolueno | 8,9 | 890 |
| 1,1,2-Tricloroetano | 0,8 | 80 |
| Xileno | 21,7 | 2170 |
| N, N-dimetilacetamida | 10,9 | 1090 |
| N, N-dimetilformamida | 8,8 | 880 |
| 1,4 dioxano | 3,8 | 380 |
| 2-etoxietanol | 1,6 | 160 |
| Etilenoglicol | 6,2 | 620 |

Fonte: Retirada do ICH, 2011, p. 6.

Os solventes da classe 3 tem potencial tóxico baixo e não apresentam risco a saúde humana em níveis aceitáveis para medicamentos. São livres de genotoxicidade e tem toxicidade reduzida em estudos de longo a curto prazo. Respeitando as boas práticas de fabricação pode-se utilizar até uma quantidade maior do que 50 miligramas por dia que é a dose utilizada sem precisar de justificativa. A Tabela 3 ilustra os solventes que fazem parte desta classe (ICH, 2011, p. 7,).

Tabela 3 – Classe 3 dos solventes residuais

| Solventes com contração limite de 5000 ppm | |
|--|-----------------------|
| Ácido acético | Etanol |
| Acetona | Pentano |
| Anisol | Acetato de etila |
| 1-Butanol | 1-Pentanol |
| 2-Butanol | Éter etílico |
| 3-Metil-1-butanol | 1-propanol |
| Acetato de butila | Formato de etila |
| Metil-etil-cetona | 2-Propanolol |
| Éter terc-butilmetílico | Ácido fórmico |
| Metilisobutil cetona | Acetato de propila |
| Sulfóxido de dimetila | Heptano |
| 2-Metil-1-propanol | Acetato de isopropila |
| Acetato de isopropila | Acetato de metila |

Fonte: Retirada do ICH, 2011, p. 7.

Solventes residuais da classe 4 não contêm riscos de toxicidade por não apresentarem dados toxicológicos, desta forma não apresentam limites determinados em excipientes ou medicamentos, podendo ser utilizado na fabricação dos mesmos. Quando utilizados em produtos farmacêuticos devem ser justificados seu uso e níveis dos resíduos. Estão identificados na tabela 4 os solventes que pertencem a está classe (ICH, 2011, p. 8).

Tabela 4 – Solventes residuais Classe 4

| Solventes Residuais classe 4 | |
|------------------------------|------------------------|
| 1,1-dietoxipropano | Metilisopropil cetona |
| 1,1-Dimetoximetano | Metiltetra-hidrofurano |
| 2,2-Dimetoxipropano | Éter de petróleo |

Fonte: Retirado do ICH, 2011, p.8.

A determinação de solventes residuais, vem sendo realizada por técnicas envolvendo cromatografia, sendo elas na fase líquida ou gasosa. Esta técnica possui grande importância desde o seu surgimento participando de vários experimentos que proporcionaram grandes avanços a comunidade científica devido a sua capacidade de separação e identificação de compostos, esta característica está diretamente ligada ao desenvolvimento em diversas áreas da ciência entre elas se encontra a área farmacêutica, conforme (COLLINS, 2009 p.7) relatou:

Vários autores têm chamado o século 20 “o século da cromatografia”, uma vez que essa técnica foi altamente importante no desenvolvimento de várias áreas das ciências físicas e biológicas durante todo este século. No momento, existem indicações que as cromatografias e as suas técnicas relacionadas também proporcionarão relevantes contribuições neste século 21.

Desta forma a importância da cromatografia desde do seu surgimento até o período atual continua em acessão na contribuição do avanço científico, sendo referência em diversas áreas incluindo a farmacêutica graças o avanço tecnológico instrumental, que vem se atualizando e disponibilizando equipamentos cada vez melhores e com alto poder de detecção, contribuindo para análises com alta confiabilidade e precisão.

Com a forte atualização e o crescimento da cromatografia, compêndios mundiais como as farmacopeias entre elas a “*United States Pharmacopeia*” (USP) Farmacopeia americana, vem referenciando métodos cromatográficos como a técnica utilizada para a quantificação e liberação de diversas análises de fármacos (IFA) e seus insumos farmacêuticos, dentre essas técnicas a que merece destaque pela sua importância e aplicação na segurança e aumento da qualidade dos fármacos é a cromatografia Gasosa (USP, 2020).

A cromatografia é classificada como um método físico químico de separação de compostos/substâncias em uma mistura, a qual ocorre por meio de duas fase divididas como fase móvel cujo objetivo é mover os compostos a serem separados, e a fase estacionária que é responsável pelas interações químicas, a qual quanto maior afinidade dos compostos com a fase estacionária maior a sua atração e retenção conseqüentemente, entretanto para que seja possível a separação, a atração entre os compostos com a fase estacionária a serem separados precisam ser ligeiramente diferentes, uma vez que se essa atração for exatamente igual os compostos vão se sobrepor o qual tal fato não é desejado. (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006 p.17-23)

Após sua descoberta a cromatografia se desenvolveu a uma velocidade muito alta e se especializou em duas áreas específicas de grade utilização sendo elas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), sendo a segunda subdivida em duas partes, sendo elas cromatografia gás-sólido e cromatografia gás líquido (SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, 2006 p.899-923).

Conforme a classificação de SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH (2006) p.899

Na **cromatografia gás-líquido**, a fase móvel é um gás, enquanto a fase estacionária é um líquido retido na superfície de um sólido inerte por adsorção ou ligação química. Na **cromatografia gás-sólido**, a fase móvel é um gás, ao passo que a fase estacionária é um sólido que retém os analitos por adsorção física. A cromatografia gás-sólido permite a separação de gases de baixa massa molecular, como os componentes do ar, sulfeto de hidrogênio, monóxido de carbono e óxido de nitrogênio.

Segundo os fundamentos de SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH (2006) p.914

A cromatografia gás-líquido pode ser aplicada às espécies relativamente voláteis e termicamente estáveis a temperaturas de até poucas centenas de graus Celsius. Um grande número de compostos de interesse possui essas qualidades. Conseqüentemente, a cromatografia gasosa tem sido amplamente aplicada na separação e determinação de componentes em variados tipos de amostras.

Por essas características, a cromatografia gás-líquido tem ampla abrangência nas análises de controle de qualidade em indústrias farmacêuticas, utilizadas tanto para análises de liberações de doseamento e substâncias relacionadas (impurezas), como para análises de solventes residuais, sendo adotadas em IFA e produto acabado (PA). Esta técnica possui vantagens quando comparadas a outras técnicas, sendo elas a alta capacidade de detecção e também alta seletividade de compostos e substâncias com ponto de ebulição na faixa de 25 a 400 °C, a seletividade destes compostos são devido à alta variedade e diversidade de fases estacionárias disponíveis no mercado atualmente, onde equipamento modernos possibilitam a junção de duas colunas com fases estacionárias diferentes aumentando ainda mais o poder e capacidade desta técnica, desta forma é possível realizar separação de vários solventes em uma mesma corrida (CHROMacademy, 2020).

A cromatografia gasosa apresenta várias opções para detectores, sendo muito importante a sua escolha baseado nas características dos analitos que serão analisados na técnica, o detector mais utilizado atualmente é o "*flame ionization detector*" FID (detector de ionização por chama). Este detector apresenta uma série de vantagens quando comparado com os demais, entre elas a alta faixa linear de trabalho, a capacidade de analisar diversas substâncias, ou seja ele é seletivo para substâncias com carbono ligado

a hidrogênio (C-H) por isso é quase universal, outro ponto positivo é a alta capacidade de resposta gerada. O funcionamento dele acontece através da ionização química do carbono (CH + O) formando (CHO⁺) + (e⁻), justamente essa energia é que gera o sinal do detector o qual através de software converte essa energia em um sinal numérico o qual pode ser observado nos cromatogramas (VISENTAINER, 2012 p. 274-279; COLLINS et al 2006 p.223-231).

A ANVISA determina que metodologias que não estão descritas em farmacopeias devem passar pelo processo de validação para que possam ser utilizadas como metodologia oficial para finalidade proposta, sejam elas utilizadas na liberação de teor de fármacos, liberação de solventes residuais entre outras análises realizadas pela indústria farmacêutica. Dentro deste processo de validação descrito pela RDC 166, a metodologia é considerada validada quando cumpre os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limite de quantificação e robustez.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Introdução

A cromatografia gasosa é uma técnica muito versátil com grande potencial, tendo destaque no cenário mundial em diversas áreas da ciência, muito desta capacidade é devido ao seu poder de detecção elevado e sua reprodutibilidade de dados ser extremamente precisa, esta técnica mostrou um grande avanço em tecnologia desde de sua existência. Sua vantagem em relação a cromatografia líquida (HPLC) é na análise de substâncias com ponto de ebulição de médio e baixo valor (30 a 400 °C), outra vantagem é a capacidade da técnica analisar amostras no estado gasoso assim como no estado líquido (CAMARASU et al, 2006 p.768-777; GRODOWSKA et al 2010 p.13-26).

Dentre as áreas da ciência uma que apresenta destaque na utilização desta técnica é a farmacêutica para a análise de solventes residuais. Estes solventes são provenientes da síntese utilizados na fabricação das matérias primas e produto acabados, a qual mesmo após etapas de purificação para retirada dos mesmos, uma parte ainda pode permanecer contida nestes fármacos. No Brasil, a legislação vigente preconiza que estas substâncias devam ser controladas e devem seguir as especificações impostas pelo ICH, a qual garantam que a porcentagem que permanece destas substâncias não seja prejudicial. Dentre os solventes que podem estar contidos na matéria prima após as etapas de síntese, destaca-se os solventes da classe 1 conforme classificação do ICH, nesta classe estão os

solventes mais perigosos a saúde dos pacientes por este motivo sua especificação é extremamente baixa, pois solventes como o benzeno fazem parte desta classe, este solvente tem potencial carcinogênico isso corrobora para a especificação serem tão rigorosa, e no caso específico do benzeno é de 2 ppm, o ICH realiza diversos testes e através desses resultados, comprova que o nível de 2 ppm para o benzeno não causa qualquer dano ao ser humano, promovendo assim segurança a saúde dos pacientes (PURANIK et al, 2009 p.410-414).

Neste trabalho foi avaliado a presença de solventes no IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) Indapamida, pois este é um fármaco indicado no tratamento da hipertensão arterial, comumente conhecida como pressão alta. Essa doença é considerada comum e causa uma força excessiva do sangue contra a parede das artérias, estimasse que cerca de 2 milhões de pessoas convivem com a doença só no Brasil, fármacos como a indapamida são utilizados no controle desta doença e na sua grande maioria esses fármacos são ingeridos em tratamentos para uso prologado ou até mesmo contínuos (MALACHIAS, 2016 p. 35-43).

Na produção deste fármaco encontrasse solventes residuais como o etanol, 2-propanol, THF e o clorofórmio os quais necessitam do controle para comprovar a qualidade do fármaco e promover saúde aos pacientes que vão fazer uso deste medicamento, estes solventes pertencem as classe 2 e 3 da classificação do ICH. O etanol e o 2-propanol encontram-se na classe 3 e possuem o controle com concentração de 5000 ppm por não serem solventes que possuem um índice de toxicidade elevados porém merecem atenção e devem ser monitorados, pois em altos níveis podem gerar danos à saúde. O THF e o clorofórmio são de classe 2, este solventes apresentam toxicidade maior quando comparado aos solventes de classe 3, desta forma seu controle é mais rigoroso sendo controlados com 720 ppm para o THF e 60 ppm para o clorofórmio. Dentre os solventes analisados neste trabalho o clorofórmio é o que apresentam maior risco toxicológico, o qual quando ingerido é metabolizado pelo rim e pode desenvolver em casos extremos insuficiência renal conforme (FANG, 2008 p. 48-55).

Na literatura não há metodologia que realize o controle dos solventes residuais na matéria prima do fármaco Indapamida, desta forma o controle da mesma será realizado pela cromatografia gasosa com *transfer line* e detector “flame ionization detector” (FID).

4.2 **Materiais e Métodos**

4.2.1 Reagentes

O reagente utilizado na validação foi o tetrahidrofurano (THF) pureza 99,57% e 2-propanol pureza 99,99% ambos do fabricante (*Biograde*), etanol pureza 99,86% do fabricante (*Honeywell*) e o clorofórmio pureza 99,71% do fabricante (*Sigma-Aldrich*). Para o diluente foi utilizado dimetilacetamida pureza 99,87% do Fabricante (*Sigma-Aldrich*).

4.2.2 Preparo das soluções

A solução padrão mix (mistura de todos os solventes), foi preparada partindo das soluções estoques de cada solvente as quais foram diluídas com água até chegar nas concentrações a seguir: etanol 498,58 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2-propanol 499,85 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, clorofórmio 5,99 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e tolueno 71,54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A amostra Indapamida (solução teste) foi solubilizada em dimetilformamida até a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A amostra foi adicionada juntamente dos padrões, desta forma em um *vial* de Headspace de 20 mL foi adicionado 1,0 mL da solução do padrão mix, 1,0 mL da solução teste e 3,0 mL de água purificada.

Todas as soluções tem volume final de 5,0 mL no *vial* de Headspace, sendo que ao logo das soluções a quantidade de padrão foi variado conforme o nível que está sendo avaliado, por exemplo no nível de 40% o *vial* foi preparado usando 0,4 mL do padrão mix, 1,0 mL da solução teste e 3,6 mL de água purificada. Para o preparo dos *vials* de diluente, matriz e system foram seguidos os seguintes volumes.

O *vial* do diluente foi preparado da seguinte forma: 4,0 mL de água purificada e 1,0 mL de dimetilacetamida.

O *vial* da matriz: 4,0 mL de água purificada e 1,0 mL da solução teste.

O *vial* da solução system: 1,0 mL da solução padrão mix, 1,0 mL de dimetilacetamida e 3,0 mL de água.

Os preparos desta pesquisa foram preparados em triplicata, com exceção do parâmetro robustez o qual este foi avaliado do mesmo preparo.

4.2.3 Instrumentos

As análises foram realizadas no cromatógrafo gasoso marca (*Agilent Technologies*), modelo 7890B com amostrador "*Headspace Sampler*" (*Agilent Technologies*) modelo

7697A. Para o preparo das soluções utilizou-se uma balança marca (*Mettler Toledo*) modelo XP205, e um pipetador automático marca (*Eppendorf*) modelo *Multipette*® E3x.

4.2.4 Condições cromatográficas

As amostras e padrões foram injetadas no cromatógrafo utilizando volume de 1000 µL, com temperatura do injetor de 200 °C, e do Detector 240 °C. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com vazão a fluxo constante de 4,0 mL.min⁻¹. A coluna cromatográfica grupo G16 – marca (*Agilent Technologies*) modelo DB-WAXETR (100% Polyethylene glycol) 30 metros de comprimento x 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme, *liner* modo “Split” com lã de vidro para baixa pressão marca (*Agilent Technologies*, modelo 5190-2295). Vazão de separação (“split ratio”) 1:10. Temperatura do gradiente do forno inicial 35 °C por 25 minutos, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50 °C/min⁻¹ por 5,3 minutos, as condições utilizadas no módulo “Headspace sampler” estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições “Headspace Sampler

| | |
|--|--------------------------------|
| Volume de vial, (mL) | 20 |
| Tipo de Gás no vial (Vial Gas Type) | N2 |
| Volume de transferência (Loop Volume), mL | 1,0 |
| Temperatura de incubação (Vial Oven), °C | 90 |
| Temperatura do Loop, °C | 120 |
| Temperatura do Transferline, °C | 150 |
| Vial shaking | 6 |
| Ciclo do CG (GC Cycle time), min | 42,00 |
| Tempo de incubação (Vial Equilibration), min | 25,00 |
| Tempo de equilíbrio (Pressure Equilibration), min | 0,10 |
| Inject, min | 0,50 |
| Vazão de purga (Sample Probe Purge - Flow), mL.min⁻¹ | 100,0 |
| Tempo de purga (Sample Probe Purge - Time), min | 10,00 |
| Modo de preenchimento (Fill Mode) | Fill to pressure |
| Pressão de preenchimento (Fill Pressure), psi | 20 |
| Modo de extração (Extraction Mode) | Single + Vent After Extraction |

4.2.5 Parâmetros de Avaliação

Para avaliar o desvio padrão relativo entre as soluções analíticas analisadas no método, foi calculada conforme a Equação 1:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que, **DPR** desvio padrão relativo, **DP** desvio padrão e **CMD** a concentração média determinada

Para calcular os teores das soluções nos parâmetros linearidade, precisão, exatidão avaliados nesta metodologia, foi utilizando a Equação 2:

$$T(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = 25 \times \left(\frac{C \times V}{m}\right) \times \left(\frac{A_s - A_t}{A_{s100\%} - A_t}\right) \quad \text{Equação 2}$$

Em que, **T** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) teor do solvente residual; **25** fator de diluição das soluções; **C** concentração do solvente na Solução Padrão Mix, em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; **m** massa pesada, em g, da amostra para o preparo da Solução Estoque Teste; **V** volume pipetado, em mL, da Solução Padrão Mix no preparo da Solução Precisão 100%; **A_s** área do solvente residual na Solução Precisão em questão; **A_t** área do solvente residual na Solução Teste; **A_{s100%}** área do solvente residual na Solução Precisão 100%.

Para o avaliar a recuperação relativa nos parâmetros avaliados no método foi realizado o cálculo de cada recuperação conforme a Equação 3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{T(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})}{Tt(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que **Recuperação (%)** recuperação relativa percentual; **T** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) teor do analito calculado pela Equação 3; **Tt** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) teor teórico do analito de acordo com o nível de concentração (40%, 120% e 240%). Os critérios a serem respeitados foram retirados do ICH para o parâmetro de exatidão.

Os cálculos dos teores das soluções utilizados no parâmetro robustez foram realizados conforme a equação 4.

$$T(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = 50 \times \left(\frac{C \times V}{m}\right) \times \left(\frac{A_s - A_t}{A_{s100\%} - A_t}\right) \quad \text{Equação 4}$$

Em que, **T** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) teor do solvente residual; **50** fator de diluição das soluções; **C** concentração do solvente na Solução Padrão Mix, em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; **m** massa pesada, em g, da amostra para o preparo da Solução Estoque Teste; **V** volume pipetado, em mL, da Solução Padrão Mix no preparo da Solução Teste Contaminada (100%); **A_s** área do solvente residual na Solução Teste Fortificada (80%); **A_t** área do solvente residual na Solução Teste; **A_{s100%}** área do solvente residual na Solução Teste Contaminada (100%).

Para linearidade a fórmula matemática que relaciona as duas variáveis; concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ versus resposta das áreas dos analitos, é a equação da reta, conforme apresentados na equação 5:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 5}$$

Em que **y** resposta medida (área dos picos); **x** Concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; **ax** inclinação da curva de calibração (ou coeficiente angular); **b** Intersecção com o eixo y, quando $x = 0$ (ou coeficiente linear).

A resolução (R) avalia o grau de separação entre dois picos e pode ser calculada pela equação 6:

$$\text{Resolução (R)} = 2 * \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} \quad \text{Equação 6}$$

Em que, **t₂** e **t₁** são os tempos de retenção dos dois solventes da mistura; **w₁** e **w₂** são as larguras dos picos na linha de base medidos a meia altura, ou seja, é basicamente a razão entre a (diferença nos tempos de retenção) / (largura média do pico) (SNYDER, 2010 p.912).

4.2.6 Parâmetros Analisados Na Validação

4.2.6.1 Seletividade

Este parâmetro avalia a capacidade que o método analítico possui em medir exatamente um composto em presença de outros como impurezas e componentes da matriz, sendo avaliada através do cálculo de resolução, (R), o qual pode ser definida como a razão entre a distância entre os dois picos e a largura média desses picos medidos a meia altura ($h/2$), conforme mostrado na Equação 6. (BRASIL, 2010 p. 109-114; CHUST, 1990 p. 43-53).

4.2.6.2 Linearidade

Este parâmetro avalia se método possui correlação do aumento da concentração do solvente versus o aumento do sinal detectado, esta correlação é medida pelo Coeficiente de Correlação de Pearson (R_p) e é desejado que este coeficiente possua um valor superior que 0,990. Os testes estatísticos da linearidade foi avaliado com a utilização do software Action Stat®.

4.2.6.3 Precisão

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

A precisão da metodologia analítica foi verificada por dois critérios: repetibilidade e reprodutibilidade.

Na repetibilidade foi avaliado a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método foi verificada com três réplicas nas concentrações de 40%, 120% e 240% as quais correspondem suscetivelmente ao ponto baixo, médio e alto do conjunto de dados da metodologia.

Na reprodutibilidade foram avaliados os mesmos pontos (40%, 120% e 240%) ambos em triplicata, porém avaliados em dia diferente preparado por analista diferente.

4.2.6.4 Limite de Quantificação

Este parâmetro avalia o limite de quantificação da metodologia (LQ), ou seja, avalia qual a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com linearidade, precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, nesta concentração o sinal ruído (s/n) deve ser superior a 10.

4.2.6.5 Robustez

Na robustez foi realizado o estudo de alteração em algumas variáveis e consequentemente o efeito destas mudança nos resultados, foi avaliado a alteração na rampa inicial do forno, rampa de fluxo e troca do lote da coluna. Estas alterações são importantes para avaliar a fragilidade do método e quais cuidados são necessários para garantir a robustez dos resultados.

4.2.7 Especificações dos equipamentos

Para avaliar a calibração e estabilidade do equipamento, foi injetado separadamente 1,0 mL do Branco no início de cada parâmetro. Em seguida, foi injetado 1,0 mL de cada uma das seis soluções *System Suitability*. Para que o sistema esteja válido, o desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas das seis injeções para os solventes tetrahydrofurano, etanol e 2-propanol devem ser de no máximo 5,3% e para o solvente clorofórmio no máximo 7,3%, lembrando que estes valores seguem as especificações da AOAC (*ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS*) conforme a (AOAC,2016 p.9). A resolução entre os picos dos analitos de interesse e seus adjacentes deve ser maior ou igual a 1,0 conforme especificação da USP (USP 44, 2021).

As especificações de DPR e faixa de recuperação nesta metodologia seguem a AOAC as quais estão apresentados nas tabelas 6 e 7 e foram retiradas do apêndice F da AOAC (AOAC, 2016 p.9).

Tabela 6 – Critérios de aceitação para desvio padrão relativo

| Analitos | Níveis | DPR (%) Intermediária | DPR (%) |
|----------------------|----------------|--------------------------|---------|
| Tetrahidrofurano | 40 e 120% | 8 | 5,3 |
| | 240% | 6 | |
| Etanol 2-Propanol | 40, 120 e 240% | 6 | 5,3 |
| Clorofórmio | 40 e 120% | 11 | 7,3 |
| | 240% | 8 | 5,3 |

Tabela 7 – Critérios de aceitação para recuperação

| Analitos | Níveis | Recuperação (%) |
|----------------------|----------------|-----------------|
| Tetrahidrofurano | 40 e 120% | 90 – 107 |
| | 240% | 95 – 105 |
| Etanol 2-Propanol | 40, 120 e 240% | 95 – 105 |
| Clorofórmio | 40 e 120% | 80 – 110 |
| | 240% | 90 – 107 |

As especificações possuem faixas diferentes pois são elaboradas conforme a concentração de trabalho para cada solvente sendo elas para o nível 100% etanol e 2-propanol 5000 ppm, THF 720 ppm e o clorofórmio 60 ppm conforme ilustrados nas tabelas 2 e 3 do presente trabalho retiradas do ICH.

4.3 Resultados e Discussão

Para o desenvolvimento da metodologia usando a cromatografia gasosa por injeção *headspace* e detector FID foram realizadas as análises de seletividade, limite de quantificação, linearidade, precisão reprodutibilidade e repetibilidade, exatidão e robustez. Essas análises possibilitaram atestar e comprovar que a metodologia é adequada para quantificação dos solventes (etanol, 2-propanol, THF e clorofórmio) na amostra da matéria prima de indapamida.

4.3.1 Seletividade

Neste parâmetro foram feitos preparos individuais dos padrões de cada solvente a ser controlado (tetrahidrofurano, clorofórmio, 2-propanol e etanol), bem como o preparo da IFA de Indapamida sozinha e contaminada com todos solventes, possibilitando identificar cada

compostos individualmente, garantindo que independente das impurezas e substâncias desconhecidas que possam estar presentes no IFA, o método seja capaz de separar os compostos.

O cromatograma obtido para a mistura dos solventes nas concentrações limites conforme ICH, juntamente com a matriz, encontram-se na Figura 1.

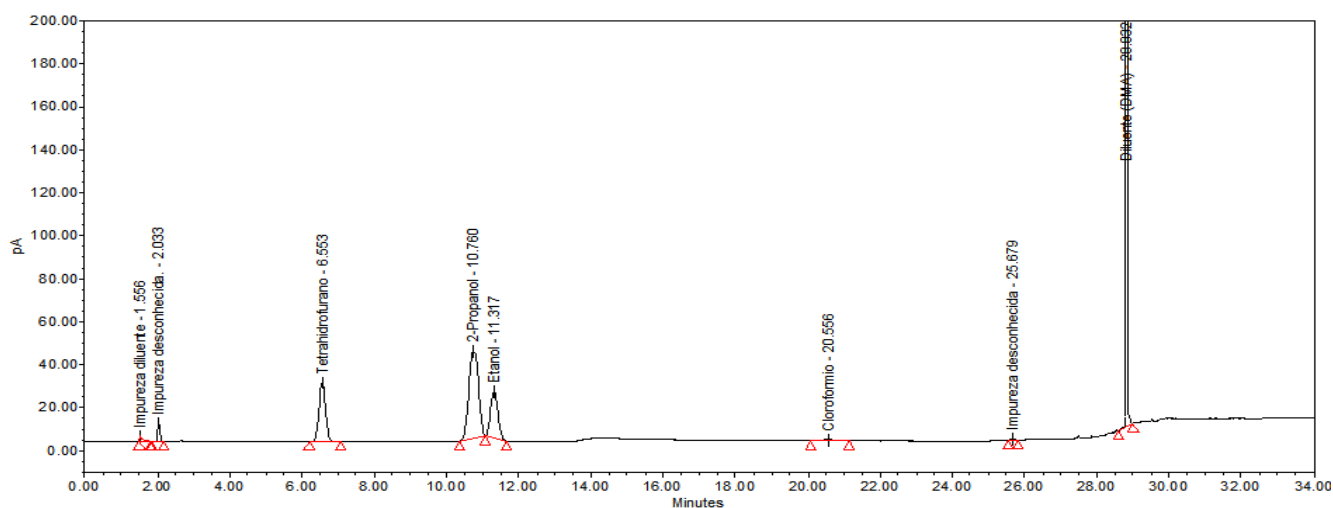


Figura 1- Cromatograma obtido para o conjunto dos solventes etanol, 2 propanol, THF e clorofórmio nas concentrações de 4985,8, 4998,5, 715,4 e 59,9 ppm, respectivamente em na presença de 100 mg da matriz indapamida. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

Com as injeções de todos os solventes individuais e também a injeção de todos os solventes misturados com a matriz, foi possível comprovar a identidade de cada solvente e também a seletividade de ambos em conjunto, os resultados de cada cromato da seletividade estão como anexo nesta pesquisa.

A Figura 1, demonstra que apesar dos picos do 2-propanol e etanol encontrarem-se próximos, entretanto estão bem definidos, isso ocorre provavelmente por ambos possuírem o mesmo grupo funcional (álcool), com apenas um carbono de diferença. Essa diferença é determinante quando os solventes são analisados e separados por uma coluna com alta polaridade como a DB-WAXETR (100% *Polyethylene glycol*). Observou-se que o etanol ficou ligeiramente mais retido em relação ao 2-propanol, esse fato pode estar relacionado do etanol ser mais polar quando comparado ao 2-propanol e também possuir uma molécula menor e desta forma facilitar a atração do etanol com a fase estacionária (VISENTAINER, 2012 p. 274-279).

Pode-se notar também que o clorofórmio apresenta uma área pequena quando comparados com os demais solventes do método, isso ocorre principalmente devido sua concentração estar 84 vezes menor quando comparado ao 2-propanol e Etanol. Entretanto, pode estar relacionado também ao fato deste solvente possuir apenas um carbono em sua estrutura e o detector usado (FID) ser detector de carbono, não gerando um sinal muito expressivo.

Os valores obtidos na comparação dos tempos de retenção relativo para os solventes separados e misturados com a IFA e as resoluções entre os solventes misturados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Tempos de retenção e resoluções dos solventes na Seletividade Teste

| Picos de Interesse | Concentração de trabalho (ppm) | TR (min) para cada solvente | TR (min) para mistura | R ($\geq 1,0$) para mistura |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| THF | 715,4 | 6,6 | 6,6 | 19,8 |
| 2-Propanol | 4998,5 | 10,8 | 10,8 | 10,5 |
| Etanol | 4985,8 | 11,3 | 11,3 | 1,3 |
| Clorofórmio | 59,9 | 20,6 | 20,6 | 16,7 |

TR- Tempo de retenção relativo. R- Resolução

Pode-se observar que não houve mudanças no tempo de retenção dos solventes puros e após a mistura, indicando que não ocorre interferências entre eles, além disso, na Tabela 8 a resolução (distância entre dois picos) dos solventes de interesse para a metodologia é maior que 1,0, este valor mostra que os solventes podem ser determinados separadamente. Estes valores seguem a especificação da USP para solventes residuais e comprovam que os picos não possuem coeluição e nem interferem ou possuem impacto na quantificação individual de cada analito, mostrando que os solventes 2-propanol e etanol podem ser determinados na metodologia proposta, os cromatogramas das injeções individuais de cada padrão analisado assim como a matriz indapamida e o diluente se encontram no anexo I, estes resultados corroboram na comprovação na identificação de cada solvente utilizado no presente trabalho (USP 44, 2021; ANVISA, 2017).

4.3.2 Linearidade

A Linearidade foi usada para avaliar a resposta detectada frente as faixas de concentração dos analitos estudados no método. Essas faixas foram definidas seguindo o guia ICH, o qual define a concentração limite para cada solvente. Este guia mostra que o

limite para controle dos solventes etanol e 2-propanol é a concentração de 5000 ppm, para o clorofórmio 60 ppm e THF 720 ppm, as porcentagens definidas para o estudo leva em consideração que 100% é referente a concentração limite para cada solvente, ou seja, para o etanol a concentração 100% equivale a 5000 ppm, da mesma forma para os outros solventes analisados no método. As análises foram realizadas usando a quantificação de três curvas analíticas e sete níveis, os quais foram: 40, 80, 100, 120, 160, 200, 240% compreendendo o intervalo de concentração da metodologia de 40% a 240% de cada solvente residual. A resolução 166 de 2017 preconiza que a linearidade deve contemplar no mínimo 5 níveis, sendo que o último nível deve atender no mínimo a concentração de 120% da especificação, ou seja o último nível avaliado pela metodologia não pode ser inferior ao nível 240%, e o primeiro nível avaliado deve ser o limite de quantificação determinado pelo método no qual este trabalho foi definido como 40% (ICH, 2011).

Os resultados encontrados para Coeficiente de Correlação de Pearson (Rp), intervalo de concentração e a média das equações da reta para cada solvente na linearidade encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados estatísticos de Rp e equação da reta na Linearidade

| | Rp | R ² | Intervalo de concentração (µg/g) 40% a 240% | Equação da reta (média) |
|-------------|-------|----------------|---|----------------------------|
| THF | 0,999 | 0,998 | 286,16 a 1716,96 | y = 4.21x - 9.53 |
| Etanol | 1,000 | 1,000 | 1994,32 a 11965,92 | y = 0.58x + 1.04 |
| 2-Propanol | 0,999 | 0,998 | 1999,38 a 11996,28 | y = 1.05x + 10.14 |
| Clorofórmio | 0,994 | 0,987 | 23,98 a 143,88 | y = 2.27x + 0.96 |

Pode-se observar que todos os solventes apresentaram coeficiente de correlação (Rp) acima de 0,99 nos intervalos estudados, esses valores mostram que o dados apresentam um ótimo ajuste linear corroborando com os valores encontrado no trabalho de (GUAN, 2017 p. 393-397). Avaliando o R² os resultados se mostram robustos e apresentam correlação na faixa estudada em todos os solventes desta metodologia, todos os resultados apresentam valores acima de 0,987 valores proximos ao encontrados nos trabalhos de Asfaw e Masoom utilizando a mesma tecnica cromatografica e mesmo detector (ASFAW,2020 p-6; MASOOM, 2017 p. S2483). A Fim de comprovar o modelo linear, foram determinados modelos estatísticos utilizando a aplicação do software Action Stat®. A Tabela 10 mostra os resultados dos testes estatísticos da linearidade para os solventes.

Tabela 10 – Resultados estatísticos da Linearidade para todos os solventes

| Teste | Conclusão |
|--|---|
| Teste F da ANOVA | Não rejeitamos a significância do modelo linear |
| Teste de Normalidade dos Resíduos | Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos |
| Teste de Homocedasticidade | Não rejeitamos a homocedasticidade da variância |
| Teste de independência das observações | Não detectado dependência das observações |

Para a avaliação se os dados do conjunto linear possuem significância de 95% ou seja se os valores obtidos fazem parte de um modelo linear foi utilizado o teste de F. Após calculado para todos os solventes os resultados mostraram-se estatisticamente significativos uma vez que o F calculado é maior que o F tabelado ($F_{calc} > F_{tab}$), isso indica que os valores referente a linearidade apresentam uma relação linear entre as duas variáveis (resposta versus concentração) calculado conforme a equação 5, onde quanto maior for a razão entre o F_{calc} e F_{tab} mais significativa é essa relação. Analisando os resultados do teste F foi possível verificar que todos os solventes possuem F_{calc} superior ao tabelado indicando que a significância do modelo linear não foi rejeitada, ou seja, o coeficiente angular é significativo, o qual é desejado e demonstra que o método possui angulação de reta e quando avaliado juntamente com o Coeficiente de Correlação Pearson e o R^2 mostra que o método possui um ajuste linear adequado, corroborando com os critérios de aceitação .(PIMENTEL & NETO, 1996 p. 268-277; DRAPER & SMITH, 1981 p. 709).

Ao avaliar a análise de variância (ANOVA), é importante que os erros apresentem variância comum, ou seja, homocedasticidade. Isso demonstra que cada tratamento que está sendo comparado pelo teste F, apresente aproximadamente a mesma variância. Quando este resultado não é atendido pode-se dizer que as variâncias não são homogêneas, ou ainda, que existe heterocedasticidade o qual indica um problema para o modelo linear e não é desejado.

Outro teste utilizado para avaliação dos parâmetros estatísticos na linearidade é o teste de Breusch-Pagan, baseado no teste multiplicador de Lagrange. Este é bastante utilizado para avaliar a hipótese nula de que as variâncias dos erros são iguais (homocedasticidade) versus a hipótese alternativa de que as variâncias dos erros são uma função multiplicativa de uma ou mais variáveis, sendo que está(s) variável(eis) pode(m) pertencer ou não ao modelo em questão. Aplicando o teste de Breusch-Pagan foi possível avaliar o modelo por teste de hipótese com nível de significância de 95% sendo neste caso H_0 : As variâncias dos níveis são iguais e H_1 ; Pelo menos uma variância é diferente. Após

avaliar o modelo foi possível comprovar por meio do p-valor superior a 0,05 (Resultados p-valor etanol 0,61; THF 0,08; clorofórmio 0,47; 2-propanol 0,08) obtido pelo teste de hipótese, que o modelo linear apresenta homoscedasticidade, ou seja, as variâncias ao longo do modelo linear são estatisticamente iguais (BREUSCH, PAGAN, 1979 p.1287-1294).

Foi avaliado também a independência dos dados obtidos na linearidade utilizado o teste de Durbin-Watson o qual detecta a presença de autocorrelação (dependência) nos resíduos de uma análise de regressão. A fim de verificar se o modelo linear apresenta dependência dos dados foi aplicado o teste de hipótese, onde foi suposto como hipótese H0: As observações são independentes e H1: Observações não são independentes. O resultado apresentou p-valor superior a 0,05 (Resultados p-valor etanol 0,32; THF 0,82; clorofórmio 0,10; 2-propanol 0,06) comprovando a hipótese H0 demonstrando que o modelo linear apresenta independência dos dados. (DURBIN e WATSON, 1951 p.157-177)

Segundo Patrick Royston (1982) a normalidade dos resíduos é uma suposição essencial para que os resultados do ajuste do modelo de regressão linear sejam confiáveis. Pode-se avaliar essa suposição por meio de testes como o de Shapiro-Wilk. Este teste foi proposto em 1965, e é baseado na estatística W, ele visa analisar a normalidade dos resíduos, ou seja, se os dados dentro da linearidade pertencem a uma população normal, esta análise é feita por meio do teste de hipótese e nível de significância de 95%. Para isso, avalia-se a hipótese com H0: amostra provém de uma população normal, e H1: amostra não provém de uma população normal. Após o teste de hipótese por Shapiro-Wilk foi possível observar que p-valor do teste apresentou valor acima de 0,05 (Resultados p-valor etanol 0,71; THF 0,69; clorofórmio 0,40; 2-propanol 0,97) o qual confirma H0 e demonstra que os dados avaliados pertencem a uma população normal (ROYSTON, 1982 p.115-124).

Desta forma, a análise estatística demonstrou cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade previsto pela ANVISA. Considera-se, então, que o método atende todos os requisitos mostrando ser linear para análise dos solventes residuais tetrahidrofurano, etanol, 2-propanol e clorofórmio na matéria prima Indapamida.

4.3.3 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação do método analítico foi constatado após testes e avaliações no qual a concentração que apresentou precisão, exatidão e sinal ruído maior que 10, foi a concentração de 40%. Este valor foi calculado individualmente para cada solvente residual ou seja como exemplo a especificação do clorofórmio sendo de 60 ppm isso equivale a

100% da especificação conforme ICH, então 40% desta especificação resulta no valor de 23,98 ppm, desta forma o LQ (limite de quantificação) nesta metodologia para o solvente clorofórmio corresponde a 23,98 ppm, visto que esta concentração apresentou precisão e exatidão, os resultados do LQ para os demais solventes desta pesquisa se encontram na tabela 11. Foram testadas concentrações abaixo de 40%, entretanto, as mesmas apresentaram resultados negativos de precisão e exatidão para o solvente clorofórmio.

Os resultados do LQ e da relação sinal/ruído referente a amostra 40% do limite da especificação para todos os solventes avaliados neste trabalho estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados de Limite de Quantificação e da relação Sinal/Ruído

| Analito | Relação Sinal/Ruído | | | LQ |
|-------------|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | Concentração µg |
| Injeção | | | | |
| THF | 461 | 464 | 517 | 286,16 |
| Etanol | 361 | 365 | 407 | 1994,32 |
| 2-Propanol | 656 | 659 | 733 | 1999,38 |
| Clorofórmio | 53 | 53 | 62 | 23,98 |

Os resultados para limite de quantificação atenderam o critério sinal ruído maior que 10, isto demonstra que o sinal detectado de cada solvente é superior no mínimo 10 vezes quando comparado ao sinal detectado da linha de base, este resultado é importante e desejável na avaliação do sinal gerado pelos analitos, pois afirma sensibilidade no método, confirmando que o sinal gerado é suficiente para que o pico seja identificado e não seja confundido com sinal gerado pela linha de base. Como era de se esperar, o solvente que apresentou menor resposta do sinal ruído foi o clorofórmio, pois é o solvente que apresenta menor concentração e possui menor número de carbonos em sua estrutura dentre os solventes avaliados, entretanto os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que o sinal gerado foi superior a 10.

A maior relação sinal/ruído foi conferido ao solvente 2-propanol, o segundo maior foi o solvente THF o qual mesmo com concentração inferior ao 2-propanol e etanol obteve um ótimo sinal, isso ocorre devido a estrutura da molécula possuir número de carbono superior aos outros solventes do método e quando analisados em detectores como o FID a resposta obtida é fortemente influenciada pela quantidade de carbonos ionizáveis presentes na estrutura da substância analisada.

4.3.4 Precisão

A Tabela 12 representa os dados da precisão repetibilidade no primeiro e segundo dia de análise.

Tabela 12 – Resultados da precisão repetibilidade 1º e 2º dia

| Solventes | Etanol DPR (%) | | 2-Propanol DPR 2 (%) | | THF DPR 3 (%) | | Clorofórmio DPR 4 (%) | |
|--------------------------|----------------------|--------|----------------------------|--------|---------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | 1º dia | 2º dia | 1º dia | 2º dia | 1º dia | 2º dia | 1º dia | 2º dia |
| Precisão 40% | 0,5 | 0,2 | 1,6 | 1,1 | 2,3 | 2,1 | 5,3 | 2,2 |
| Precisão 120% | 0,3 | 0,4 | 0,8 | 2,3 | 1,7 | 3,9 | 0,5 | 3,9 |
| Precisão 240% | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 1,1 | 1,2 | 2,0 | 2,8 | 2,4 |

Como pode ser observado, o desvio padrão relativo para os analitos entre as réplicas das amostras apresentam-se dentro das especificações de DPR conforme as faixas determinadas pela AOAC em ambos os dias de análise, comparando com resultados encontrados no trabalho do autor Papoušek demonstram que a técnica em cromatografia gasosa para análise de solventes é robusta a variações entre injeções (PAPOUŠEK, 2019 p. 1630-1632). Além disso, foram realizadas as análises de precisão reprodutibilidade, que mostra concordância entre os resultados em dias diferentes, essas medidas foram realizadas respeitando as mesmas concentrações e número de determinações, porém em dias diferentes, com analistas diferentes. Esta tem como objetivo avaliar o comportamento dos dados e comprovar a proximidade e reprodutibilidade dos resultados. A Tabela 13 mostra os resultados do DPR reprodutibilidade para os solventes estudados.

Tabela 13 – Resultados do DPR na precisão reprodutibilidade

| Solventes | Etanol DPR (%) | 2-Propanol DPR (%) | THF DPR (%) | Clorofórmio DPR (%) |
|----------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|
| Precisão 40% | 1 | 3 | 4 | 5 |
| Precisão 120% | 1 | 2 | 3 | 2 |
| Precisão 240% | 0 | 1 | 2 | 5 |

Observa-se que o método foi preciso quando aplicado à análise de precisão reprodutibilidade ou também nomeada de precisão intermediária, sendo possível comprovando que quando feitas comparações entre os resultados obtidos em dois dias

distintos das análises para os solventes de interesse e realizadas por analistas diferentes os resultados permanecem precisos pois seguem a faixa de variação descrita na AOAC.

4.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada no método analítico pela proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro. A análise foi realizada pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de analitos ao IFA. Foi verificada pelas medidas de recuperação do solvente em três réplicas nas concentrações de 40%, 120% e 240% como mencionado anteriormente.

A Tabela 14 ilustra os valores de recuperação obtidos para os quatro solventes, nas diferentes concentrações estudadas.

Tabela 14 – Resultados das recuperações do parâmetro exatidão

| Solventes | Etanol (%) | 2-Propanol (%) | THF (%) | Clorofórmio (%) |
|---------------|------------|----------------|---------|-----------------|
| Exatidão 40% | 101 | 103 | 105 | 105 |
| | 101 | 104 | 105 | 105 |
| | 101 | 102 | 101 | 101 |
| Exatidão 120% | 100 | 103 | 105 | 104 |
| | 100 | 102 | 105 | 104 |
| | 99 | 99 | 98 | 97 |
| Exatidão 240% | 101 | 103 | 105 | 102 |
| | 100 | 103 | 105 | 100 |
| | 100 | 101 | 101 | 98 |

Os resultados obtidos no parâmetro de exatidão, apresentaram valores de recuperação bem próximos para ambos solventes, demonstrando que todos os resultados se encontram com ótima performance para este parâmetro, a técnica se mostrou robusta e a presença da matriz na avaliação de todos os solventes na mesma corrida resultou em valores com ótima recuperação, desta forma a metodologia se mostrou exata nas condições avaliadas.

4.3.6 Robustez

A robustez foi avaliada no método analítico como a sensibilidade que este representa frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso na rotina laboratorial, constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas. Estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no

procedimento caso seja necessário. As variações na metodologia seguem as normas estabelecidas conforme Tabela 1 do anexo III da RDC 166 de 2017 o qual o guia infere que sejam feitas alterações nos parâmetros do método original, as condições testadas estão descritas a seguir.

4.3.6.1 Sem Alteração

Na robustez são comparados resultados entre a metodologia original, ou seja, sem nenhuma alteração, com cada alteração da metodologia, lembrando que as alterações são realizadas um de cada vez, ou seja é alterado por exemplo a temperatura da rampa inicial e todas as outras configurações da metodologia permanecem originais. As alterações que serão avaliadas na metodologia estão descritas logo abaixo:

4.3.6.2 Variação na temperatura inicial do forno da coluna

- Condição original do método: 35 °C;
- Condição testada: 33 °C e 37 °C.

4.3.6.3 Variação no fluxo do gás de arraste

- Condição original do método: 4,0 mL.min⁻¹;
- Condições testadas: 3,8 mL.min⁻¹ e 4,2 mL.min⁻¹.

4.3.6.4 Troca do lote da coluna cromatográfica

- Condição original do método: G16 – DB-WAXETR (*Polyethylene glycol*) 30 m x 0,53 mm x 2,00 µm de filme de revestimento, Fabricante Agilent Lote: USR141217H.
- Condição testada: G16- DB-WAXETR (*Polyethylene glycol*) 30 m x 0,53 mm x 2,00 µm de filme de revestimento, lote: USR141213H.

A recuperação dos resultados na robustez encontram-se na Tabela 15 as especificações do critério de aceitação seguem a AOAC.

Tabela 15 – Resultados de recuperação para robustez

| Robustez | Etanol (%) | 2-Propanol (%) | THF (%) | Clorofórmio (%) |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------|------------------------|
| Forno Baixo^{1*} | 97 | 96 | 96 | 106 |
| Forno Alto^{2*} | 99 | 97 | 96 | 98 |
| Fluxo Baixo^{3*} | 100 | 99 | 98 | 99 |
| Fluxo Alto^{4*} | 98 | 95 | 92 | 93 |
| Coluna^{5*} | 103 | 99 | 96 | 100 |

^{1*} Fluxo 3,8 ml.min⁻¹. ^{2*} Fluxo 4,2 ml.min⁻¹. ^{3*} Temperatura inicial do Forno 33°C. ^{4*} Temperatura inicial do Forno 37°C. ^{5*} Troca do lote da coluna cromatográfica.

Após analisar os resultados, verificou-se que não houve diferença significativa nos teores dos solventes tetrahydrofurano, 2-propanol, etanol e clorofórmio para ambas as alterações de robustez propostas para o método, estes resultados demonstram que o método mesmo exposto a variações de temperatura inicial do forno e fluxo, permanece com exatidão e o mesmo não compromete os resultados, este fator fortalece o método e enaltece a qualidade dos dados avaliados nesta pesquisa.

Com os resultados obtidos, afirma-se que a metodologia é robusta para todos os requisitos analíticos, podendo ser aplicada para determinação dos solventes do fármaco estudado.

4.4 Conclusão

A análise dos solventes residuais tetrahydrofurano, etanol, 2-propanol e clorofórmio, na matéria prima Indapamida por cromatografia em fase gasosa com detecção por FID e injeção *headspace transferline* utilizando como fase estacionária WAX ETR demonstrou que a metodologia alcançou seletividade pois apresentou separação entre os solventes, obteve um ótimo ajuste linear comprovado por teste estatísticos, além de apresentar precisão e exatidão na avaliação de todos os solventes quantificados juntos e na presença da matriz indapamida. Estes resultados mostram que não há necessidade de método específico para cada solvente separadamente, resultando em economia de recurso e tempo dentro da rotina laboratorial. Desta forma, essa validação permite consolidar este método como específico para análise de solvente residuais na matéria prima indapamida.

4.5 REFÊRENCIAS

1. ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Anexo da Resolução – RDC nº. 166 de 24 de julho de 2017 – Validação de Métodos Analíticos. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 acesso: 05/05/2020.
2. ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Anexo da Farmacopeia Brasileira. Brasília DF, 2021.
3. AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements p-9, 2016
4. ASFAW A. A, et al. “Development and validation of a thermal desorber gas chromatography method for determination of residual solvents in drug loaded albumin.” Journal of pharmaceutical and biomedical analysis vol. 179 (2020): 113032. doi:10.1016/j.jpba.2019.113032
5. BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, volume 1, 5. ed. Brasília, p. 109-114, 2010.
6. BREUSCH T. S. and PAGAN A. R. (1979) - A Simple Test for Heteroscedasticity and Random Coefficient Variation, *Econometrica*, Vol. 47, No. 5, pp. 1287-1294.
7. BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. 7 ed. Campinas, SP: UNICAMP, 1997. p. 141-180.
8. CAMARASU, C.; MADICHIE, C.; WILLIAMS, R. Recent progress in the determination of volatile impurities, *Trends Anal. Chem*, v.25, n.8, p.768-777, 2006.

9. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP p. 17-23: 223-231, 2006.
10. COLLINS C.H., Pilares da cromatografia, “Michael Tswett e o nascimento da Cromatografia”, v.1-n.1 p.7, 2009, disponível em: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n1a1.pdf> acesso: 11/06/2019.
11. CHROMAcademy. GC Columns. Disponível em: <http://www.chromacademy.com/GC-Columns/index.html>/ Acesso em: 27 abr. 2020.
12. CHUST, Rafael Berbert. Introdução cromatografia de líquidos (HPLC). Boletim SPQ, [S.l.], v. 39, p. 43-53, jan. 1990.
13. DURBIN, J. e WATSON, G.S. (1951). *Testing for serial correlation in least squares regression II*. Biometrika, 38(1/2) p. 159-177. doi:10.1093/biomet/38.1-2.159
14. DRAPER, N. A.; SMITH, H. (1981) Applied Regression Analysis. 2 ed. Wiley: p.709, 1981.
15. FANG, C.; BEHR, M.; FANG, X.; LU, S.; DORET, M.; LUO, H; YANG, W.; ALDOUS K.; DING, X; GU, J. Mechanism of chloroform-induced renal toxicity: Noninvolvement of hepatic cytochrome P450-dependent metabolism. *Jornal de Farmacologia e Aplicações Toxicológicas*, New York, v.15; n.227, p.48-55, fev. 2008.
16. FERRAZ, M. S. S. Estudo Teórico da relação ensaios de degradação forçada e estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos. 2016. 51 p. Monografia (Pós-graduação em Tecnologia Industriais Farmacêuticas) -Farminguihos Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro p.11-19, 2016.
17. GUAN, J. et al. “Development and Validation of a Gas Chromatography Method for Quality Control of Residual Solvents in Azilsartan Bulk Drugs.” *Journal of chromatographic science* vol. 55,4 (2017): 393-397. doi:10.1093/chromsci/bmw192

18. GRIMM, L. et al., Análises de solventes residuais em produtos farmacêuticos. 2010. 3p. Iniciação Científica (Faculdade de Farmácia) -Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul p-428, 2010.
19. GRODOWSKA, K.; PARCZEWSKI, A. Analytical methods for residual solvents determination in pharmaceutical products. Acta Pol. Pharm. Drug Res., v.67, n.1, p.13-26, 2010.
20. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R6). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, v. 44, n. October 2002, p. 1-13, 2011.
21. MASOOM R. S., and eat all, “*Determination of residual solvents in docetaxel by headspace gas chromatography*”, Arabian Journal of Chemistry, Volume 10, 2017 p. S2479-S2484, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.014>.
22. MALACHIAS, M.V.B. et al . 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 7 - Tratamento Medicamentoso. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo , v. 107, n. 3, supl. 3, p. 35-43, Sept. 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2016004800035&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 de maio de 2020.
23. MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. Cadernos temáticos de química nova na escola, Nº 3, p. 16-22. Maio 2001. Disponível em: Acesso em: 24 de maio 2020.
24. PAPOUŠEK, R, Ž, S, and eat all “*Determination of Residual Solvents in Isobutylboronic Acid: Masking Derivatization Improves Stability of GC Column. J Sep Sci*”2019; Vol.42 p.1629–1633. <https://doi-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jssc.201800968>

25. PIMENTEL, M. F.; NEETO, B.B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova*. v. 19, n. 3, p. 268-277, Setembro. 1996.
26. PRADO, A. R. M A Indústria Farmacêutica Brasileira: a atuação das Empresas Transnacionais face ao acirramento da concorrência, depois da aprovação dos genéricos. Dissertação Pós-Graduação Ciências Econômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filhos (UNESP), campus Araraquara p.36-38, 2008.
27. PURANIK, S.B.; PAWAR, V.; LALITHA, N.; PAI, P.N.S.; RAO, G.K. "Residual solvent analysis in hydrochloride salts of active pharmaceutical ingredients. *Pak. J. Pharm. Sci*", v.22, n.4, p.410-414, 2009.
28. ROYSTON P. An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. *Applied Statistics*, 31, p.115-124, 1982.
29. SILVA, M.G.C.; DOMINGOS, T.S.; CARAMASCHI, S. Hipertensão arterial e cuidados com a saúde: concepções de homens e mulheres. *Psic., Saúde & Doenças*, Lisboa, v. 19, n. 2, p. 435-452, ago. 2018 . Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1645-00862018000200021&lng=pt&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.15309/18psd190221>. Acesso em: 23 junho 2020.
30. SINGH, J. "International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Journal of Pharmacology e Pharmacotherapeutics*", India, v. 6, n. 3, p. 185-187, ago. 2015.
31. SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006, capítulo 31, página 899-923.
32. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. Introduction to modern liquid chromatography. 3 ed. United States of America: Wiley. p. 912, 2010

33. USP. The United States Pharmacopeia, 44. United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, chapter <467> RESIDUAL SOLVENTS, 2021

34. VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. Quím. Nova, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000200008&lng=en&nrm=iso>./Acesso em: 28 de maio 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000200008>.

ANEXO I

Contribuindo com resultados da seletividade as figuras 1 a 8 demonstram as injeções realizadas de cada padrão individual, da matriz individual e a injeção de todos os padrões com a matriz, todos os vials contem diluente na proporção água purificada e DMA 4:1.

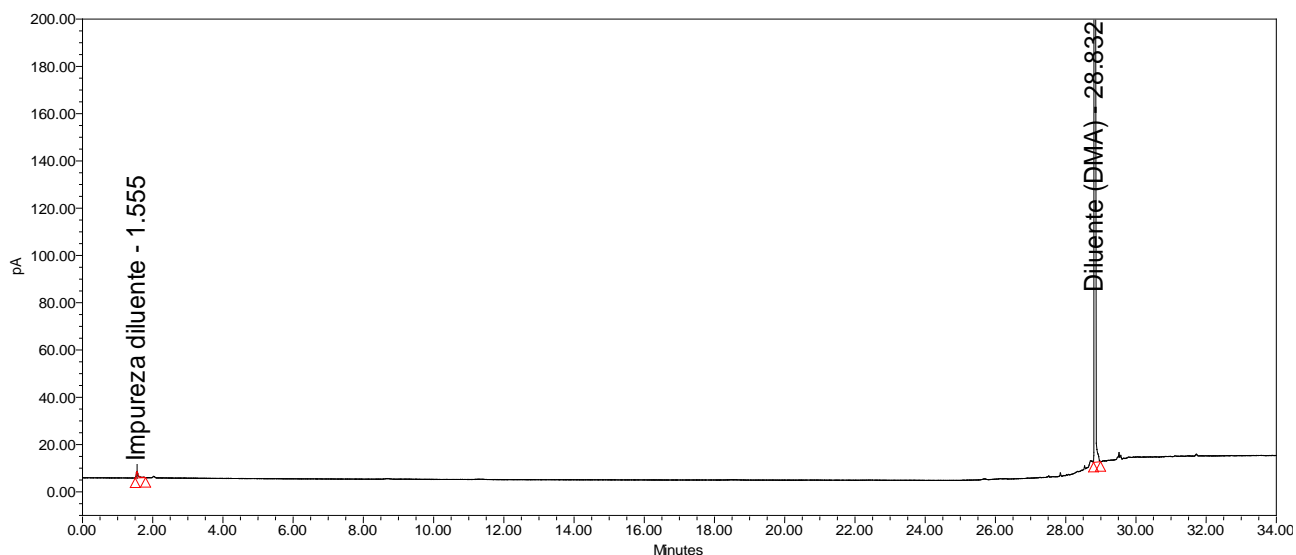


Figura 1 - Cromatograma obtido para o diluente DMA e água purificada na proporção (DMA 1:4 H₂O) Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

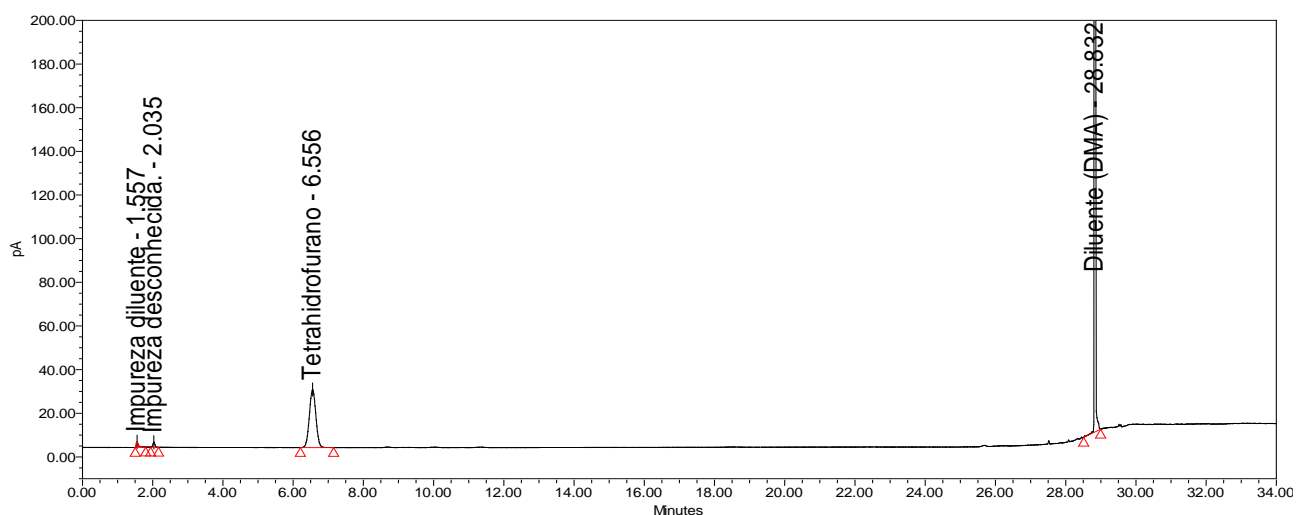


Figura 2 - Cromatograma obtido para o solvente individual THF na concentração de 715,4 ppm. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

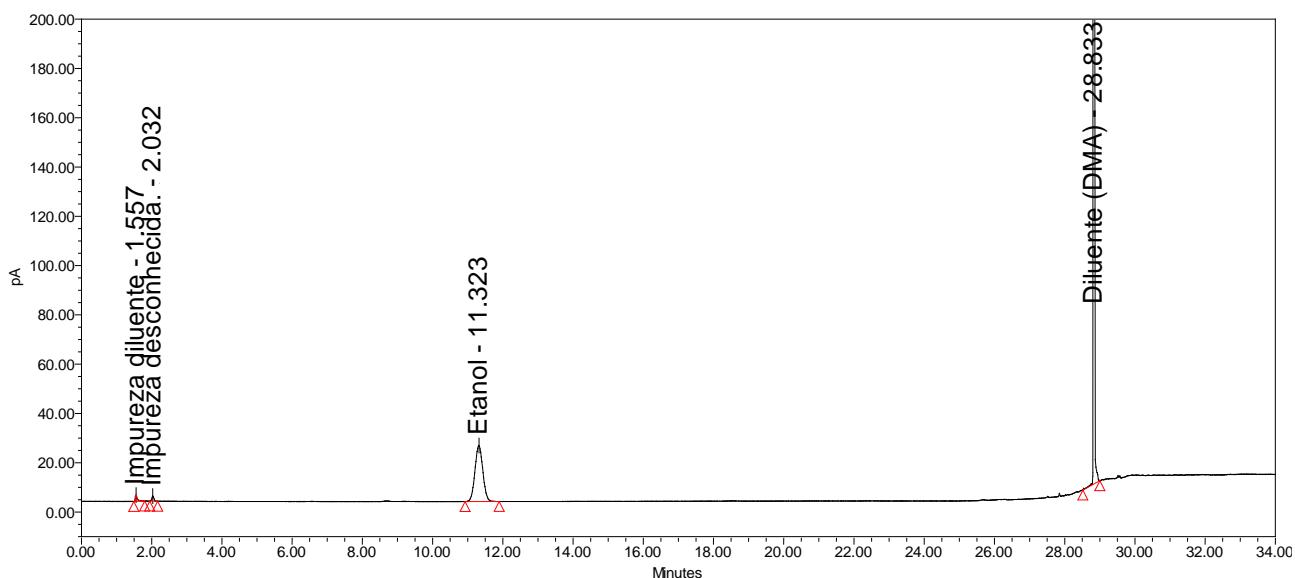


Figura 4- Cromatograma obtido para o solvente individual etanol na concentração de 4985,8 ppm. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

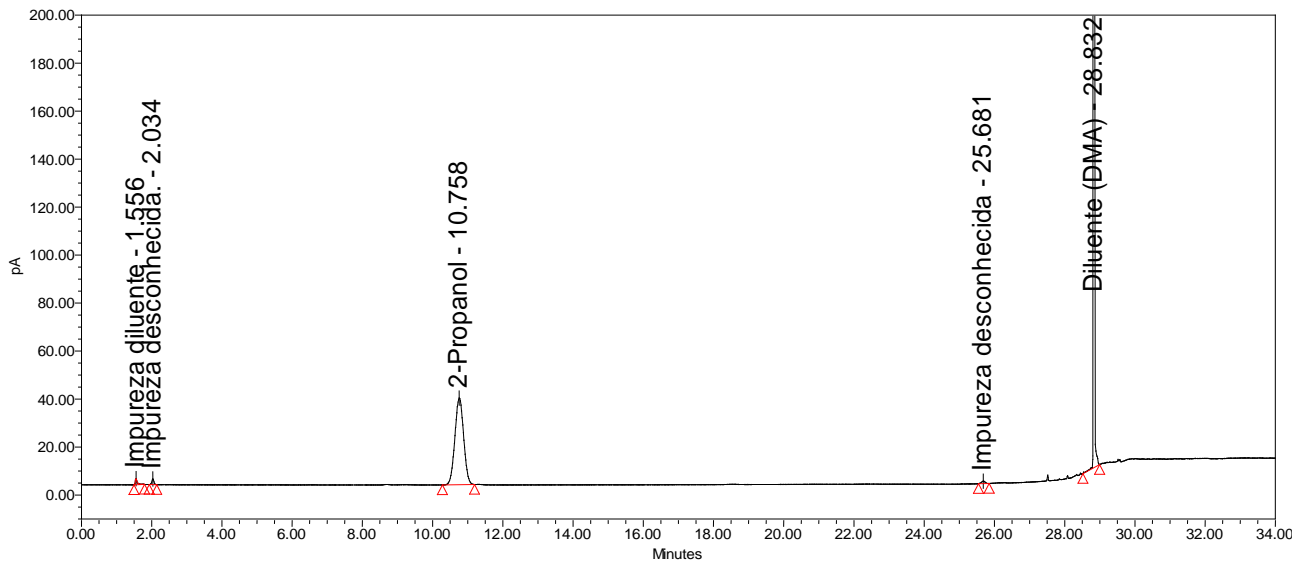


Figura 4 - Cromatograma obtido para o solvente individual 2 propanol, na concentração de 4998,5 ppm. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

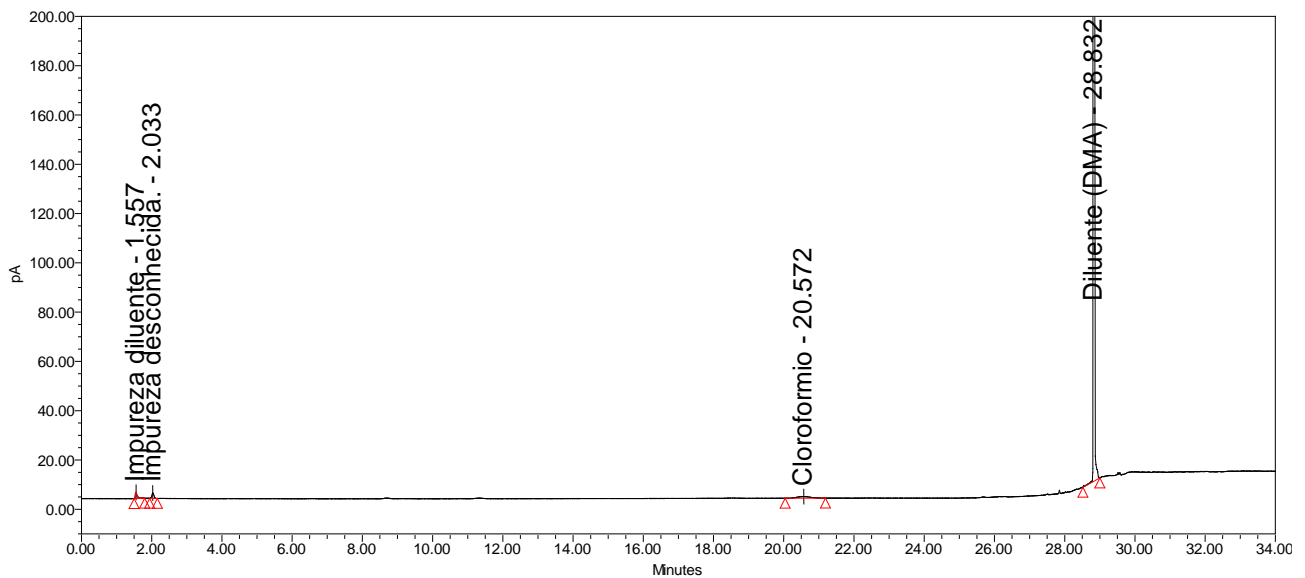


Figura 5 - Cromatograma obtido para o solvente individual cloroformio na concentração de 59,9 ppm. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

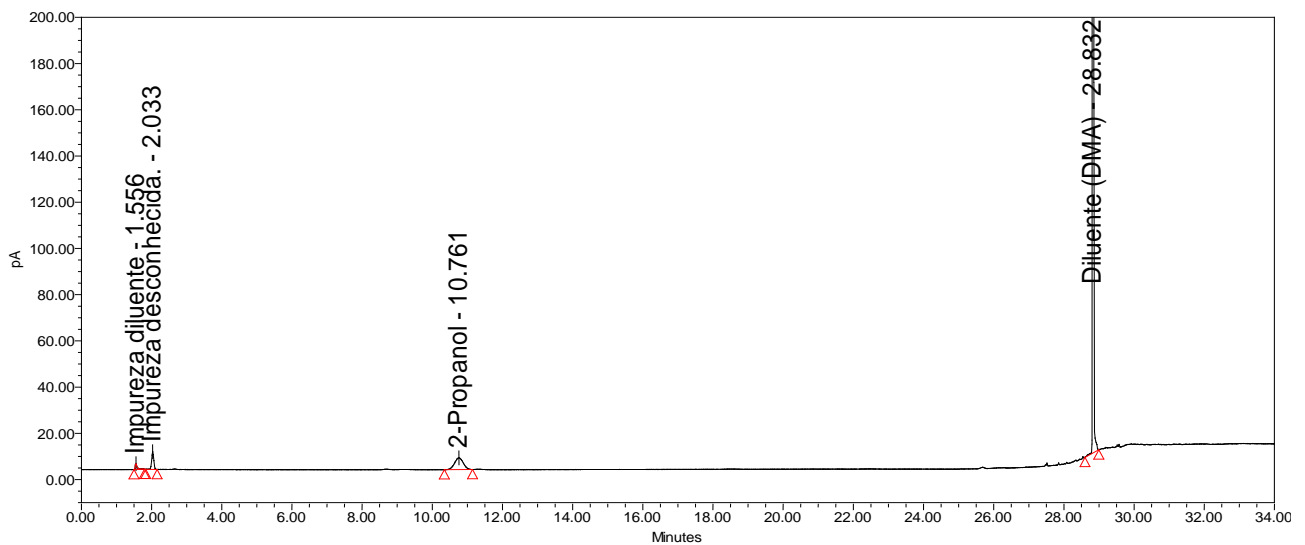


Figura 6 - Cromatograma obtido para 100mg da matriz indapamida individual. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio 4,0 mL.min⁻¹ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220 °C com taxa de aquecimento de 50°C. Min⁻¹ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, 0,53 mm de diâmetro interno x 2,00 µm de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

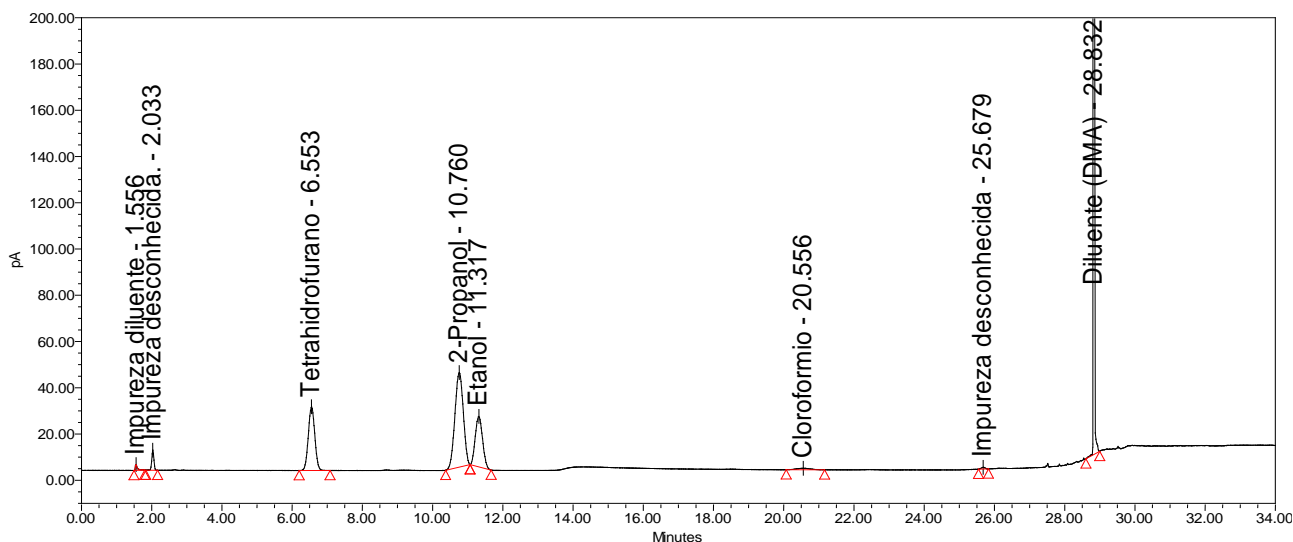


Figura 7 - Cromatograma obtido para o conjunto dos solventes etanol, 2 propanol, THF e cloroformio nas concentrações de 4985,8, 4998,5, 715,4 e 59,9 ppm, respectivamente sem a presença da matriz. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220°C com taxa de aquecimento de $50^\circ\text{C}\cdot\text{Min}^{-1}$ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, $0,53 \text{ mm}$ de diâmetro interno x $2,00 \mu\text{m}$ de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.

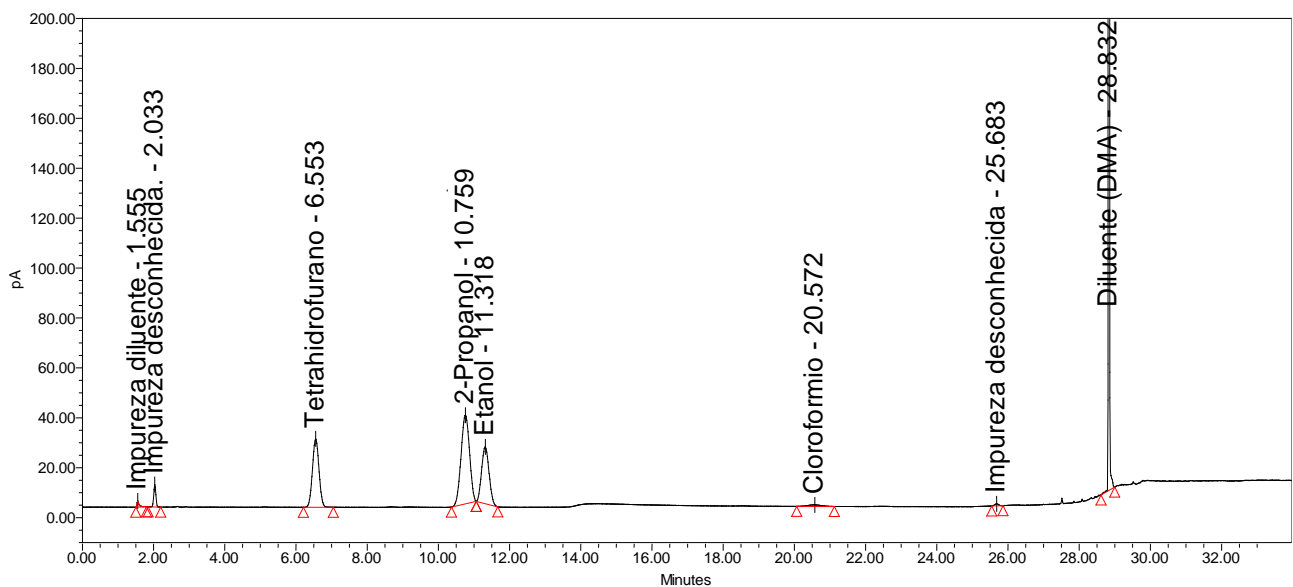


Figura 8 - Cromatograma obtido para o conjunto dos solventes etanol, 2 propanol, THF e cloroformio nas concentrações de 4985,8, 4998,5, 715,4 e 59,9 ppm, respectivamente na presença de 100 mg da matriz indapamida. Os parâmetros cromatográficos foram: vazão de separação (“split ratio”) 1:10, fluxo do gás de araste hélio $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de Temperatura do gradiente do forno inicial 35°C por 25 min, alterando para 220°C com taxa de aquecimento de $50^\circ\text{C}\cdot\text{Min}^{-1}$ por 5,3 minutos, utilizando coluna cromatográfica WAX ETR comprimento 30 metros, $0,53 \text{ mm}$ de diâmetro interno x $2,00 \mu\text{m}$ de revestimento do filme e cromatógrafo gasoso Agilent com transfer line.