



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

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM SUCCINATO DE
METOPROLOL POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA
RÁPIDA**

Juliano Parizotto Vissotto

**Toledo – PR
2023**



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

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM SUCCINATO DE
METOPROLOL POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA
RÁPIDA**

Juliano Parizotto Vissotto

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: Rodrigo Sequinel

**Toledo – PR
2023**

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

Vissotto, Juliano Parizotto

Otimização de método analítico para determinação de etanol em succinato de metoprolol por cromatografia em fase gasosa rápida / Juliano Parizotto Vissotto; orientador Rodrigo Sequinel. -- Toledo, 2023.

57 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, 2023.

1. Cromatografia em fase gasosa rápida. 2. Etanol. 3. Validação de método analítico. 4. Otimização. I. Sequinel, Rodrigo, orient. II. Título.

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM SUCCINATO DE METOPROLOL POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA RÁPIDA

Juliano Parizotto Vissotto

Resumo

Os solventes residuais são substâncias que estão presentes em diversas etapas do processo de fabricação de medicamentos. O solvente etanol é utilizado no revestimento dos comprimidos de Succinato de Metoprolol, e sua presença deve ser determinada a fim de garantir que seus níveis residuais não excedam os limites aceitáveis preconizados por guias de segurança toxicológica. Neste trabalho, um método analítico convencional, por cromatografia em fase gasosa e amostragem *headspace*, foi desenvolvido e validado para identificação e quantificação do solvente residual etanol em Succinato de Metoprolol 100 mg comprimido revestido. A seletividade do método apresentou resolução superior a 1,5 para o analito de interesse e a linearidade apresentou coeficiente de correlação superior a 0,99 demonstrando correlação linear entre a resposta analítica e aumento da concentração. Precisão e Exatidão foram obtidas de acordo com o que regem os guias de aceitação e o método se apresentou capaz de resistir as pequenas variações intrínsecas à análise. Foram testadas variações nas dimensões da coluna cromatográfica, taxa de aquecimento, taxa de divisão da amostra, vazão do gás de arraste de acordo com os conceitos de cromatografia em fase gasosa rápida, visando diminuir o tempo total de análise. A partir das otimizações realizadas, o método rápido foi validado e confrontado com o método convencional em termos de frequência analítica de trabalho no equipamento. O método rápido mostrou-se 2,2 vezes mais rápido do que o método convencional, atendendo as exigências de validação. Consequentemente, o método rápido pode ser empregado em ambientes de controle de qualidade em processos de controle de solvente residual em medicamentos, com maior eficiência, menor tempo de análise, gerando resultados seguros e confiáveis.

Palavras chave: Otimização; Solvente residual em medicamentos; Cromatografia em fase gasosa rápida.

OPTIMIZATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF ETHANOL IN METOPROLOL SUCCINATE BY FAST GAS CHROMATOGRAPHY

Juliano Parizotto Vissotto

Abstract

Residual solvents are substances that are present in many stages of the drug manufacturing process. Coating of Metoprolol Succinate tablets uses the solvent ethanol, and its presence must be determined in order to ensure that residual levels do not exceed the acceptable limits recommended by toxicological safety guides. In this work, a conventional analytical method by gas chromatography and headspace sampling was developed and validated for identification and quantification of the residual solvent ethanol in Metoprolol Succinate 100 mg coated tablet. The selectivity of the method evidenced a resolution greater than 1,5 for the analyte of interest and the linearity exhibited a coefficient correlation greater than 0,99, demonstrating a linear correlation between the analytical response and the increased concentration. The method obtained precision and accuracy in accordance with guides for acceptance criteria, and it was able to resist small variations intrinsic to the analysis. Variations in chromatographic column dimensions, heating rate, sample division rate, carrier gas flow were the tests performed, according to the concepts of fast gas chromatography, aiming to reduce the total analysis time. The quick method was validated, based on the optimizations performed, and compared with the conventional method in terms of analytical frequency of work on the equipment. The validated method proved to be 2,2 times quicker than the conventional method, meeting the validation requirements. Therefore, quality control can use the validated method in processes to control residual solvents in drugs, with greater efficiency, reducing analysis time, as well as generating safe and reliable results.

Keywords: Optimization; Residual solvent in drugs; Fast gas chromatography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.4: Solventes classificados como classe 3 de acordo com o guia de solventes residuais ICH ^l Q3C, R8 ^[4]	15
Tabela 2.5: Condições do módulo headspace transfer line 7697A.....	24
Tabela 3.6: Identificação, tempo de retenção e resolução para os solventes residuais testados como potenciais interferentes ao analito Etanol	28
Tabela 4.6: Resumo da conclusão do estudo estatístico de linearidade do solvente residual etanol por meio do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários – método convencional	30
Tabela 5.6: Resultados das precisões 1º dia, 2º dia e precisão intermediária para o solvente residual etanol – método convencional.....	31
Tabela 6.6: Resultados do ensaio de adição e recuperação para o solvente residual etanol – método convencional	32
Tabela 7.6: Resultados do estudo de robustez para determinação do solvente residual etanol mediante as variações propostas de lote da coluna, temperatura inicial de forno da coluna, vazão do gás de arraste e estabilidade das amostras – método convencional	34
Tabela 8.6: Comparação do valores de desvio padrão relativo e recuperação para os tempos de incubação de 20, 15 e 10 minutos na determinação do solvente residual etanol	36
Tabela 9.6: Valores de tempo de retenção e resolução do solvente residual etanol frente às modificações na temperatura do forno da coluna cromatográfica	40
Tabela 10.6: Resumo das modificações realizadas a partir dos testes de otimização para determinação do solvente residual etanol.....	43
Tabela 11.6: Identificação, tempo de retenção e resolução para os solventes residuais testados como potenciais interferentes ao analito Etanol	45
Tabela 12.6: Resumo da conclusão do estudo estatístico de linearidade do solvente residual etanol por meio do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários – método rápido	46
Tabela 13.6: Resultados para os ensaios de precisão e recuperação – método rápido	47
Tabela 14.6: Resultados do teste de efeito memória nas condições do método convencional	48
Tabela 15.6: Resultados do teste de efeito memória nas condições do método rápido	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.4: Fórmula estrutural molecular do insumo ativo Metoprolol (C ₁₅ H ₂₅ NO ₃). Fonte: Elaborado por Juliano Vissotto, 2023. ACD/Chemsketch.	14
Figura 2.4: Representação esquemática do funcionamento de um cromatografo gasoso. Fonte: Adaptado de Chromacademy, 2023. Disponível em: https://www.chromacademy.com/channels/gc-training-courses/instrumentation/preventative-gc-maintenance/ . Acesso em: 20 de fevereiro de 2023, às 16:41	16
Figura 3.6: Cromatograma do diluente água ultra purificada na Solução Branco	27
Figura 4.6: Cromatograma da mistura dos solventes residuais Metanol, Etanol, 2-Propanol e Tolueno contendo 1,0 mL da amostra de Succinato de Metoprolol avaliados na Solução Seletividade Teste.	27
Figura 5.6: Curva analítica para determinação do solvente residual etanol em comprimidos de succinato de metoprolol 100 mg – método convencional. Equação da reta $y = 0,0193x - 1,4017$	29
Figura 6.6: A distribuição e valores dos resíduos padronizados para o solvente residual etanol utilizado na construção da curva analítica – método convencional	30
Figura 7.6: Perfil cromatográfico e tempo de retenção do solvente residual etanol na fase estacionária G2, da marca Agilent, dimensões de 15 m x 0,32 mm e 3,0 µm de filme de revestimento	37
Figura 8.6: Cromatograma do solvente residual etanol com a razão de split de 1:100	38
Figura 9.6: Aproximação do cromatograma do solvente residual etanol na condição de razão de separação da amostra de 1:100.....	39
Figura 10.6: Cromatogramas obtidos em diferentes temperaturas iniciais de forno de coluna para comparação dos tempos de retenção do solvente residual etanol	40
Figura 11.6: Cromatogramas obtidos em diferentes vazões do gás de arraste para comparação dos tempos de retenção do solvente residual etanol	41
Figura 12.6: Aproximação dos cromatogramas obtidos nas vazões do gás de arraste de 1,6, 2,0, 2,2 e 2,8 mL.min ⁻¹ para comparação dos tempos de retenção e perfis cromatográficos	42
Figura 13.6: Cromatograma do diluente água ultra purificada na Solução Branco no parâmetro de seletividade do método rápido	43
Figura 14.6: Cromatograma da mistura dos solventes residuais Metanol, Etanol, 2-Propanol e Tolueno contendo 1,0 mL da amostra de Succinato de Metoprolol avaliados	44
Figura 15.6: Aproximação do cromatograma da mistura dos solventes residuais Metanol, Etanol, 2-Propanol e Tolueno contendo 1,0 mL da amostra de Succinato de Metoprolol avaliados	44
Figura 16.6: Curva analítica para determinação do solvente residual etanol em comprimidos de succinato de metoprolol 100 mg – método rápido. Equação da reta $y = 0,0024x - 0,0376$	46
Figura 17.6: A distribuição e os valores dos resíduos padronizados para o solvente residual etanol utilizado na construção da curva analítica – método rápido	47

SUMÁRIO

2.	INTRODUÇÃO.....	10
3.	OBJETIVOS.....	12
3.1	OBJETIVO GERAL.....	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
4.1	MEDICAMENTO.....	13
4.1.1	Succinato de Metoprolol.....	14
4.2	SOLVENTE RESIDUAL.....	14
4.3	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	15
4.3.1	Cromatografia em fase gasosa com amostragem por <i>headspace</i>	16
4.3.2	Coluna, separação e retenção na cromatografia em fase gasosa.....	17
4.3.3	Detectores empregados na cromatografia em fase gasosa.....	17
4.3.4	Redução no tempo de análise na cromatografia em gasosa rápida.....	18
4.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	19
4.4.1	Seletividade.....	20
4.4.2	Linearidade e limite de quantificação.....	20
4.4.3	Faixa de trabalho.....	21
4.4.4	Precisão.....	21
4.4.5	Exatidão.....	21
4.4.6	Robustez.....	21
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1	AMOSTRAS E REAGENTES.....	22
5.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	22
5.3	EQUIPAMENTOS.....	23
5.4	SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	23
5.5	AVALIAÇÃO DO SISTEMA.....	24
5.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO.....	25
5.7	ENSAIOS PARA REDUÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE.....	25
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
6.1	VALIDAÇÃO MÉTODO CONVENCIONAL.....	26
6.1.1	Seletividade.....	26
6.1.2	Linearidade, faixa de trabalho e limite de quantificação (LQ).....	28
6.1.3	Precisão.....	31
6.1.4	Exatidão.....	32
6.1.5	Robustez.....	33
6.2	REDUÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE.....	35
6.2.1	Alteração do tempo de incubação.....	35
6.2.2	Alteração do comprimento da coluna cromatográfica.....	37
6.2.3	Alteração da taxa de divisão da amostra (razão de separação, <i>split</i>).....	38
6.2.4	Alteração da temperatura inicial de forno da coluna.....	39

6.2.5	Alteração da vazão do gás de arraste mL.min ⁻¹ (velocidade linear)	41
6.3	VALIDAÇÃO MÉTODO RÁPIDO.....	42
6.3.1	Seletividade.....	43
6.3.2	Linearidade.....	45
6.3.3	Precisão e Exatidão.....	47
6.4	COMPARAÇÃO DO MÉTODO CONVENCIONAL <i>VERSUS</i> MÉTODO RÁPIDO.....	48
6.4.1	Teste de Efeito Memória método convencional.....	48
6.4.2	Teste de Efeito Memória método rápido	49
6.4.3	Teste de frequência analítica do equipamento no método convencional <i>versus</i> método rápido	49
7.	CONCLUSÃO.....	51
8.	PERSPECTIVAS E TRABALHOS FUTUROS.....	52
9.	REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE 1	56
APÊNDICE 2	57

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de produção de fármacos podem ser utilizadas diversas substâncias químicas, como é o caso dos solventes orgânicos. Estes solventes, geralmente voláteis, são utilizados em estágios de dissolução, cristalização, purificação de reagentes, excipientes e insumos ativos. Também pode ser utilizado em etapas de purificação de produtos terminados e na aplicação de revestimentos de comprimidos.^[1, 2]

Ao final destes processos, a presença de solventes não deve causar problemas, desde que seus níveis residuais não ultrapassem os limites aceitáveis preconizados por guias com base em dados de segurança toxicológica. Todavia, alguns destes solventes são de difícil remoção e permanecem presentes em pequenas frações que, se ultrapassados os valores aceitáveis estabelecidos, podem acarretar danos à saúde humana.^[3]

Alguns guias internacionais estabelecem os limites máximos permitidos para cada um dos principais solventes utilizados, sendo este valor estipulado pelo grau de periculosidade que o solvente pode causar à saúde conforme dados toxicológicos.^[4] Portanto, é de extrema importância que haja o desenvolvimento de metodologias de controle dessas substâncias residuais.^[5,6] A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador responsável pelos assuntos relacionados à saúde no país, por intermédio de compêndios e resoluções normativas e suas frequentes atualizações, estabelecem os parâmetros gerais e especificações que definem as boas práticas de fabricação de medicamentos, de modo que se tenha o controle de qualidade dos mesmos para o uso pretendido, de forma benéfica, segura e confiável.^[7]

Baseado em diretrizes internacionais, existem vários métodos oficiais de análise de solventes em medicamentos, descritos na literatura, todavia, sempre há a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias ou o aprimoramento das já existentes. A cromatografia em fase gasosa é uma técnica amplamente utilizada para detecção e determinação de solventes residuais em fármacos, visto que a maioria dos solventes são voláteis, termicamente estáveis e facilmente analisados por esta técnica analítica.^[5,6]

Durante o desenvolvimento de um método cromatográfico é essencial otimizar os parâmetros para a obtenção das melhores condições instrumentais, que atendam a legislação vigente, com a melhor eficiência e o menor custo para a empresa. Considerando a alta rotina dos laboratórios de desenvolvimento analítico e controle de qualidade, torna-se importante reduzir as etapas de preparação analítica e o tempo total de análise. O desafio deste projeto é prover um método confiável para determinação de etanol residual em medicamentos e, ao mesmo tempo, otimizar o tempo de

análise aumentando assim a frequência analítica trazendo benefícios diretos às empresas farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar método para determinação de etanol residual em amostras de succinato de metoprolol utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa e amostragem *Headspace*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar o método analítico para determinação de succinato de metoprolol por cromatografia gasosa convencional, tendo como ponto de partida outros métodos já validados no laboratório

Propor variações nos parâmetros cromatográficos e nas condições do *headspace* visando diminuir o tempo de análise, utilizando princípios da cromatografia gasosa rápida.

Testar os parâmetros seletividade, linearidade, limite de quantificação, faixa de trabalho, precisão, exatidão e robustez consoante a legislação vigente e validar as metodologias para determinação de etanol residual em amostras de succinato de metoprolol.

Comparar o ganho real em termos da frequência analítica de trabalho do equipamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MEDICAMENTO

Os medicamentos são substâncias farmacêuticas cuja finalidade é prevenir, tratar ou curar doenças, tendo seu uso atrelado às necessidades clínicas do consumidor. O Brasil é um dos principais consumidores que movimentam o mercado de medicamentos, chegando ao valor próximo de 22,1 bilhões de dólares anualmente.^[3,5,7] Esse mercado envolve uma estrutura industrial, logística e regulatória para os medicamentos chegarem da maneira mais segura possível à população, visando resolver suas necessidades clínicas, sem riscos de agravamento da situação.

Para um medicamento estar acessível ao consumidor, o mesmo passa por várias etapas em seu processo de fabricação para garantir a qualidade e eficácia do produto terminado. Abrangentemente, na fase de desenvolvimento do produto, são realizadas pesquisas sobre substâncias com propriedades terapêuticas. Em seguida tem-se a etapa de formulação, na qual os ingredientes ativos e excipientes são selecionados e testados para determinar a proporção final. Após isso, são produzidos lotes iniciais de performance para avaliar a qualidade e estabilidade do produto. Na fabricação em larga escala, baseado nas características e forma do medicamento, tem-se a utilização de processos como mistura, granulação, compressão, revestimento, secagem, rotulagem e embalagem, seguindo padrões rigorosos de boas práticas de fabricação. Por fim, são realizadas análises de qualidade regulares em rotina laboratorial para expor o medicamento à comercialização.^[8]

A estrutura de produção deve seguir as exigências de mercado e regulatórias, caso contrário os medicamentos podem passar por processos de *recall* ou retirada definitiva do mercado. *Recall* é a forma mais efetiva de proteger o público de um produto defeituoso ou potencialmente perigoso. Trata-se de uma ação proativa da indústria para a retirada de um lote de um produto do mercado, visando mitigar ou finalizar determinado problema. Todavia estas ações podem ser evitadas por um rigoroso controle de qualidade no processo e no produto acabado.^[9]

Uma das formas de se controlar a qualidade do medicamento é assegurar, desde a etapa de desenvolvimento da formulação até a etapa de fabricação do produto terminado, que o mesmo possui níveis toleráveis ou isenção de impurezas de acordo com o que rege a legislação.^[4,10] As impurezas encontradas em medicamentos são advindas das etapas de formulação, podendo ser atribuídas à presença de substâncias indesejáveis nas matérias primas ou insumo, produtos de decomposição ou solventes residuais do processo de produção que permanecem no produto acabado.^[5,6]

3.1.1 Succinato de Metoprolol

Nas últimas décadas, estudos voltados a área cardiovascular têm-se aprimorado de forma ampla, e como resultado, os efeitos e benefícios desses medicamentos têm sido comprovados. De acordo com suas funções específicas, os medicamentos cardiovasculares são separados em três tipos: os não seletivos, os cardioseletivos e o vasodilatadores.^[11]

O Metoprolol ($C_{15}H_{25}NO_3$), cuja fórmula molecular é observada na Figura 1, é considerado um medicamento betabloqueador cardioseletivo sem atividade de dilatação dos vasos sanguíneos, que tem como ação inibir os receptores β_1 de forma a reduzir o esforço do coração e controlar a frequência cardíaca.^[12,13] O seu uso é indicado no tratamento de doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca, hipertensão, alterações na frequência cardíaca, entre outros.^[11]

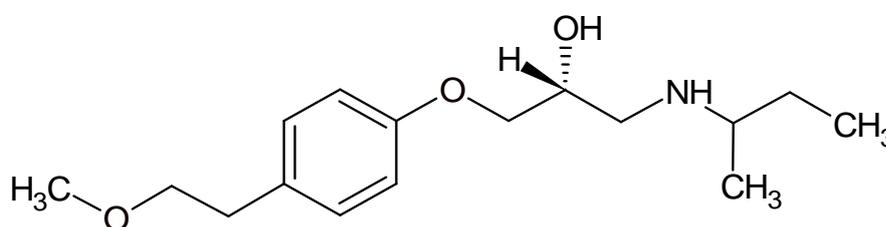


Figura 1.4: Fórmula estrutural molecular do insumo ativo Metoprolol ($C_{15}H_{25}NO_3$). Fonte: Elaborado por Juliano Vissotto, 2023. ACD/Chemsketch.

Este fármaco pode ser sintetizado a partir dos precursores metoprolol e ácido succínico na presença de vários solventes, dentre os quais o etanol é uma alternativa, conforme descrito na patente registrada CN103102281A que descreve o método de síntese do medicamento.^[14]

3.2 SOLVENTE RESIDUAL

De acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, são consideradas impurezas toda substância presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o princípio ativo e nem o excipiente.^[10]

Solventes residuais são definidos como substâncias orgânicas voláteis que estão presentes de maneira direta ou indireta no processo de fabricação de ativos, excipientes, ou na preparação de medicamentos. Por possuírem toxicidade considerável e prejudicial à saúde humana, é ideal que a quantidade presente em medicamentos seja mínima possível.^[5]

O ICH (*International Council for Harmonisation*), por intermédio do guia *Q3C(R8) Impurities: Guideline for residual solvents*, estabelece as quantidades de solventes residuais mínimas aceitáveis em ativos e em produtos terminados. A classificação dos solventes residuais se dá de acordo com a periculosidade de cada um, quanto maior o dano ou toxicidade causada a saúde humana, mais rigorosa é a quantidade permitida e mais se realça a não utilização destes no processo de fabricação do medicamento.^[4]

A classe 1 remete aos solventes de maior periculosidade, que devem ser evitados nos processos de obtenção dos insumos farmacêuticos, por possuírem uma elevada toxicidade com possíveis efeitos carcinogênicos e degradantes ao meio ambiente.^[4,5,15]

A classe 2 determina que o uso dos solventes listados deve ser limitado, sendo aceitável a exposição de 0,1 mg por dia, por possuírem toxicidade específica. Entretanto, caso o uso de algum solvente das classes supracitadas seja inevitável no processo de produção, deve-se restringir a sua especificação máxima conforme as diretrizes regulatórias.^[4,5,15]

A Classe 3 dos solventes residuais refere-se aos que possuem baixo riscos à saúde humana em níveis conhecidos de exposição, sua toxicidade é mínima em curto e longo prazo e não possuem ação genotóxica. Sua utilização é permitida respeitando a sua exposição máxima por dia aceitável é de 50 mg (correspondente a 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), e caso for ultrapassado esse limite deve-se justificar tecnicamente o seu controle.^[4,5,15] A Tabela 1 traz os solventes que são pertencentes à classe 3.

Tabela 1.4: Solventes classificados como classe 3 de acordo com o guia de solventes residuais ICH¹ Q3C, R8^[4]

Ácido acético	Heptano	Dimetilsulfóxido	Pentano
Acetona	Acetato de isobutila	Etanol	1-Pentanol
Anisol	Acetato de isopropila	Acetato de etila	1-Propanol
1-Butanol	Acetato de metila	Éter etílico	2-Propanol
2-Butanol	3-Metil-1-butanol	Formato de etila	Acetato de propila
Acetato de butila	Metiletilcetona	Ácido fórmico	Trietilamina
Éter metil terc-butílico	2-Metil-1-propanol	2-Metiltetrahidrofurano	

Existe ainda um quarto grupo de solventes residuais que não possuem estudos e nem informações o suficiente para afirmar o seu risco toxicológico em medicamentos.^[4]

O Etanol, solvente de interesse deste trabalho, é considerado um solvente pertencente a classe três conforme exposto na Tabela 1. Possui ponto de ebulição de 79 °C e pressão de vapor de 44,6 mmHg à 20 °C, propriedades químicas ideais de um solvente residual apto a ser determinado pela técnica de cromatografia em fase gasosa.^[4]

Portanto, é de suma importância que haja o constante controle de qualidade dos produtos terminados, avaliando a presença e quantificando esses solventes residuais, pois ao ingerir mesmos, os usuários se encontram sujeitos e expostos à toxicidade e efeitos adversos que essas substâncias podem ocasionar.^[4,5]

3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA

Na técnica de cromatografia em fase gasosa (CG), componentes presentes em uma mistura submetida a altas temperaturas tendem a volatilizar, desse modo, parte desta amostra gasosa

é carregada com o auxílio de um gás de arraste para uma coluna capilar, onde ocorre a separação por meio da variação de temperaturas, interação e eluição dos componentes, e que por fim, as respostas analíticas geradas são detectadas e adquiridas por intermédio de um software para análise.^[16,17]

O conceito básico instrumental de um cromatógrafo gasoso e seu funcionamento, podem ser observados na Figura 2.

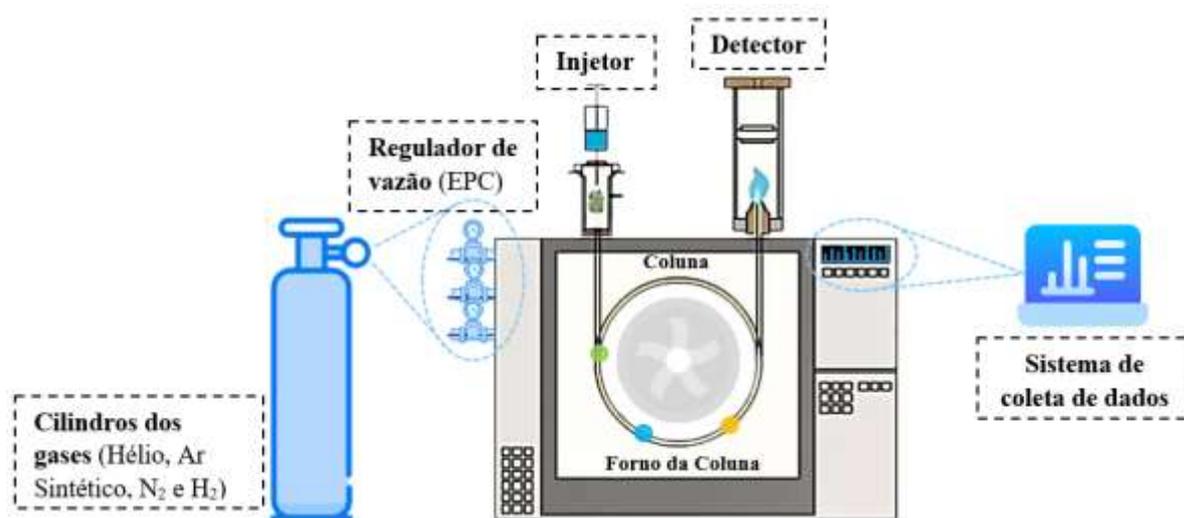


Figura 2.4: Representação esquemática do funcionamento de um cromatógrafo gasoso. Fonte: Adaptado de Chromacademy, 2023. Disponível em: <https://www.chromacademy.com/channels/gc-training-courses/instrumentation/preventative-gc-maintenance/>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2023, às 16:41

Para que esta técnica se torne aplicável, é necessário que substância a ser submetida possua propriedades químicas específicas como, ser volátil (elevada pressão de vapor), possuir ponto de ebulição baixo e possuir estabilidade térmica quando suscetíveis à altas temperaturas.^[16,17]

Esta técnica é uma opção viável nas mais diversas áreas de aplicação, assim como para indústrias químicas e farmacêuticas na identificação e quantificação de impurezas presentes em matérias-primas e em produtos terminados. Possui vantagens por possuir um alto poder de separação de misturas complexas, alta sensibilidade, necessitar pequenas quantidades de amostras e ser considerada uma técnica limpa.^[16]

3.3.1 Cromatografia em fase gasosa com amostragem por *headspace*

A amostragem *headspace* na cromatografia em fase gasosa, é uma técnica de extração gasosa, que consiste na extração da parte gasosa que se encontra em equilíbrio com uma amostra na fase líquida ou sólida acondicionadas em um recipiente de vedado (*vial*).^[18]

Este recipiente contendo a amostra inicial, é colocado sob condições controladas de tempo, temperatura e agitação em um forno rotativo integrado ao cromatógrafo gasoso. Os componentes voláteis na amostra presentes tendem a vaporizar e entrar no estado gasoso, de forma que em algum momento haja o equilíbrio entre as fases e a concentração deste composto de interesse

na fase gasosa seja constante. Esta parte que se vaporiza da amostra e tende a ficar na parte superior do *vial* é chamada de *headspace*, a qual é extraída e introduzida ao cromatógrafo para análise.^[18]

Este tipo de análise em que a amostra é aquecida por um tempo até que o equilíbrio entre as fases seja alcançado e em seguida uma alíquota é removida e analisada, é chamada de *headspace* estático. Entretanto, nem sempre é possível alcançar o equilíbrio entre as partes, líquido-sólido e gás, sendo dificultada uma única extração. Para estes casos é utilizada a técnica de *headspace* dinâmica como alternativa, na qual se tem a aplicação de um fluxo de gás inerte contínuo pela amostra facilitando a remoção dos compostos voláteis. Neste trabalho o modo de amostragem utilizado será o de *headspace* estático.^[18]

3.3.2 Coluna, separação e retenção na cromatografia em fase gasosa

A coluna é uma das partes mais importantes na cromatografia, uma vez que é nela que ocorrem a interação e separação dos componentes de uma amostra. As colunas capilares são uma das opções mais comuns e de maior utilização. Compostas por um tubo fino de sílica fundida e de grandes comprimentos, diâmetros internos de alguns milímetros e revestido por uma camada fina de filme quimicamente estável composta por diferentes fases estacionárias. As colunas capilares apresentam alta eficiência na separação e resolução de amostras complexas, além de exigirem pequenas quantidades de amostra, tornando-se assim ideais para análise de componentes voláteis ou semivoláteis.^[19]

Durante a separação, os compostos são transportados com o auxílio da fase móvel para dentro da coluna e, de acordo com o tamanho, polaridade e afinidade química, ficam retidos por mais ou menos tempo pela fase estacionária, seja por adsorção ou por partição. Essa diferença de tempo que um composto leva para passar pela coluna e ser detectado pelo detector é dada como retenção, parâmetro que permite a identificação e quantificação dos compostos. Portanto, a seleção adequada da coluna é fundamental para se obter uma separação precisa e confiável dos compostos de interesse.^[19]

3.3.3 Detectores empregados na cromatografia em fase gasosa

Os detectores são componentes essenciais em CG, responsáveis por transformar o sinal de saída da coluna em uma leitura quantitativa do composto em análise. Existem vários tipos de detectores disponíveis, com limitações e características diferentes para as mais diversas aplicações.^[19,20]

De acordo com Lanças (2017), os tipos mais comuns utilizados na cromatografia em fase gasosa são: o detector de ionização por chama, detector de espectrometria de massas, detector de captura de elétrons e o detector de condutividade térmica.

O detector de ionização por chama, chamado de detector *FID* (*Flame Ionization Detector*), é um dos mais utilizados em CG. Seu funcionamento consiste na combustão de compostos orgânicos em uma chama estequiométrica de ar-hidrogênio gerando íons que produzem um sinal de condutividade elétrica proporcional à quantidade do composto presente. Este detector é conhecido principalmente por ser universal e extremamente sensível.^[19]

O detector de espectrometria de massas é um tipo de detector universal, porém altamente seletivo e sensível, capaz de identificar os componentes de uma mistura complexa de maneira individual, fornecendo informações detalhadas sobre a estrutura química de cada composto e seus respectivos fragmentos. A espectrometria de massas consiste na ionização de um composto orgânico por uma fonte de íons, seguida pela separação dos íons e fragmentos pela relação massa/carga.^[19]

O detector de captura de elétrons é um detector seletivo para compostos orgânicos halogenados e alguns compostos inorgânicos com afinidade por elétrons. Quando o composto passa pelo detector, captura elétrons livres, produzindo um sinal elétrico no detector. Quanto mais halogênios tiver o composto, maior a capacidade de capturar elétrons e, conseqüentemente o sinal é maior no detector.^[19]

Com funcionalidade diferente, o detector de condutividade térmica é um detector universal, pouco seletivo, que detecta todos os componentes que passam pelo compartimento, independente da estrutura química. Neste sistema é medida de forma simultânea, em caminhos diferentes no compartimento interno do detector, a condutividade térmica do gás de arraste, estabelecida como referência, e a condutividade térmica do gás de arraste mais os componentes da amostra, sendo uma comparada à outra para geração do sinal.^[19]

A escolha do detector ideal depende do tipo da amostra a ser analisada, bem como os objetivos da análise. Dentre os fatores que determinam a escolha de um detector estão a avaliação da sensibilidade, a seletividade do detector, quais são as informações de interesse a serem obtidas e custo.^[19]

3.3.4 Redução no tempo de análise na cromatografia em gasosa rápida

Na cromatografia em fase gasosa alguns fatores são cruciais para se obter uma separação eficiente, sendo eles tempo de retenção, especificações da coluna, temperatura do forno da coluna, vazão do gás de arraste, técnicas de injeção, entre outros. No entanto, toda atenção deve ser dada a resolução de modo que o valor mínimo alcançado não comprometa a identificação dos componentes de interesse.^[20]

O uso de colunas de mesma fase, porém de comprimentos e diâmetros diferentes, nos permite transcrever métodos considerados convencionais para métodos de cromatografia em fase gasosa rápida. Essa é uma abordagem bastante utilizada para reduzir o tempo de corrida, pois ao se

modificar o comprimento de uma coluna de maior tamanho para uma de menor, tem-se um menor percurso a ser realizado pelo analito e conseqüentemente um menor tempo até a sua eluição. Outra alternativa relacionada a colunas, é a diminuição do diâmetro interno da coluna que causa o estreitamento dos picos aumentando a eficiência da separação.^[20,21]

Uma segunda estratégia é bastante utilizada como estreitamento dos picos, sendo o modo de injeção *split/splitless*, operado em modos *split*. Este modo permite altas taxas de separação da amostra, e como resultado a diminuição da área do analito, o afinamento do pico e uma melhor resolução entre os pares de interesse.^[21]

A determinação das temperaturas do forno da coluna também é relevante na qualidade da separação e velocidade de análise. Logo, a utilização das taxas de aquecimento de maneira precisa, como o tempo de resfriamento e estabilização da temperatura devem ser consideradas para a obtenção de uma melhor resolução.^[20]

Todos esses fatores trabalhados em conjunto favorecem a redução do tempo total de análise e promovem a redução de custos do processo analítico e um aumento no número de análises na rotina.^[20]

3.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

O artigo 253 da Resolução Diretiva Colegiada (RDC), n.º 658, dispõe que todo o método analítico desenvolvido deve ser submetido à etapa de validação seguindo a legislação vigente para ser considerado apto à aplicação em rotina laboratorial.^[7]

A validação analítica é a forma evidente, documentada e rastreável, por meio de experimentos, de se afirmar que um método está apto para a finalidade a qual ele foi intencionado. Segundo a Resolução Diretiva Colegiada (RDC), n.º 166, sobre a validação de métodos analíticos, em seu art. 2º, regula que as diretrizes de validação analítica estabelecidas são aplicáveis a qualquer tipo de insumo farmacêutico, inclusive os medicamentos.^[10,22,23]

É necessário que a abordagem e utilização dos parâmetros analíticos estejam atrelados ao tipo de teste aplicado, bem como a avaliação e aceitabilidade dos resultados e a técnica analítica utilizada, sejam definidas levando-se em consideração as propriedades e características da substância a ser controlada. No caso do controle de impurezas, para um método ser considerado quantitativo, os testes a serem aplicados são a exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), seletividade, limite de quantificação, linearidade e faixa de trabalho (faixa de trabalho).^[10]

3.4.1 Seletividade

A seletividade de um método é medida mediante sua capacidade em identificar de maneira inequívoca a substância de interesse, distinguindo a mesma dos demais componentes e impurezas presentes em uma mistura, provenientes de diluentes e componentes da matriz.^[6,24]

A separação cromatográfica está diretamente relacionada a resolução, e para que esse critério seja eficiente, é ideal que a diferença de eluição entre os picos do componente de interesse e o pico mais próximo, tanto visualmente, quanto analiticamente, possua um valor igual ou superior a 1,5. Desta maneira os picos submetidos a avaliação não estarão sobrepostos ou coeluídos entre si.^[25]

3.4.2 Linearidade e limite de quantificação

A linearidade do método é demonstrada quando as respostas analíticas apresentam variações diretamente proporcionais à variação da concentração do analito na amostra, em um intervalo estabelecido.^[10,24]

Para se obter um conjunto de dados representativos e passíveis de avaliação, o número de níveis deve ser no mínimo cinco, do limite inferior ao superior, bem como o número de curvas no mínimo três, de modo independente, para ser avaliada a relação linear do método.^[10,24]

A avaliação do parâmetro deve ser realizada com os dados de concentração e resposta analíticas reais e independentes. Como critérios de aceitação da linearidade são avaliados os seguintes pontos:

- Representação gráfica da resposta analítica em função da concentração;
- Representação gráfica dos resíduos;
- Avaliar visual e estatisticamente o gráfico da linearidade e dos resíduos.
- Coeficiente linear (intercepto com o eixo y);
- Significância do coeficiente angular (inclinação da reta);
- Coeficiente de correlação (R) e Coeficiente de Determinação (R²);
- Análise da homocedasticidade;
- Análise de variância (ANOVA);
- Análise de outliers dos resíduos padronizados;
- Análise estatística com o nível de significância de 5%.^[10,24,26]

O Limite de quantificação é expresso pela menor quantidade do analito presente na amostra a qual o método é capaz de quantificar com precisão e exatidão adequados. Esse limite é atingido quando o sinal detectado no menor nível de concentração é no mínimo dez vezes maior do que o sinal da linha de base, ou seja, a especificação para avaliação do sinal/ruído é de no mínimo 10.^[10,24]

3.4.3 Faixa de trabalho

A abrangência da faixa de trabalho do método analítico é determinada pelas concentrações dos níveis de limite inferior (limite de quantificação) ao nível superior, demonstrando que o método apresenta linearidade, precisão e exatidão adequados.^[10,24]

Para impurezas, a legislação rege que a faixa abranja do limite de quantificação até cento e vinte por cento da concentração de especificação.^[10,24]

3.4.4 Precisão

A precisão é estipulada pela concordância entre os resultados de ensaios com amostras preparadas de maneira independentes conforme método analítico. Essa concordância é avaliada e expressada pela repetibilidade e precisão intermediária.^[10,24]

A precisão dos resultados por repetibilidade é avaliada sob as mesmas condições operacionais, mesmo analista e em uma única sequência analítica, contemplando a avaliação de nove determinações que abrangem o intervalo linear do método analítico. A precisão intermediária é avaliada mediante a avaliação de uma mesma amostra, sob as mesmas condições de laboratório, entretanto em dias diferentes e realizadas por analistas diferentes.^[10,24]

Uma das maneiras de se estimar a precisão é através do desvio padrão relativo de uma série de medições.^[10,24]

3.4.5 Exatidão

É a avaliação do grau de concordância entre os resultados individuais em relação a um valor aceito como verdadeiro. Um dos modos de mensurar a exatidão é por meio da adição de amostra, no qual quantidades conhecidas do componente alvo são acrescidas à amostra, em determinados níveis que, posteriormente, são avaliados em cálculos de recuperação.^[10,23,24] É recomendável que o ensaio seja conduzido de forma independente, envolvendo três níveis de concentração realizados em triplicata cada um, no intervalo da curva analítica.^[10,23,24]

3.4.6 Robustez

A robustez do método analítico mede a qualidade do mesmo em resistir as pequenas e deliberadas variações que possam ocorrer durante a sua aplicação em rotina laboratorial.^[10,24]

Apesar de ser relatado como um parâmetro especificamente do desenvolvimento, o mesmo é enquadrado na validação para haver segurança e confiabilidade dos resultados frente aos problemas em ensaios interlaboratoriais.^[10]

Segundo o estabelecido na legislação, de acordo com cada técnica analítica, devem ser aplicadas variações pertinentes para comprovar a robustez do método. Para a cromatografia em fase

gasosa é necessário variar a temperatura na rampa inicial do forno, a vazão do gás de arraste e, o lote ou fabricante da coluna cromatográfica. Também é essencial serem avaliadas as condições do preparo de amostras e caso haja a ausência de algum dos itens estabelecidos deve-se justificar tecnicamente.^[10,24]

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS E REAGENTES

Foram utilizadas as Substâncias Químicas Caracterizadas (SQC) Etanol de pureza 99,79% e fabricante *Honeywell*, Metanol de pureza 99,89% e fabricante *Merck*, e 2-Propanol de pureza 99,98% e Tolueno de pureza 99,91% ambos do fabricante *Sigma-Aldrich*. Foram utilizadas como amostras o medicamento Succinato de Metoprolol, adquirida comercialmente na forma farmacêutica de comprimidos revestidos, na concentração de 100 mg de insumo ativo.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Baseado nos valores aceitáveis de dose máxima recomendada de 200 mg/dia de Succinato de Metoprolol 25/50/100 mg, massa média do comprimido de 380,20 mg e também no valor de exposição diária permitida para o solvente residual etanol de 50 mg/dia, foi possível estimar, conforme cálculo descrito no apêndice 1, utilizando-se a equação da opção 2 do guia *ICH Guideline Q3C (R8) on Impurities: Guideline for residual solvents*, a quantidade máxima de etanol que um indivíduo poderia ingerir com segurança. O resultado estipulado foi de aproximadamente 62000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de etanol por grama de amostra.

Como critério mais rigoroso de qualidade, foi limitada a exposição aos usuários do medicamento, adotando-se a especificação no valor de 15000 μg de etanol por grama de amostra. Com base na especificação estabelecida, foram determinadas as concentrações das soluções estoque teste Succinato de Metoprolol e solução padrão etanol.

Todas as soluções foram preparadas e diluídas em água ultra purificada, tipo 1, consoante aos resultados obtidos por meio do teste de solubilidade. No preparo da Solução Branco foram transferidos 4,0 mL de água purificada para *vial* de *headspace* de 20 mL e vedado o *vial* com *crimp* de alumínio e septo de silicone.

Para a adequabilidade do sistema, foram preparadas soluções *system suitability* transferindo 3,5 mL de água purificada e 0,5 mL da solução padrão etanol para o *vial* de *headspace* de 20 mL.

Para o preparo da Solução Estoque Teste Succinato de Metoprolol 100 mg Comprimido Revestido, foram pesados 4 comprimidos inteiros de Succinato de Metoprolol 100 mg, massa média de 380,20 mg, e em seguida transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Na sequência, foi adicionado aproximadamente 20 mL de água purificada e levado ao agitador vórtex por 5 minutos. Após, foi completado o volume do balão volumétrico com água purificada e homogeneizado por inversão resultando na concentração de 60,832 mg.mL⁻¹. Como última etapa, foi transferido todo o volume do balão volumétrico para tubo de centrífuga de 50 mL e levado a centrífuga a 3500 rpm por 5 minutos. Para os preparos realizados foi utilizado o sobrenadante após a etapa de centrifugação transferindo 1,0 mL para o *vial de headspace* de 20 mL.

A Solução Padrão Etanol foi preparada e diluída até alcançar a concentração final de 1821,01 µg.mL⁻¹. Para a contaminação do nível 100%, na especificação de 15000 µg.g⁻¹, utilizou-se o volume de 0,5 mL do padrão etanol e ajustou-se o volume do padrão conforme a concentração µg.g⁻¹ de cada nível. Os níveis preparados foram 30%, 80%, 120%, 160%, 200% e 240%, todos enriquecidos com 1,0 mL da Solução Estoque Teste Succinato de Metoprolol 100 mg Comprimido Revestido e completados para o volume final de 4,0 mL com água purificada em *vial de headspace* de 20 mL.

A partir das soluções estoques supracitados, prepararam-se os níveis e o número de replicatas segundo a necessidade de cada parâmetro da validação.

4.3 EQUIPAMENTOS

Para o preparo das soluções foram utilizados um sistema de purificação de água ultra pura de marca Milli-Q®, uma balança analítica de marca *Mettler Toledo*, modelo *XP205*, com incerteza de medição de ±0,01 mg, um agitador vórtex *IKA*®, modelo *VORTEX 3*, uma centrífuga de laboratório *Eppendorf*, modelo *5804* e um pipetador eletrônico de marca *Eppendorf*, modelo *Multipette*® *E3x*, com desvio de medição aleatório de ± 1,5, ± 2, ± 3,75 e ± 7,5 µL para as ponteiros *combitips* de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mL respectivamente.

As análises foram executadas em um cromatógrafo gasoso de marca *Agilent Technologies*, modelo *7890B* e amostrador *headspace transfer line* modelo *7697A*, com detecção por ionização de chama (*FID*).

4.4 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

As condições cromatográficas iniciais como fase estacionária, temperaturas de injetor e detector e temperaturas de incubação, foram determinadas com base em métodos referência previamente testados para solventes residuais semelhantes ao etanol (protocolos internos validados

para outros solventes), e posteriormente realizadas adaptações e otimizações segundo as características do solvente em questão para o atendimento dos critérios do método analítico.

Para o método convencional foi utilizada uma coluna convencional de 30 metros x 320 mm de diâmetro interno x 5,0 µm de filme de fase estacionária do tipo G2 (100% Dimethylpolysiloxane), modo de injeção split com razão de separação de 1:20. A temperatura do injetor foi de 180 °C, detector a 220 °C e o aquecedor auxiliar a 120 °C. O volume de injeção utilizado foi de 1000 µL e como gás de arraste foi empregado o hélio na vazão de 2,0 mL.min⁻¹.

A programação inicial de temperatura do forno da coluna foi de 30 °C, mantida por 9 minutos, seguida de taxa de aquecimento de 40 °C.min⁻¹ até 230 °C, com permanência de 2 minutos.

Além das condições supracitadas, na Tabela 2 estão dispostas as condições para o amostrador *headspace transfer line*, modelo 7697A.

Tabela 2.5: Condições do módulo *headspace transfer line* 7697A

Parâmetros	
Forno <i>Headspace</i> , °C	80
Loop de amostragem, °C	100
Linha de transferência, °C	120
Tempo de Equilíbrio do <i>vial</i> , min	10
Duração da injeção, min	0,5
Ciclo do CG, min	28
Volume do <i>vial</i> , mL	20
Agitação do <i>vial</i>	6
Modo de preenchimento	Personalizado
Modo de preenchimento do <i>vial</i>	Pressão
Pressão de enchimento, psi	20
Modo do enchimento do <i>Loop</i>	0,1
Modo de extração	Padrão
Ventilação e Purga	Habilitado – Pressão de ventilação do <i>vial</i> após extração
Purga pós injeção	Personalizado

4.5 AVALIAÇÃO DO SISTEMA

A verificação *system suitability* é utilizada para avaliar o desempenho do sistema de análise e garantir a obtenção de resultados precisos, confiáveis e repetíveis para uma determinada aplicação analítica. A técnica auxilia a identificar e corrigir possíveis problemas no sistema antes da análise principal, evitando assim a produção de resultados imprecisos ou errados.^[23]

A adequabilidade do sistema foi verificada mediante a injeção de seis réplicas da solução *System Suitability* antes de cada parâmetro analisado. Os resultados foram mensurados por meio do

cálculo do desvio padrão relativo entre as seis injeções, obtendo-se o resultado pela divisão dos desvios padrão pela média das áreas, multiplicado por 100. Como critério de aceitabilidade, foi adotada a partir das diretrizes de desempenho de método, levando-se em consideração o desvio padrão do equipamento utilizado, os fatores intrínsecos a análise e a especificação estipulada, o valor inferior ou igual a 3,7% para desvio padrão relativo.^[27]

4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO

No desenvolvimento do método analítico, além das condições cromatográficas pré-estabelecidas, compararam-se diferentes tempos de incubação, 10, 15 e 20 minutos, o que contribuiu para a redução no tempo de análise.

Os critérios críticos avaliados foram a seletividade e a resolução, garantindo assim que o método consegue identificar e quantificar o solvente residual etanol na presença de impurezas que passam ser provindas do diluente ou da matriz. Além dos parâmetros já citados, foram avaliados linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez seguindo as diretrizes estipuladas no guia de validação analítica Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 166.

4.7 ENSAIOS PARA REDUÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE

Para a otimização do método analítico foram sugeridas reduções nas dimensões da coluna utilizada. Utilizou-se uma coluna 15 metros x 0,32 mm de diâmetro interno x 3,0 µm de filme de revestimento, do tipo G2 (100% *Dimethylpolysiloxane*), e avaliou-se os ganhos alcançados para o tempo de retenção do analito.

Além da alteração da coluna cromatográfica, para a redução do tempo de análise, analisaram-se mudanças nas configurações da taxa de aquecimento do forno, vazão do gás de arraste e taxas de divisão de amostra (*split*). Por fim, determinaram-se as condições ótimas para aplicação do método rápido de cromatografia em fase gasosa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 VALIDAÇÃO MÉTODO CONVENCIONAL

O método convencional para determinação de etanol residual em Succinato de Metoprolol 100 mg foi validado mediante a avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, faixa de trabalho e robustez.^[10,26]

A importância da avaliação do sistema foi ressaltada por Ribani et al. (2004) em seus estudos sobre a validação de método cromatográficos, para os resultados obtidos serem considerados de qualidade aceitável, desde a etapa de desenvolvimento até a etapa de validação. Os autores abordam o uso de critérios analíticos para avaliação da conformidade do sistema como, por exemplo, a resolução, fator de cauda, fator de retenção e número de pratos teóricos.^[23]

5.1.1 Seletividade

No teste de seletividade, além do solvente residual de interesse, foram avaliados os solventes, metanol, 2-propanol e tolueno, que podem estar presentes como resíduos provindos de etapas iniciais, intermediárias e finais do processo de obtenção do medicamento.

Primeiramente, foi avaliado o perfil do diluente, através da Solução Branco (Figura 3) que contém somente água purificada. Em seguida, foram analisados individualmente os solventes residuais para identificação inequívoca dos tempos de retenção, na concentração de 100% da especificação. O metanol foi analisado na concentração de 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, o 2-propanol 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, o tolueno 890 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e o etanol 15000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Por fim foi avaliada a solução seletividade teste, contendo a mistura de todos os solventes na concentração de 100% e a solução estoque de Succinato de Metoprolol (Figura 4). O critério de resolução entre o analito de interesse e seus adjacentes, foi o ponto crítico analisado para considerar a obtenção de uma separação cromatográfica eficiente e seletiva. Valores maiores ou iguais a 1,5 foram considerados satisfatórios para resolução.

A resolução cromatográfica mede o grau de separação entre dois picos adjacentes, que envolve os tempos de retenção (t_1 e t_2) e as larguras dos picos (w_1 e w_2). O valor determinado de 1,5 deve-se ao fato de que, quando se obtém resolução igual ou superior a esse valor, o erro mínimo e erro máximo em porcentagem relacionado a sobreposição de picos são próximos a zero e tem-se uma recuperação do analito igual ou maior a 97,8%.^[25]

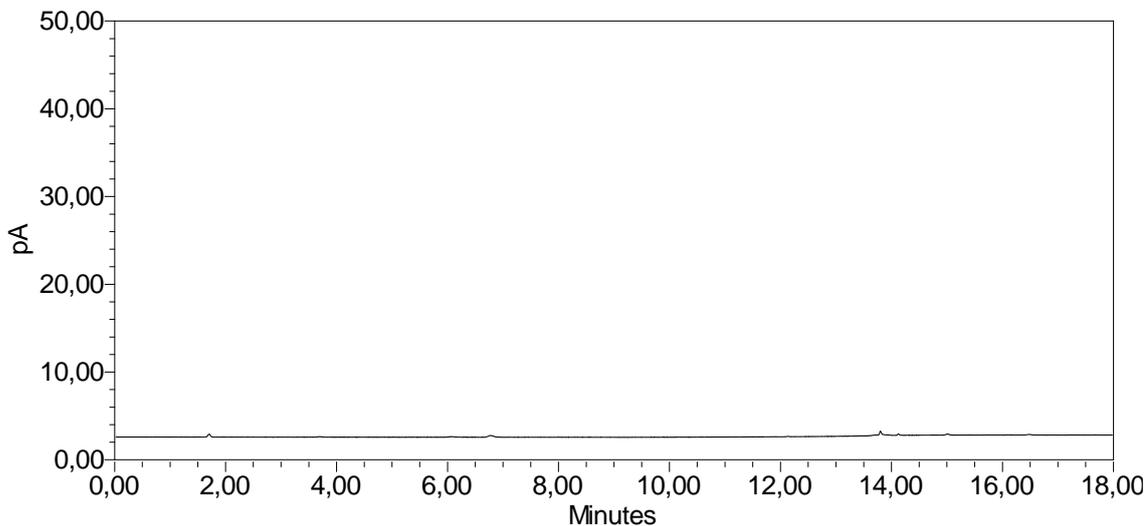


Figura 3.6: Cromatograma do diluente água ultra purificada na Solução Branco

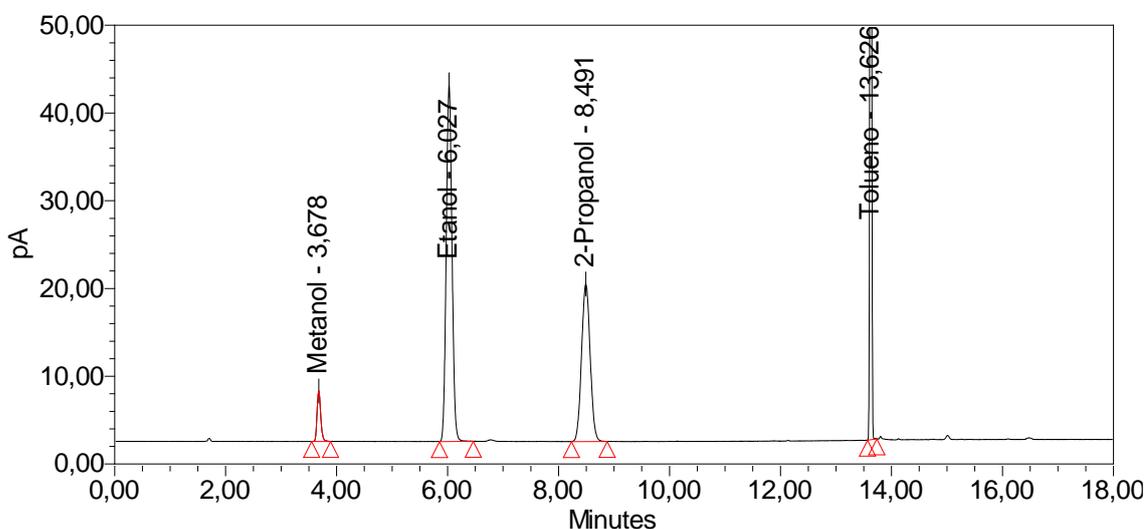


Figura 4.6: Cromatograma da mistura dos solventes residuais Metanol, Etanol, 2-Propanol e Tolueno contendo 1,0 mL da amostra de Succinato de Metoprolol avaliados na Solução Seletividade Teste.

Dado o cromatograma disposto da Figura 3, verificou-se que o diluente não apresenta sinal no detector empregado. O detector do tipo *FID* (ionização por chama) tem como princípio de funcionamento uma reação de combustão para ionizar os compostos gasosos que saem da coluna, seguido pela medida da condutividade elétrica produzida pelos íons resultantes. Conforme esperado, a água ultra purificada não é suscetível à combustão e, desta forma não há sinal para ser medido.^[18]

No cromatograma apresentado na Figura 4, foi possível verificar que o pico do Etanol foi identificado em 6 minutos de corrida analítica, e não há interferentes que prejudiquem a sua identificação na presença do diluente e da solução estoque teste Succinato de Metoprolol. Para todos os componentes presentes na Solução Seletividade Teste, os tempos de retenção e resolução estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3.6: Identificação, tempo de retenção e resolução para os solventes residuais testados como potenciais interferentes ao analito Etanol

Solvente Residual	Tempo de Retenção (min)	Resolução ($\geq 1,5$)
Metanol	3,68	-
Etanol	6,03	14,9
2-Propanol	8,49	10,2
Tolueno	13,63	30,1

Pode-se confirmar que o método é seletivo para o solvente residual etanol, uma vez que, perante às substâncias analisadas, não houve interferências na sua identificação, não houve coeluições com possíveis impurezas e a resolução em relação ao metanol, pico mais próximo, foi maior do que 1,5.

5.1.2 Linearidade, faixa de trabalho e limite de quantificação (LQ)

Baseado em testes executados na fase de desenvolvimento, o valor mínimo quantificável com resultados de precisão e recuperação satisfatórios, foi definido em $4500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, o que corresponde ao nível 30% de avaliação.

A linearidade avalia a resposta analítica obtida de acordo com a variação da concentração estipulada para o método. As diretrizes estabelecidas pelo guia de validação dispõem que, para avaliação do parâmetro deve-se conter no mínimo 3 curvas com no mínimo 5 níveis cada.

A Linearidade da validação foi expressa por 4 curvas e 7 níveis cada (30, 80, 100, 120, 160, 200 e 240%), sendo o nível 100% proporcional à concentração alvo limite de analito por grama de amostra, ou seja, $15000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Deste modo, com base na especificação determinada mediante os cálculos de exposição diária permitida, conforme guia de solventes residuais *ICH Guideline Q3C (R8)*, a faixa de trabalho em concentração adotada foi de $4500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (limite de quantificação) a $36000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A partir dos resultados obtidos, foi possível traçar uma curva analítica e obter o valor do coeficiente de correlação para o solvente residual etanol. A Figura 5 mostra a curva analítica obtida.

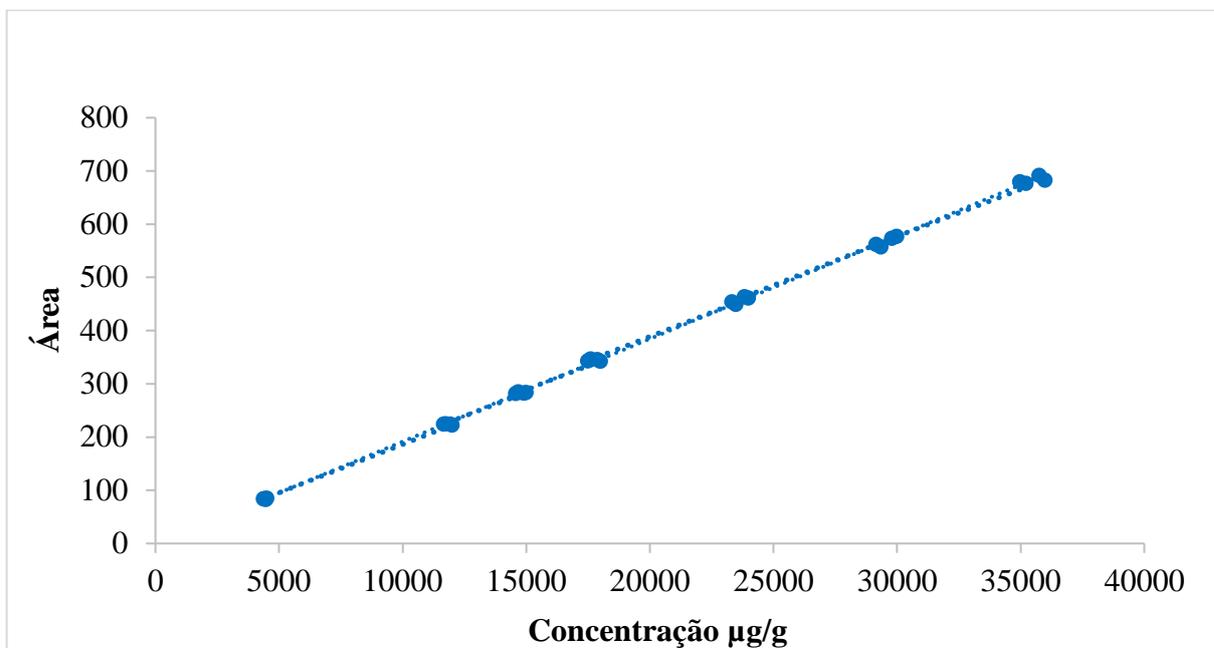


Figura 5.6: Curva analítica para determinação do solvente residual etanol em comprimidos de succinato de metoprolol 100 mg – método convencional. Equação da reta $y = 0,0193x - 1,4017$.

A partir da curva analítica retratada na Figura 5, observa-se a existência da correlação linear, indicando que, à medida que a concentração (eixo x) aumenta, a resposta em área do solvente residual etanol (eixo y) também aumenta. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,9997, confirmando uma correlação positiva entre as duas variáveis. Este valor foi satisfatório uma vez que atingiu o requisito de $> 0,99$ preconizado no guia de validação analítica vigente, RDC n.º 166.^[10]

Sattineni et al. (2021) desenvolveram e validaram um método para a determinação dos solventes residuais n-hexano, 2-propanol, tolueno e dimetilformamida no fármaco Racecadotril. Em seu método, avaliaram a linearidade por intermédio de três curvas e cinco níveis, do limite de quantificação até o 200%. Os valores dos coeficientes de correlação obtidos para os solventes n-hexano, 2-propanol, tolueno e dimetilformamida foram de 0,997, 0,999, 0,999 e 0,999 respectivamente, resultados considerados satisfatórios pelos autores, uma vez que considerados valores acima de 0,99.^[28]

Igualmente, em seu trabalho Sojitra et al. (2019) demonstraram a linearidade de seu método analítico para determinação dos solventes residuais metanol, acetona, diclorometano, n-hexano, acetato de etila e piridina em Imatinibe, abrangendo sete níveis, no intervalo de 20 – 150%. Segundo os autores, os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram superiores à 0,999, demonstrando a correlação positiva entre a concentração do solvente residual e a área obtida.^[29]

Com o auxílio da ferramenta de avaliação *Action Stat*[®], aplicou-se testes estatísticos como parte da avaliação dos resultados obtidos. O resumo das análises pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4.6: Resumo da conclusão do estudo estatístico de linearidade do solvente residual etanol por meio do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários – método convencional

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não foi rejeitada a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0,9997 foi maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não foi rejeitada a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não foi rejeitada a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não foi detectado pontos extremos
Teste de independência das observações	Não foi detectado dependência das observações

Através dos testes estatísticos, foi verificado que ao nível de confiança de 95% não foi rejeitada a hipótese da significância do modelo linear.^[26]

Por intermédio da avaliação do teste ANOVA, o intercepto apresentou p-valor (0,4698) sendo maior que 0,05, portanto não foi rejeitada a hipótese de que o intercepto foi igual a zero e não houve o deslocamento da curva ao nível de significância de 5%.^[26]

O modelo também foi submetido ao teste de Breusch-Pagan, no qual as variações dos erros apresentaram-se constantes e aleatórias, portanto, obteve-se uma distribuição homocedástica, conforme pode ser observado na Figura 6.

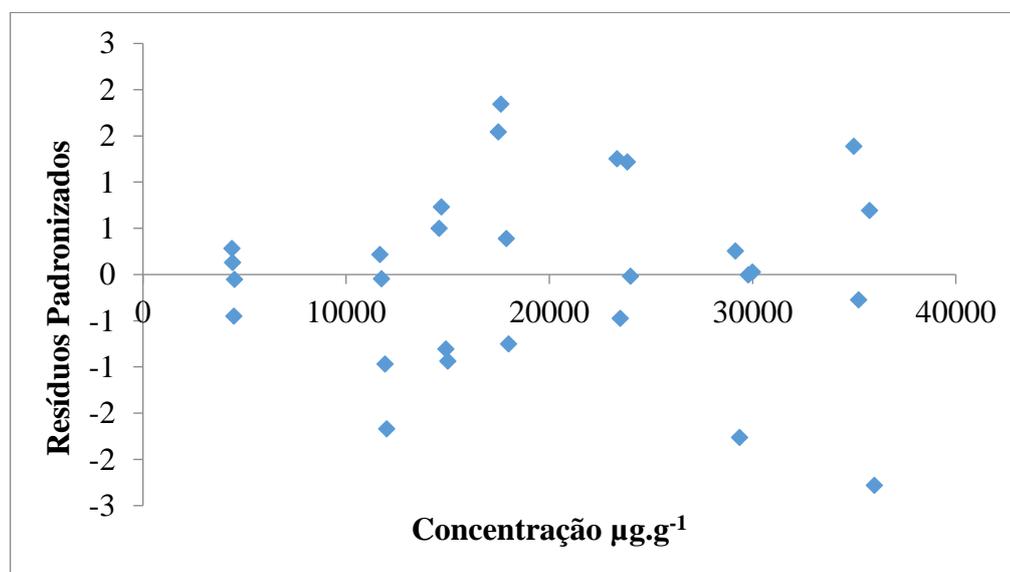


Figura 6.6: A distribuição e valores dos resíduos padronizados para o solvente residual etanol utilizado na construção da curva analítica – método convencional

A avaliação dos resíduos mostrou que a variância dos erros se apresentou constante, ou seja, não foi detectado valores extremos entre as respostas ou tendências a desvios. Para os valores dos resíduos provenientes da análise de variância (ANOVA), é desejável que sejam menores que três vezes o valor do erro padrão (intervalo de confiança de $\pm 3\sigma$, critério estipulado pelo programa). O erro padrão obtido foi de 4,55, que multiplicado por três chegou-se ao valor de 13,65. O maior valor de resíduo padronizado em módulo foi de $2,4\sigma$, deste modo, não foram detectados valores extremos

nas respostas.^[26] Ao avaliar a disposição do gráfico, os resíduos se distribuíram aleatoriamente, isto é, sem indicar um padrão na distribuição, mostrando assim que a variância foi constante e que não foi rejeitada a hipótese da normalidade dos resíduos.

Outro teste aplicado foi o de dependência das observações, através do teste de Durbin-Watson. Espera-se que os dados obtidos temporalmente não apresentem autocorrelação (dependência), ou seja, as observações sejam independentes entre si. Para o solvente residual etanol o teste apresentou p-valor de 0,6871, valor este maior que 0,05 e, portanto, não foi rejeitada a hipótese de que ao nível de significância de 5%, haja independência das observações.^[26]

Após a avaliação estatística dos resultados, concluiu-se que o método foi considerado linear para a análise do solvente residual etanol, pois atendeu a todos os critérios de avaliação preconizados na legislação.

5.1.3 Precisão

Para o ensaio de repetibilidade foram avaliados os níveis 30 (baixo), 120 (médio) e 240% (alto), em triplicata, correspondentes às concentrações de 4500, 18000 e 36000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. A precisão em um mesmo dia foi realizada sob as mesmas condições instrumentais, por um único analista. Em um segundo dia foi avaliada novamente, por analista diferente e os resultados de precisão de ambos os dias foram submetidos a uma comparação, em termos de precisão intermediária, avaliou-se a concordâncias entre os resultados obtidos entre as precisões do 1º e 2º dia. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5.6: Resultados das precisões 1º dia, 2º dia e precisão intermediária para o solvente residual etanol – método convencional

Nível (%)	Nível de recuperação ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Precisão 1º dia		Precisão 2º dia		Precisão Intermediária
		Quantidade recuperada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DPR ($\leq 3,7\%$) ^[27]	Quantidade recuperada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR ($\leq 3,7\%$) ^[27]	DPR ($\leq 6\%$) ^[27]
30	4500	4500	2,0	4548	1,7	2
		4367		4399		
		4331		4477		
120	18000	18095	1,0	17779	1,9	1
		18208		18004		
		17845		18454		
240	36000	36080	2,4	35911	0,2	1
		36468		35868		
		34851		35799		

Como critério de avaliação dos resultados de precisão expressados na Tabela 5, utilizou-se como referência o guia sobre as diretrizes e requisitos de desempenho de método padrão, apêndice

F (AOAC - *Official Methods of Analysis, Appendix F*), que estabelece os valores considerados conformes de acordo com a concentração em $\mu\text{g.g}^{-1}$ do analito avaliado. Além das diretrizes abordadas pelo guia, foi considerado o valor de desvio padrão relativo de 3,0% adotado pelo fabricante do cromatógrafo gasoso utilizado. Portanto, foram considerados aceitáveis os valores de desvio padrão relativo inferiores ou igual a 3,7% para repetibilidade e inferiores ou iguais a 6% para precisão intermediária.^[27,30]

A partir das diretivas adotadas, o método analítico foi considerado preciso para a faixa linear estudada, visto que, os resultados de desvio padrão relativo em todos os níveis da precisão 1º e 2º dia se mostraram inferiores a 3,7%. Similarmente, a precisão intermediária dos resultados mostrou-se na faixa especificada de 6%, com os valores de 2, 1 e 1%, para os níveis baixo, médio e alto respectivamente.

Noorbasha e Shaik (2021) adotaram uma forma alternativa para avaliação da precisão de seu método analítico. Para determinação de solventes residuais em Paclitaxel, os autores realizaram a preparação de seis soluções padrões, de maneira independente, obtendo valores de desvio padrão relativo para as precisões repetibilidade e intermediária, na concentração de 100%, inferiores a 5% para todos os solventes. A partir dos resultados alcançados, concluíram que o método analítico desenvolvido foi preciso.^[31]

5.1.4 Exatidão

Para o parâmetro de exatidão, foram calculadas as recuperações nos níveis 30 (baixo), 120 (médio) e 240% (alto), utilizando-se a concentração teórica calculada dividida pela concentração experimental, multiplicada por 100. A Tabela 6 exibe os resultados de recuperação obtidos.

Tabela 6.6: Resultados do ensaio de adição e recuperação para o solvente residual etanol – método convencional

Nível (%)	Nível de recuperação ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Quantidade adicionada ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Recuperação ^[27] (95–105%)
30%	4500	4498	4500	100,05
		4468	4367	97,74
		4402	4331	98,38
120%	18000	17992	18095	100,57
		17873	18208	101,87
		17609	17845	101,34
240%	36000	35983	36080	100,27
		35747	36468	102,02
		35218	34851	98,96

Assim como adotado na precisão, para exatidão, utilizou-se como referência a faixa estipulada pelo guia sobre diretrizes e requisitos de desempenho de método padrão baseada na concentração de etanol analisada.^[27]

Dentre os resultados obtidos, considerou-se o método exato, visto que, as recuperações se mostraram na faixa de 95–105% recomendada pelas diretrizes de desempenho de métodos analíticos do guia *AOAC*. Os valores obtidos para cada nível analisado estiveram no limite de 97,74% e 102,02%, entre recuperação mínima e máxima respectivamente.^[27]

Semelhantemente, Noorbasha e Shaik (2021) calcularam as recuperações dos analitos adicionados nos níveis de limite de quantificação, 50, 100 e 150%. Os resultados obtidos variaram de 90,06% a 105, 25% para todos os solventes contemplados no método desenvolvido. Segundo os autores, o método foi considerado exato, pois as recuperações obtidas atenderam o critério de aceitação de 80–120% em concordância com o *ICH – International Council for Harmonisation*.^[31,32]

Sob o mesmo racional de avaliação, os autores Pandey et al. (2011) obtiveram recuperações nos limites de 80–120% para os níveis de 50, 100 e 150%, analisados em triplicata, com resultados entre 94,20% a 111,12% para determinação dos solventes residuais metanol, acetona, diclorometano, ciclohexano e tolueno.^[33]

5.1.5 Robustez

No parâmetro de robustez avaliou-se a segurança do método em resistir às mínimas variações que podem ocorrer durante as análises. Conforme a legislação vigente, para a técnica de cromatografia em fase gasosa, avaliaram-se as condições: variação do lote e/ou fabricante de coluna, oscilações de temperatura e vazão do gás de arraste.^[10] Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7.6: Resultados do estudo de robustez para determinação do solvente residual etanol mediante as variações propostas de lote da coluna, temperatura inicial de forno da coluna, vazão do gás de arraste e estabilidade das amostras – método convencional

Alteração	Nível de recuperação ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Recuperação
Sem alteração	12000	12004	-
Lote de coluna	12000	11974	99,75
Temperatura de 28 °C	12000	11971	99,73
Temperatura de 32 °C	12000	11386	94,85
Vazão 1,8 mL.min⁻¹	12000	12060	100,47
Vazão 2,2 mL.min⁻¹	12000	11500	95,81
Estabilidade das amostras	12000	11242	93,66
Especificação 95–105%^[27]			95-105

A partir dos resultados dispostos na Tabela 7, foram calculadas as recuperações de cada modificação realizada, dividindo a quantidade recuperada de cada alteração sugerida, pela quantidade recuperada nas condições originais do método analítico, e multiplicado por cem para se obter o valor em porcentagem. Deste modo, conclui-se que o método analítico se apresentou robusto quando analisado em lotes diferentes de mesma fase estacionária, de mesmas dimensões de comprimento, diâmetro e filme de revestimento. Igualmente, o método mostrou-se capaz de resistir a variações de $-0,2$ °C na temperatura inicial do forno da coluna e $\pm 0,2$ mL.min⁻¹ na vazão do gás de arraste, ao apresentarem recuperações na faixa de 95–105% especificada.

Para a variação de $+0,2$ °C, o método analítico foi considerado não robusto, por apresentar recuperação de 94,85%, valor abaixo do limite inferior da especificação adotada como referência.^[27] Todavia, não é esperada variação desta magnitude na temperatura do forno do equipamento, além disso, o valor obtido ficou próximo ao limite aceitável.

As amostras foram preparadas e acondicionadas no laboratório em temperatura ambiente, de 15 a 30 °C, e umidade relativa do ar inferior a 70%. Para análise da estabilidade das amostras, o tempo zero foi estabelecido como sendo o horário exato de término do preparo das soluções amostras, e o tempo final, como sendo o horário da última injeção da sequência de ensaios de robustez, totalizando o período de 77 horas.

Conforme os dados apresentados na Tabela 7, a quantidade recuperada para a estabilidade das amostras foi de 93,66%, valor abaixo da faixa de recuperação de 95–105%. Neste caso, salvo estudos complementares, a estabilidade após 77 horas, apresentou valor de recuperação inconsistente, podendo ser decorrente de possíveis desvios no momento de preparo e análise no equipamento ao longo da sequência analítica, que levaram a uma recuperação fora da faixa de referência adotada.

No entanto, para a alteração do lote da coluna, o intervalo de horas, do horário do término do preparo até a última injeção desta modificação, totalizou 64 horas, com recuperação do solvente etanol de 99,75%. Assim, concluiu-se que as amostras são estáveis no período de 64 horas, sendo um intervalo de tempo bastante adequado para a aplicação proposta, pois se recuperou o solvente etanol nas condições normais do método analítico.

5.2 REDUÇÃO DO TEMPO DE ANÁLISE

Após o estudo de validação do método convencional, foram propostas variações de alguns parâmetros com o intuito de reduzir o tempo total de análise e consequentemente otimizar as rotinas de análises de controle de qualidade de medicamentos.

5.2.1 Alteração do tempo de incubação.

O tempo de incubação foi um dos estágios da amostragem por *headspace* na qual as amostras ficaram sob agitação e aquecimento em um recipiente fechado a fim de estabelecer o equilíbrio entre suas duas fases, líquida e gasosa, de modo que uma quantidade real do solvente residual etanol presente na amostra fosse extraída para a fase de vapor e analisada.^[18]

Com a proposta de reduzir o tempo de análise das amostras, sugeriu-se a diminuição do tempo de incubação inicial de 20 minutos, para 15 e 10 minutos, e comparou-se a influência nos resultados de precisão e exatidão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8.6: Comparação do valores de desvio padrão relativo e recuperação para os tempos de incubação de 20, 15 e 10 minutos na determinação do solvente residual etanol

Tempo (minutos)	Nível de recuperação ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Nível (%)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DPR ($\leq 3,7\%$)^[27]	Recuperação (95–105%)^[27]
20	4500	30	4413	0,7	98,04
			4472		99,29
			4417		98,79
	18000	120	18019	1,2	100,09
			18343		101,82
			17941		100,33
	36000	240	36204	1,0	100,56
			36829		102,22
			36227		101,29
15	4500	30	4463	1,0	99,17
			4430		98,38
			4519		101,07
	18000	120	18152	0,7	100,83
			17908		99,41
			18022		100,78
	36000	240	36546	0,6	101,50
			36132		100,29
			36318		101,54
10	4500	30	4479	3,2	99,51
			4639		103,01
			4352		97,35
	18000	120	18017	2,7	100,08
			18757		104,12
			17830		99,70
	36000	240	35760	2,8	99,32
			37444		103,93
			35601		99,54

Conforme mostrado na Tabela 8, verificou-se que as variações dos tempos de incubação não resultaram em efeitos negativos sobre os teores de etanol. Os valores de desvio padrão relativo e de recuperação de cada nível analisado permaneceram no exigido pelas especificações de validação.

O tempo de incubação é um dos parâmetros que mais exerce influência no tempo total de análise em cromatografia gasosa com amostragem via *headspace*. Por conseguinte, determinou-se o tempo de incubação de 10 minutos para os métodos convencional e rápido, com o propósito de minimizar o tempo entre as injeções, e conseqüentemente, reduzir significativamente o tempo total de análise.

5.2.2 Alteração do comprimento da coluna cromatográfica.

Outra variável analisada foi a diminuição dos parâmetros da coluna cromatográfica. Deste modo, alterou-se a coluna do método convencional da marca *Phenomenex*, tipo G2, fase estacionária 100% *Dimethylpolysiloxane*, com medidas de 30 m x 0,32 mm de diâmetro x 5,0 µm de espessura do filme de revestimento, para uma segunda coluna da marca *Agilent*, mesmo tipo e fase estacionária, com medidas de 15 m x 0,32 mm x 3,0 µm de filme de revestimento. O perfil cromatográfico obtido com a coluna cromatográfica de dimensões reduzidas é mostrado na Figura 7.

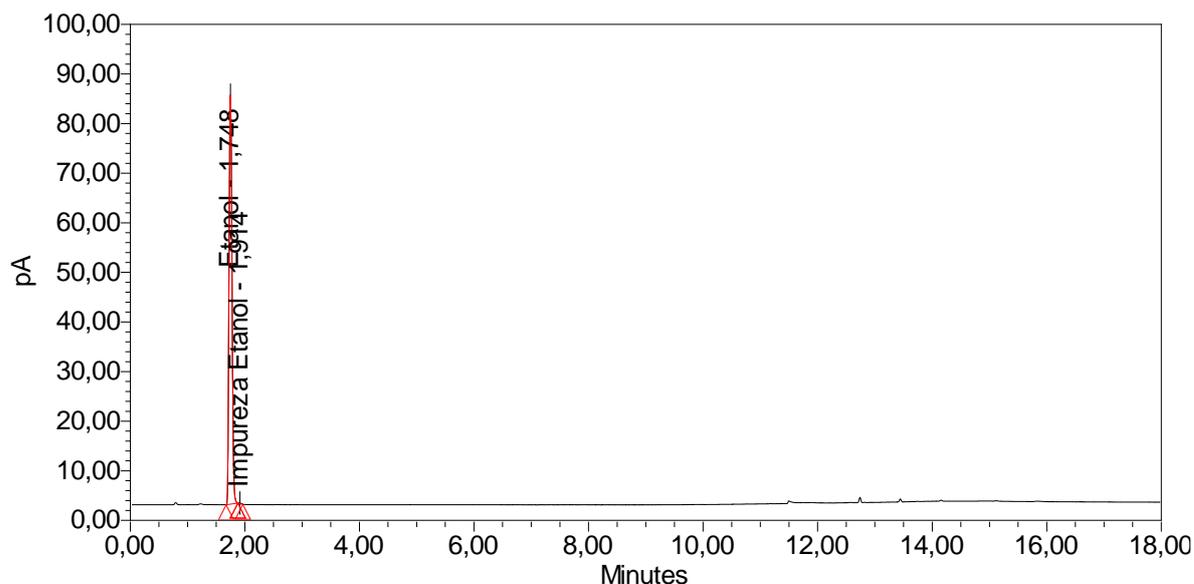


Figura 7.6: Perfil cromatográfico e tempo de retenção do solvente residual etanol na fase estacionária G2, da marca *Agilent*, dimensões de 15 m x 0,32 mm e 3,0 µm de filme de revestimento

Confrontou-se o perfil cromatográfico adquirido nas condições da Figura 7 com o obtido no ensaio de seletividade do método convencional (Figura 4), e ratificou-se uma redução de 71% no tempo de retenção do etanol que foi de 1,748 minutos nas condições da coluna de 15 m, enquanto no método convencional com a coluna de 30 m foi de 6,027 minutos. Com isso, possibilitou-se a otimização inicial do tempo de corrida de 18 para 9 minutos para os testes subsequentes.^[18]

Redução de mesma expressividade foi obtida por Paolini et al. (2022), que reduziram o comprimento e o diâmetro da coluna de seu método convencional CP-Wax 57 CB de 50 m x 0,32 mm x 0,2 µm para 25 m x 0,25 mm x 0,2 µm, resultando em um método rápido, o qual juntamente com otimizações adicionais nas taxas de aquecimento, vazão do gás de arraste, volume de injeção e razão de separação, acarretaram redução do tempo de análise de 40 para 7 minutos, efetivando um ganho aproximado de 80% no tempo total de análise.^[34]

Portanto, concluiu-se que a redução do comprimento da coluna apresentou resultados positivos na redução do tempo de análise. Entretanto, apesar da redução do comprimento da coluna ter apresentado impacto significativo, outros fatores foram trabalhados de modo a não comprometer a resolução mínima necessária.^[20]

5.2.3 Alteração da taxa de divisão da amostra (razão de separação, *split*)

A redução do comprimento da coluna implica na diminuição do número de pratos teóricos (N) e menor interação entre o analito e a fase estacionária, resultando na perda de eficiência da separação. Como consequência, visualmente os picos tendem a eluir mais próximos, podendo comprometer a resolução cromatográfica.^[18]

Dentre outros fatores, o ajuste da taxa de divisão da amostra surge como uma alternativa na tentativa de contrabalancear uma possível redução na capacidade de processamento da amostra em colunas de dimensões reduzidas, pois o aumento do *split* proporciona o estreitamento dos picos de interesse e consequentemente melhoras na resolução entre os mesmos.^[21] Para suprir a possível perda da resolução com a diminuição das dimensões da coluna cromatográfica, alterou-se o *split* de 1:20 do método convencional para 1:100 no intuito de afinar os picos do solvente residual etanol e impureza adjacente.

O aumento do *split* fez com que um menor volume de amostra fosse injetado na coluna, proporcionando um afinamento na largura dos picos e consequentemente na melhora da resolução, em contrapartida, houve perda de sinal analítico em área, todavia sem prejuízo para a quantificação. O perfil cromatográfico após a alteração do *split* é observado nas Figuras 8 e 9.

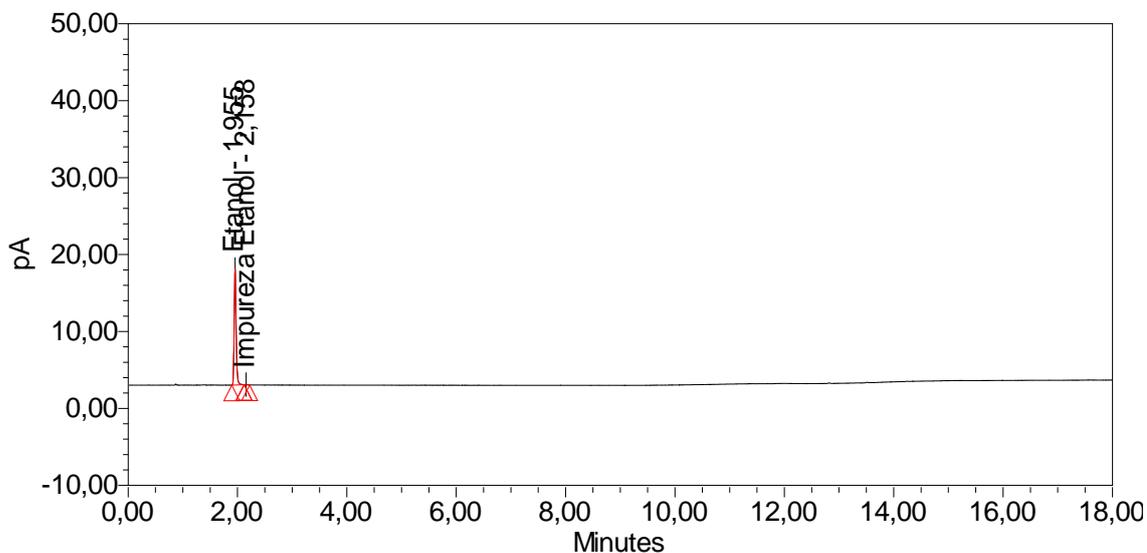


Figura 8.6: Cromatograma do solvente residual etanol com a razão de *split* de 1:100

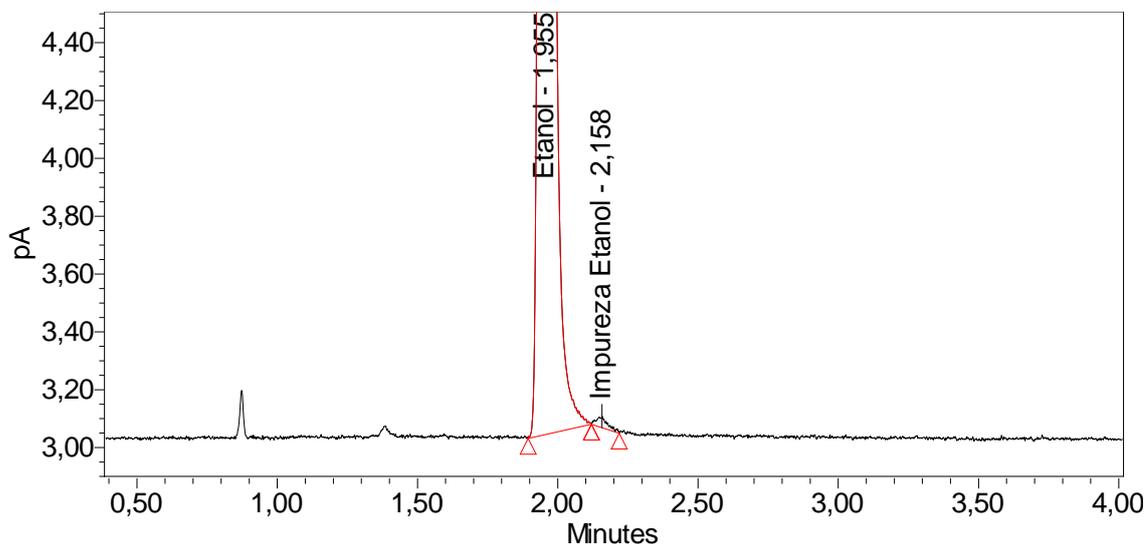


Figura 9.6: Aproximação do cromatograma do solvente residual etanol na condição de razão de separação da amostra de 1:100

Comparou-se as áreas do solvente residual etanol com as diferentes razões de separação da amostra. Para o valor de *split* de 20, a área do solvente etanol obtida foi aproximadamente 302 $\mu\text{V}\cdot\text{sec.}$, todavia com o ajuste do *split* para 100, a área passou a ser aproximadamente 38 $\mu\text{V}\cdot\text{sec.}$ O resultado alcançado é coincidente com as características de métodos rápidos por cromatografia em fase gasosa, que apresentam picos estreitos e resolvidos, como efeito, melhor desempenho analítico.^[34] Embora a resposta analítica tenha reduzido com a alteração da taxa de separação, o critério de sinal/ruído, diretamente ligado a essa modificação, apresentou-se dentro do exigido segundo as normativas da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 166.^[10] A resolução com a alteração da razão de separação para 100, passou de 2,0 para 2,4.

Modificação semelhante foi realizada por Paolini et al. (2022) na otimização de seu método analítico por cromatografia em fase gasosa, com detector de ionização de chama. Os autores testaram diferentes razões de *split*, 40, 70 e 100 para minimizar as larguras dos picos e melhorar a eficiência da separação, e como resultado concluíram que o valor de 70 de taxa de separação foi satisfatório, visto que o valor de 100 foi descartado devido à deficiência de sinal analítico nos níveis de limite de quantificação.^[34]

Portanto, conclui-se que a modificação do *split* foi suficiente para propiciar a redução da área do solvente residual etanol, sem comprometer a resolução entre os picos de etanol e impureza do etanol.

5.2.4 Alteração da temperatura inicial de forno da coluna

Para fins de comparação, foram realizados alguns ensaios aumentando a temperatura inicial do forno da coluna cromatográfica de 30 °C empregada no método convencional validado.

Foram variadas as temperaturas iniciais de isoterma de 40, 50, 60, 70, 80 e 100 °C, e os resultados estão compilados na Figura 10.

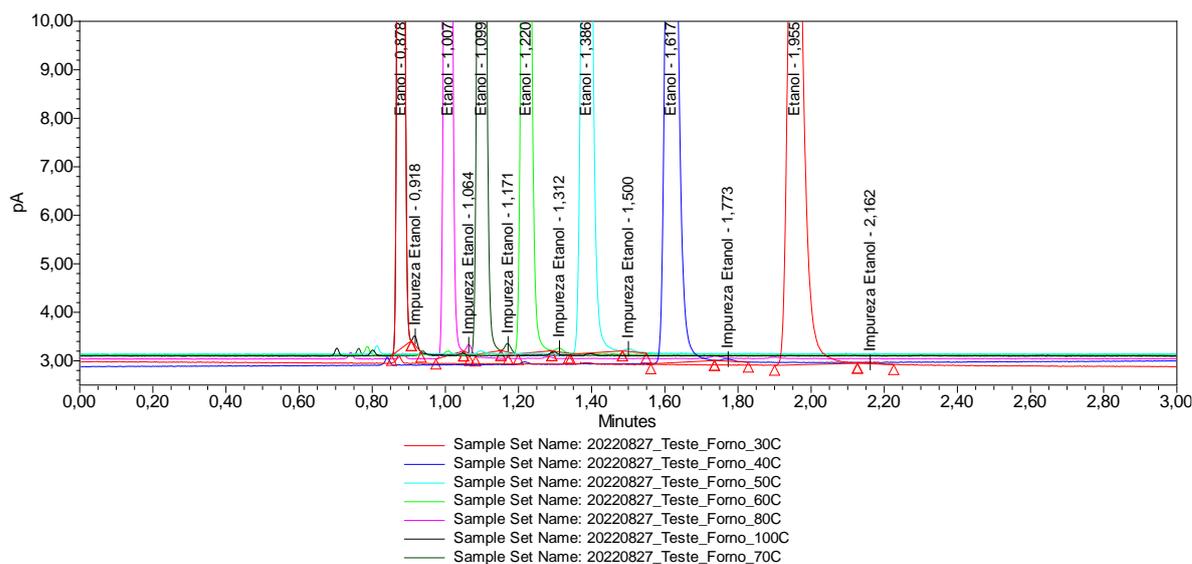


Figura 10.6: Cromatogramas obtidos em diferentes temperaturas iniciais de forno de coluna para comparação dos tempos de retenção do solvente residual etanol

Os resultados mostraram que o aumento das temperaturas contribuiu para a diminuição do tempo de retenção. Entretanto, apesar da redução do tempo de retenção do solvente etanol, observou-se que a resolução dos picos do solvente de interesse e a impureza adjacente diminuiu conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9.6: Valores de tempo de retenção e resolução do solvente residual etanol frente às modificações na temperatura do forno da coluna cromatográfica

Condição de forno da coluna testada	Tempo de retenção do solvente residual Etanol, minutos	Resolução entre os picos do Etanol e Impureza Etanol
30 °C	1,955	3,3
40 °C	1,617	2,9
50 °C	1,386	2,8
60 °C	1,220	2,5
70 °C	1,099	2,2
80 °C	1,007	2,1
100 °C	0,878	1,7

A melhor condição de separação obtida foi a temperatura inicial de forno da coluna de 70 °C, com tempo de retenção do etanol em 1,099 minutos e resolução 2,2. Mesmo em condições superiores de temperatura, a resolução se mostrou superior a 1,5, porém, foi escolhida a temperatura de 70 °C como condição suficiente a proporcionar integração e resolução satisfatórios com maior segurança.

5.2.5 Alteração da vazão do gás de arraste mL.min⁻¹ (velocidade linear)

Ainda para efeito de comparação, realizaram-se ensaios com diferentes vazões do gás de arraste para avaliar o ganho em tempo de retenção sem comprometer a resolução alcançada. Para atingir este propósito, variou-se a velocidade linear a valores inferiores e superiores à velocidade linear de 33,136 cm.s⁻¹, do método convencional, de modo a extrapolar o valor de velocidade de máxima eficiência de trabalho recomendada para o gás hélio, de 30 cm.s⁻¹[35]. Em seu trabalho, Shou e Qiu (2021), estipularam a vazão em 15 mL.min⁻¹ em seu desenvolvimento de método analítico para a determinação simultânea dos solventes residuais trietilamina, diisopropilamina e 1,1,3,3-tetrametilguanidina em ingredientes ativos farmacêuticos, atingindo uma velocidade linear bastante elevada. Com base nessa modificação, os autores alcançaram significativos ganhos no tempo de retenção para os analitos sem interferências na resolução e, portanto, o valor se mostrou adequado para a análise.^[36] É importante mencionar que para a determinação das vazões propostas, foi considerada as alterações nas dimensões da coluna, pois isso afeta os valores de velocidade linear do método. Portanto, ajustou-se a vazão do método rápido de modo a manter próxima à velocidade linear validada no método convencional, e os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

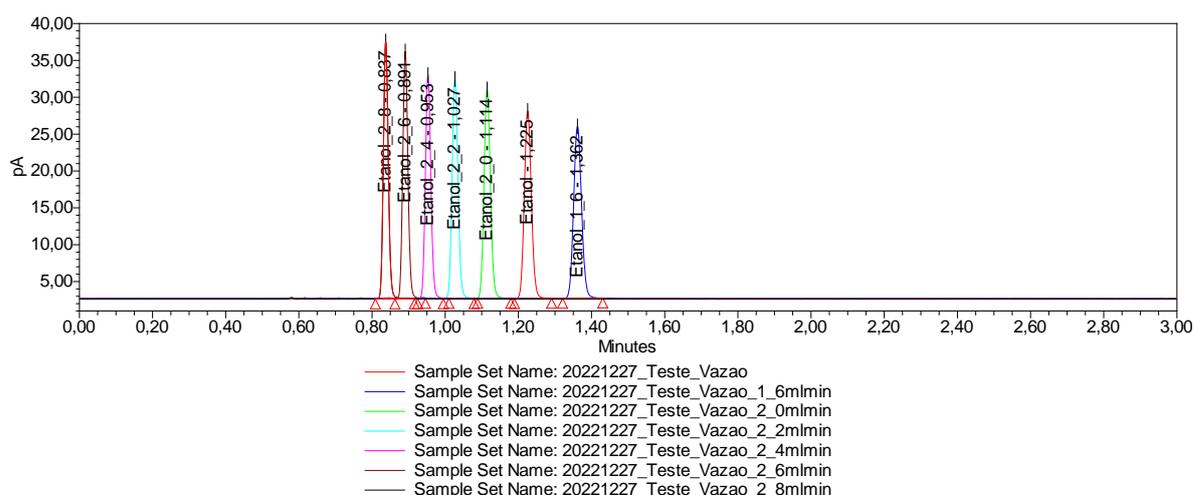


Figura 11.6: Cromatogramas obtidos em diferentes vazões do gás de arraste para comparação dos tempos de retenção do solvente residual etanol

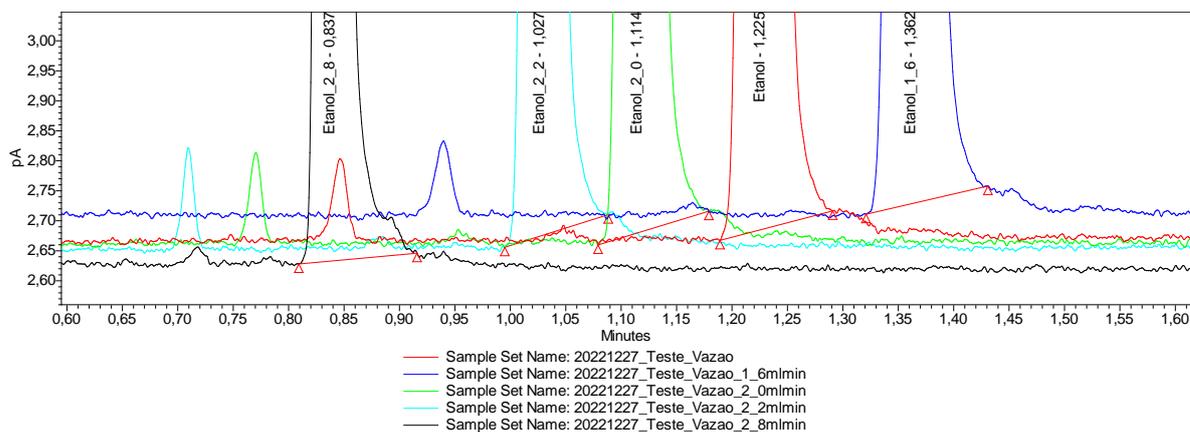


Figura 12.6: Aproximação dos cromatogramas obtidos nas vazões do gás de arraste de 1,6, 2,0, 2,2 e 2,8 mL.min⁻¹ para comparação dos tempos de retenção e perfis cromatográficos

Como pode ser observado na Figura 12, com a utilização de maiores vazões do gás de arraste os tempos de retenção foram menores, acompanhado de menores resoluções entre os picos do solvente residual etanol e impureza adjacente. Evidenciou-se também, que na vazão mínima de 1,6 mL.min⁻¹ os picos de interesse se mostraram visualmente separados. Já na vazão máxima testada de 2,8 mL.min⁻¹, observou-se uma sobreposição parcial dos picos.

Além das análises visuais do perfil cromatográfico, a resolução calculada para as vazões de 1,6, 1,8, 2,0, e 2,2 mL.min⁻¹ foram maiores do que 1,5, conforme o desejado. A única exceção foi a vazão de 2,8 mL.min⁻¹ que não atendeu a esse critério.^[25]

Portanto, com base nas avaliações visuais e resoluções obtidas, definiu-se o valor de vazão do gás de arraste para o método rápido em 2,0 mL.min⁻¹, equivalente à velocidade linear de 40,516 cm.s⁻¹, valor este que promoveu uma melhor concordância entre os fatores resolução e perfil cromatográfico.

5.3 VALIDAÇÃO MÉTODO RÁPIDO

Após a realização dos testes de otimização, determinaram-se as configurações finais para o método rápido e ajustou-se o sistema cromatográfico para a análise dos parâmetros. Na tabela a seguir é apresentado o resumo das modificações realizadas.

O método rápido foi submetido a avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, uma vez que houve mudanças significativas no tempo de retenção e sinal analítico do etanol.

Tabela 10.6: Resumo das modificações realizadas a partir dos testes de otimização para determinação do solvente residual etanol

Condição	Método Convencional	Método Rápido
Fase estacionária / Coluna	Tipo G2 (100% <i>Dimethylpolisiloxane</i>); dimensões de 30 metros x 320 mm de diâmetro x 5,0 µm de filme de revestimento	Tipo G2 (100% <i>Dimethylpolisiloxane</i>); dimensões de 15 metros x 320 mm de diâmetro x 3,0 µm de filme de revestimento
Vazão do gás de arraste/ velocidade linear	2,0 mL.min ⁻¹ / 33,136 cm.s ⁻¹	2,0 mL.min ⁻¹ / 40,516 cm.s ⁻¹
Razão de separação, <i>split</i>	1:20	1:100
Temperatura inicial do forno da coluna	30 °C	70 °C
Tempo total de corrida	18 minutos	5 minutos

5.3.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método rápido, seguiu-se o mesmo racional do método convencional, analisando-se os mesmos solventes residuais, nas mesmas concentrações. Os resultados da separação podem ser observados nas Figuras 13 a 15.

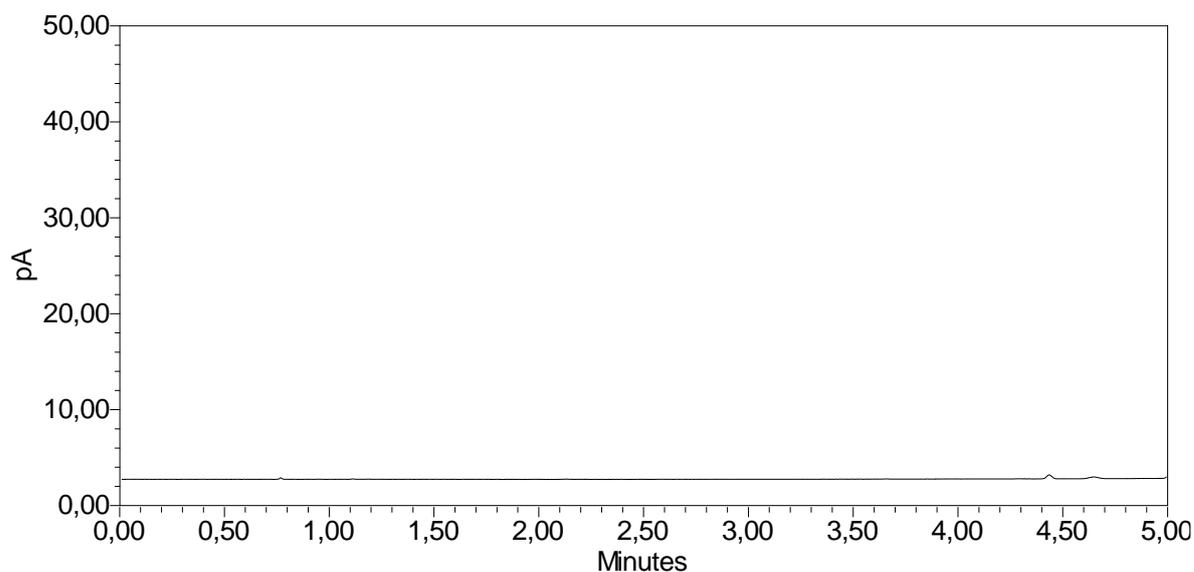


Figura 13.6: Cromatograma do diluente água ultra purificada na Solução Branco no parâmetro de seletividade do método rápido

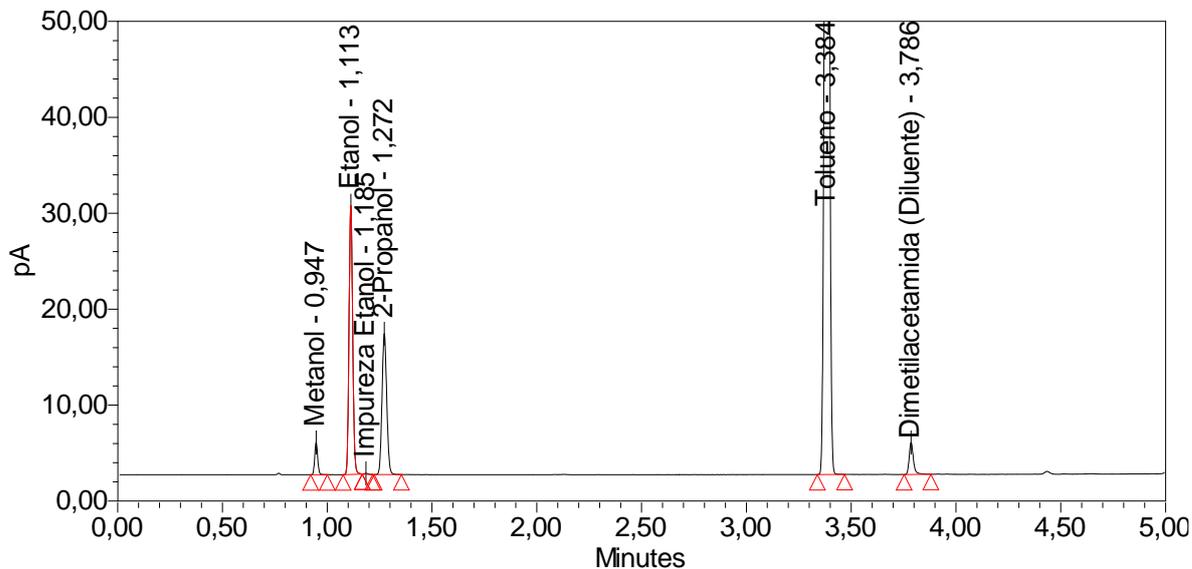


Figura 14.6: Cromatograma da mistura dos solventes residuais Metanol, Etanol, 2-Propanol e Tolueno contendo 1,0 mL da amostra de Succinato de Metoprolol avaliados

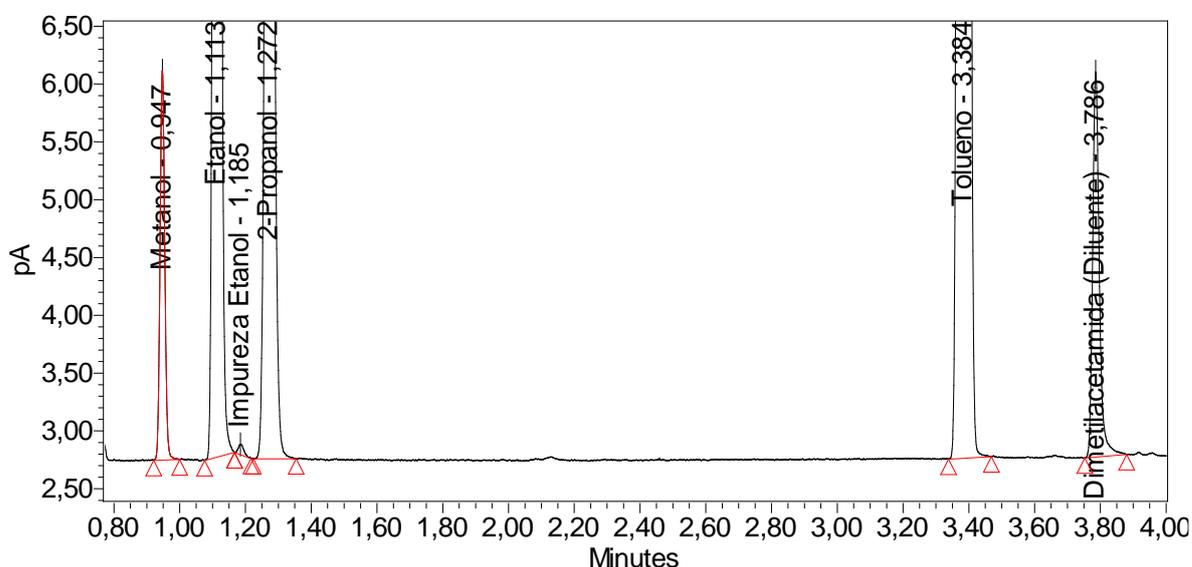


Figura 15.6: Aproximação do cromatograma da mistura dos solventes residuais Metanol, Etanol, 2-Propanol e Tolueno contendo 1,0 mL da amostra de Succinato de Metoprolol avaliados

No cromatograma apresentado na Figura 15, observa-se a eluição de um pico em 3,786 minutos, referente à “Dimetilacetamida (Diluyente)”. A presença deste é devido à sua utilização no preparo da seletividade, necessário especificamente na dissolução individual do analito Tolueno (Figura 3, apêndice 2). O solvente dimetilacetamida foi utilizado devido sua compatibilidade química com o Tolueno, visto que este é imiscível em água. Como a água é o principal solvente utilizado como diluente no preparo dos parâmetros da validação, por conseguinte, foi necessário o preparo de uma primeira diluição com o diluente dimetilacetamida para garantir a sua solubilidade e consequente identificação.

Analisando os perfis cromatográficos, verificou-se que a partir das modificações dos parâmetros cromatográficos realizadas, houve a aproximação dos tempos de retenção dos analitos, entretanto a resolução entre os picos manteve-se satisfatória. Para o Etanol, pico identificado em

1,113 minutos, não houve interferentes que dificultasse a sua identificação na presença do diluente e impurezas da matriz.

Para todos os componentes presentes na Solução Seletividade Teste, os tempos de retenção e resolução estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11.6: Identificação, tempo de retenção e resolução para os solventes residuais testados como potenciais interferentes ao analito Etanol

Solvente Residual	Tempo de Retenção (min)	Resolução ($\geq 1,5$)
Metanol	0,95	-
Etanol	1,11	5,6
Impureza Etanol	1,19	2,2
2-Propanol	1,27	2,4
Tolueno	3,38	53,7
Dimetilacetamida (Diluente)	3,79	11,0

Portanto, pode-se afirmar que o método se manteve seletivo para o solvente residual etanol, uma vez que, não houve interferências na sua identificação, não houve coeluições com possíveis impurezas e a resolução em relação à impureza do analito, pico mais próximo, manteve-se maior do que 1,5.

5.3.2 Linearidade

A Linearidade do método rápido foi verificada seguindo os mesmos critérios que o método convencional, 4 curvas e 7 níveis de concentração (30, 80, 100, 12%, 160, 200 e 240%), respeitando-se o limite de quantificação e a faixa de trabalho estabelecida. Portanto, o nível 100% manteve-se proporcional à concentração de $15000 \mu\text{g.g}^{-1}$, variando-se de acordo com cada nível.

Os resultados obtidos foram todos plotados no diagrama de dispersão apresentado na Figura 16.

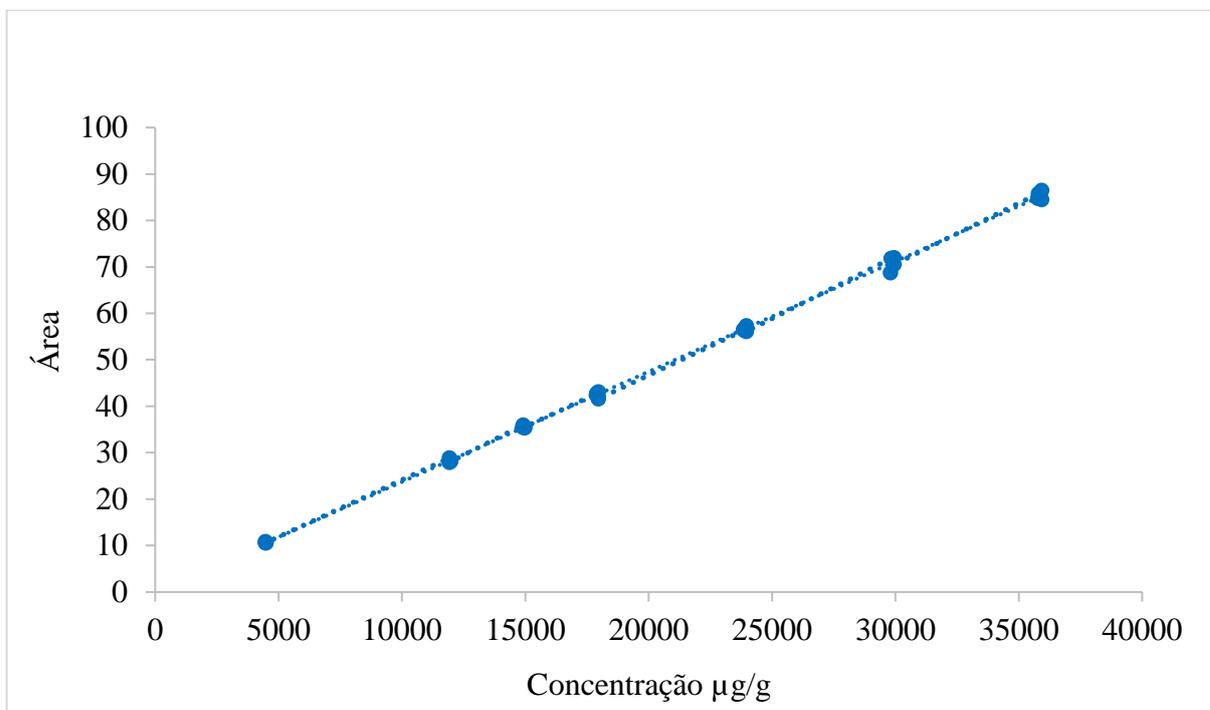


Figura 16.6: Curva analítica para determinação do solvente residual etanol em comprimidos de succinato de metoprolol 100 mg – método rápido. Equação da reta $y = 0,0024x - 0,0376$.

Conforme demonstrado na Figura 16, concluiu-se que o método rápido mostrou correlação da resposta analítica frente a variação da concentração, dado que, o valor do coeficiente de correlação foi de 0,9999, valor acima de 0,99.^[10]

Similarmente ao método convencional, os dados obtidos foram submetidos a análise estatística com o auxílio do programa *Action Stat*[®] e o resumo dos resultados pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12.6: Resumo da conclusão do estudo estatístico de linearidade do solvente residual etanol por meio do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários – método rápido

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não foi rejeitada a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0,9999 foi maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não foi rejeitada a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não foi rejeitada a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não foi detectado pontos extremos
Teste de independência das observações	Não foi detectado dependência das observações

Semelhantemente ao método convencional, os testes estatísticos aplicados ao método rápido reproduziram resultados satisfatórios uma vez que não rejeitaram a significância do modelo linear, apresentando variação constante dos erros e sem a presença de valores extremos.^[26] O gráfico de dispersão dos resíduos para o método rápido é apresentado na Figura 17.

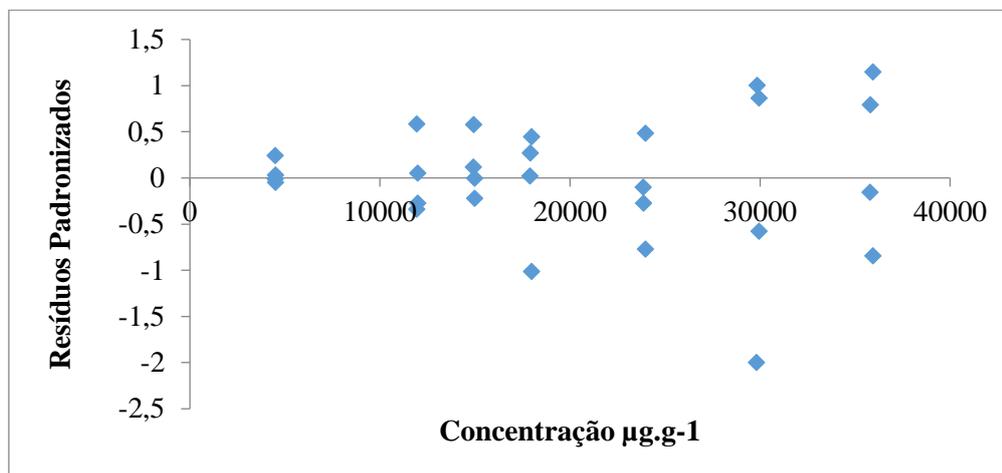


Figura 17.6: A distribuição e os valores dos resíduos padronizados para o solvente residual etanol utilizado na construção da curva analítica – método rápido

Após a avaliação dos resultados concluiu-se que o método rápido foi considerado linear para a análise do solvente residual etanol, pois se manteve o atendimento a todos os critérios de avaliação preconizados na legislação.

5.3.3 Precisão e Exatidão

Nos parâmetros de precisão e exatidão, foram avaliados os níveis 30 (baixo), 120 (médio) e 240% (alto), correspondentes às concentrações de 4500, 18000 e 36000 µg.g⁻¹, conforme método convencional. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 13.

Tabela 13.6: Resultados para os ensaios de precisão e recuperação – método rápido

Nível (%)	Nível de recuperação (µg.g ⁻¹)	Quantidade adicionada (µg.g ⁻¹)	Quantidade calculada (µg.g ⁻¹)	DPR ^[27] (≤ 3,7%)	Recuperação ^[27] (95–105%)
30%	4500	4475	4492	0,6	100,39
		4492	4488		99,91
		4471	4441		99,31
120%	18000	17899	17726	1,6	99,03
		17968	18272		101,70
		17885	17837		99,73
240%	36000	35798	35574	1,7	99,37
		35936	36670		102,04
		35771	35607		99,54

Os resultados apresentados mostram que, após todos os ajustes realizados o método rápido apresentou capacidade de identificar e quantificar o analito etanol com confiabilidade, com valores muito semelhantes de desvio padrão relativo e de recuperação reportados no método convencional.^[27]

Portanto, como os valores obtidos se apresentaram em concordância com os guias e especificações submetidas, é possível concluir que o método rápido é preciso e exato.

5.4 COMPARAÇÃO DO MÉTODO CONVENCIONAL *VERSUS* MÉTODO RÁPIDO

Para efeito de comparação entre os métodos convencional e rápido, realizou-se testes de efeito memória nas duas condições, com o intuito de verificar a repetibilidade e a recuperação após várias injeções sucessivas em seu maior nível de concentração. Outrossim, aplicou-se o teste de frequência analítica de trabalho no equipamento e mediu-se o tempo total gasto das injeções realizadas em ambos os métodos.

5.4.1 Teste de Efeito Memória método convencional

Na execução do teste de efeito memória (*carryover*) foi optado por realizar o total de dez injeções no nível mais alto da faixa de trabalho, nível 240%, no qual a concentração do solvente residual etanol é a maior obtida e avaliar a repetibilidade entre as injeções e a recuperação individual de cada réplica. Também foi verificado possíveis interferências causadas pelo efeito memória.

Os teores obtidos, expressados em $\mu\text{g.g}^{-1}$, estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14.6: Resultados do teste de efeito memória nas condições do método convencional

Nível (%)	Nível de recuperação($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Quantidade adicionada($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	DPR Teores (%)	Recuperação ^[27] (95–105%)
240%	36000	35815	35375	1,6	98,77
			37073		103,51
			36733		102,56
			37149		103,73
			36048		100,65
			35796		99,95
			35922		100,30
			36055		100,67
			35964		100,42
			36044		100,64

Dados os resultados expostos, verificou-se que o desvio padrão relativo entre as dez análises realizadas é de 1,6%, valor esse que expressa que os teores sofreram mínima ou até mesmo nenhuma influência de efeito *carryover*. Os resultados individuais de recuperação de cada uma das injeções confirmam essa não interferência, com um valor médio de 101%, e, portanto, o método convencional demonstra sua eficácia em repetibilidade e exatidão.

5.4.2 Teste de Efeito Memória método rápido

O mesmo raciocínio foi adotado para teste do método rápido, aplicando as condições finais otimizadas. Foram analisadas dez injeções e avaliados os mesmos parâmetros de desvio padrão relativo e recuperação.

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15.6: Resultados do teste de efeito memória nas condições do método rápido

Nível (%)	Nível de recuperação($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Quantidade adicionada($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Quantidade recuperada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	DPR Teores (%)	Recuperação ^[27] (95–105%)
240%	36000	35815,14	35518	0,9	99,17
			35750		99,82
			35925		100,31
			35505		99,13
			34836		97,27
			35353		98,71
			35696		99,67
			35383		98,79
			35495		99,11
			34965		97,63

Ao observar os dados da Tabela 15, verificou-se que o valor de desvio padrão relativo dos dez teores obtidos experimentalmente foi de 0,9%, valor esse menor quando comparado ao método convencional, demonstrando assim maior eficácia na repetibilidade das injeções. Da mesma forma as recuperações individuais foram satisfatórias, com valor médio de 99%, resultados semelhantes aos obtidos através do método convencional.

Portanto, podemos afirmar que com as alterações propostas para aprimorar o método convencional, o método rápido apresentou resultados iguais ou até mesmo mais eficientes, atendendo a proposta de realizar análises mais rápidas sem perder a eficiência, confiança e qualidade dos resultados.

5.4.3 Teste de frequência analítica do equipamento no método convencional *versus* método rápido

Para avaliar os ganhos obtidos a partir das modificações realizadas, foi calculada a frequência analítica de trabalho do equipamento de ambos os métodos, ou seja, a capacidade análise/horas de cada deles.

Foi calculada a diferença de tempo entre cada uma das dez injeções realizadas no teste de efeito de memória, ou seja, a hora final menos a inicial de cada injeção, considerando além do tempo da corrida cromatográfica, o tempo de retomada do sistema entre as injeções. Desta forma, a duração

média de cada análise para o método convencional foi de 30 minutos, enquanto para o método rápido foi de 13,85 minutos.

É possível verificar o ganho significativo a partir da implementação do método rápido em análises de rotina, visto que a cada uma injeção do método convencional, por intermédio do método rápido é possível mais do que dobrar o número de injeções. O método convencional apresenta a capacidade de realizar 2,0 injeções por hora, em contrapartida, o método rápido apresenta a capacidade de realizar 4,3 injeções por hora.

Estes dados tornam-se extremamente relevantes, quando submetido a um montante de análises, na qual se tem uma quantidade significativa de injeções, deste modo fica mais visível o ganho com a aplicação do método rápido. Se considerarmos a situação hipotética de um laboratório que trabalha 8 horas ininterruptas nesta mesma análise, com base nos dados obtidos, a partir do método convencional seria possível realizar o número total de 16 análises, enquanto, o método rápido conseguiria executar o total de 34,7 análises.

Além das vantagens supracitadas, devido a sua capacidade de executar grande demanda de análises em menores tempos, deduz-se que o método rápido também apresenta vantagens na análise de substâncias que apresentam tempos de estabilidade limitados, quando em soluções que necessitam de curtos períodos de avaliação.

6. CONCLUSÃO

Um método analítico convencional foi desenvolvido para a determinação de etanol em succinato de metoprolol por cromatografia em fase gasosa, partindo de condições instrumentais de métodos já validados. O método foi validado para esta aplicação específica, sendo seletivo, preciso, exato e robusto.

As modificações propostas no método convencional resultaram em uma significativa redução do tempo de corrida cromatográfica, principalmente com as trocas de dimensão da coluna, temperatura do forno e razão de Split. O método de separação rápida também se mostrou seletivo, preciso, exato e robusto. Não foi observado efeito de memória no método rápido, da mesma forma que não foi observado no método convencional.

Após validados os dois métodos, foram realizadas comparações em termos de frequência analítica de trabalho no equipamento, na qual o método rápido mostrou ser 2,2 vezes mais rápido do que o método convencional, mais que dobrando a produtividade.

Portanto, o método rápido pode ser aplicado como um potencial método em ambientes de controle de qualidade para quantificação de solvente residual em medicamentos, bem como ser um referencial na otimização de parâmetros em cromatografia em fase gasosa.

7. PERSPECTIVAS E TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros fica a sugestão da avaliação de inclusão de potenciais solventes residuais nas condições do método rápido e validação deste contemplando mais analitos.

Comparar o desempenho do método analítico rápido obtido para determinação de solventes residuais frente a métodos convencionais, para posterior divulgação dos resultados.

8. REFERÊNCIAS

1. CAMPANHARO, Sarah Chagas. **Impurezas farmacêuticas: análise do contexto nacional e internacional**. 2016. 63 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
2. OLIVEIRA, Leonardo Guimarães de; POLETTI, Erick. **Validação de Métodos Analíticos de Solventes Residuais com o uso da Cromatografia Gasosa**. Edição 22, 9 f. Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz
3. DE SOUSA MARINHO, Laynna Núbia; MEIRELLES, Lyghia Maria Araújo. Os riscos associados ao uso de medicamentos isentos de prescrição. **Revista saúde multidisciplinar**, v. 9, n. 1, 2021.
4. ICH, Harmonised Guideline. **Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R8)**, 2021.
5. OLIVEIRA, Camila Cristina de. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica por cromatografia gasosa capaz de identificar os solventes residuais provenientes da rota de síntese do omeprazol 8, 5% pellets e comprovar seletividade**. 2018. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Centro Universitário de Formiga-UNIFOR, Formiga, 2018.
6. 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) - Farminguinhos Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2016.
7. BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº658, de 31 de Março de 2022**. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, DF, n. 62, 2022.
8. SILVA, Yorhana de Azevedo et al. **Comparação entre técnicas de granulação via úmida: leito fluidizado x alto cisalhamento**. 2019.
9. ALVES, Adirley Machado; KALLAS FILHO, Elias. Recall de medicamentos. *Revista de Direito Sanitário*, v. 18, n. 2, p. 157-174, 2017.
10. BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, DF, n. 141, 2017.
11. MARTINEZ-MILLA, Juan et al. Role of beta-blockers in cardiovascular disease in 2019. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 72, n. 10, p. 844-852, 2019.
12. PINHEIRO, Taise Gonçalves et al. A relação entre o uso de betabloqueadores e a exacerbação da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 4, p. e7248-e7248, 2021.

13. OLIVER, Eduardo; MAYOR JR, Federico; D'OCÓN, Pilar. Beta-blockers: historical perspective and mechanisms of action. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 72, n. 10, p. 853-862, 2019.
14. CHUNLAI, Mi, KAI, Chen; SHUDONG, Wei; PING, Bian; WENJING, Yao; YONGPENG, Long. **Synthesis method of metoprolol succinate**. Depositante: Beijing Hwells Pharmaceutical Co Ltd. CN103102281A. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN103102281A/en>. Acesso em: 26 fev. 2023.
15. FIORENTIN, Anderson Luiz. **Validação de metodologia analítica para análise de solventes residuais na matéria prima indapamida por cromatografia gasosa**. 2021. 44 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2021.
16. COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto Leite; BONATO, Pierina Sueli. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.
17. SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2006.
18. SEQUINEL, Rodrigo. **Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por Headspace estático**. 2013. 103 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
19. LANÇAS, Fernando Mauro. **Fundamento da cromatografia gasosa**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2017.
20. SEQUINEL, Rodrigo et al. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 33, p. 2226-2232, 2010.
21. ZOCCALI, Mariosimone; TRANCHIDA, Peter Q.; MONDELLO, Luigi. Fast gas chromatography-mass spectrometry: A review of the last decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 444-452, 2019.
22. Brasil. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: MAPA/ACS, 2011.
23. RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
24. ICH, Harmonized Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, 2005.
25. BARTH, Howard. Chromatography Fundamentals, Part VIII: The Meaning and Significance of Chromatographic Resolution. 2019.
26. Brasil. **Guia nº 10**. Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica. 2017.
27. AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Official Methods of Analysis of AOAC. 2016.

28. SATTINENI, Sirisha R. et al. Method development and validation for the determination of residual solvents in racecadotril by gas chromatography. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 17, n. 9, p. 1232-1239, 2021.
29. SOJITRA, Chandrakant et al. Development and validation of residual solvent determination by headspace gas chromatography in Imatinib Mesylate API. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2019.
30. Agilent CrossLab Compliance Services; GC Hardware, Operational Qualification, Dezembro, 2018.
31. NOORBASHA, Khaleel; SHAIK, Abdul Rahaman. Determination of residual solvents in paclitaxel by headspace gas chromatography. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-17, 2021.
32. ICH, Harmonized Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures Q2 (R2)**, 2022.
33. PANDEY, Saurabh et al. Residual solvent determination by head space gas chromatography with flame ionization detector in omeprazole API. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 379-384, 2011.
34. PAOLINI, Mauro; TONIDANDEL, Loris; LARCHER, Roberto. Development, validation and application of a fast GC-FID method for the analysis of volatile compounds in spirit drinks and wine. **Food Control**, v. 136, p. 108873, 2022.
35. TAYLOR, Tony. The LGGC Blog: Is Hydrogen the Only Viable Gas Chromatography Carrier Gas for the Long-Term?. **Column**, The Column, Volume 15, Issue 10, Páginas 24-30, Agosto, 2019. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/lcgc-blog-hydrogen-only-viable-gas-chromatography-carrier-gas-long-term-0>, Acesso em: 27 fev. 2023.
36. SHOU, Minshan; QIU, Haixiao. Development of a rapid GC-FID method to simultaneously determine triethylamine, diisopropylamine, and 1, 1, 3, 3-tetramethylguanidine residues in an active pharmaceutical ingredient. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 251-256, 2021.
37. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira 6ª ed. Brasília, v. 1, 2019.

Cálculo de especificação

A determinação da especificação do solvente etanol em Succinato de Metoprolol foi baseada no guia internacional *ICH Guideline Q3C (R8) Impurities: Guideline for residual solvents*, a partir dos valores de dose máxima do produto e exposição diária permitida (*Permitted Daily Exposure –PDE*) do solvente.^[4]

Na formulação do produto, considerou-se a possibilidade do uso do solvente etanol nas rotas produtivas dos excipientes e, portanto, para o cálculo foi utilizada a opção dois do guia.

As informações de dose máxima para o Succinato de Metoprolol 100 mg Comprimido Revestido é de 200 mg/dia, ou seja, podem ser ingeridos 2 comprimidos ao dia, massa média do comprimido revestido de 380,20 mg e valor de *PDE* para o Etanol de 50 mg/dia foram consideradas.

Segundo a farmacopeia brasileira, para comprimidos com massa média superior a 250 mg, aceita-se uma variação de massa de até 5%. Assim, calculou-se o maior peso que o comprimido de succinato de metoprolol 100 mg pode obter, multiplicando a massa média do comprimido revestido de 380,20 mg, pela variação de 5% (380,20 mg x 5%) e atingiu-se o resultado de 399,21 mg.^[37]

Sendo assim:

$$\begin{aligned} & \text{Succinato de Metoprolol 100 mg} \rightarrow \text{Dose Máxima de 200 mg} \\ & = \text{Máximo de 2 comprimidos/dia} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & 2 \text{ comprimidos/dia} \times \text{massa média comprimido (399,21 mg)} \\ & = 798,42 \text{ mg ou } 0,79842 \text{ g} \end{aligned}$$

Aplicou-se o valor encontrado como dose máxima na equação de “concentração limite” trazida pela opção dois do guia, temos:

$$\text{Concentração (ppm)} = \frac{1000 \times PDE}{\text{dose}} = \frac{1000 \times 50}{0,79842} = 62624$$

Onde *PDE* é dado por mg por dia (mg/dia), e a dose é dada em grama por dia (g/dia).

Portanto, o valor de especificação para etanol no produto Succinato de Metoprolol 100 mg Comprimido Revestido pode ser de até 62624 ppm ou 62624 µg.g⁻¹, entretanto, optou-se por manter o valor limite em 15000 µg.g⁻¹ para limitar a exposição dos pacientes a este solvente.

Cromatogramas para identificação individual dos solventes residuais analisados na seletividade do método Rápido.

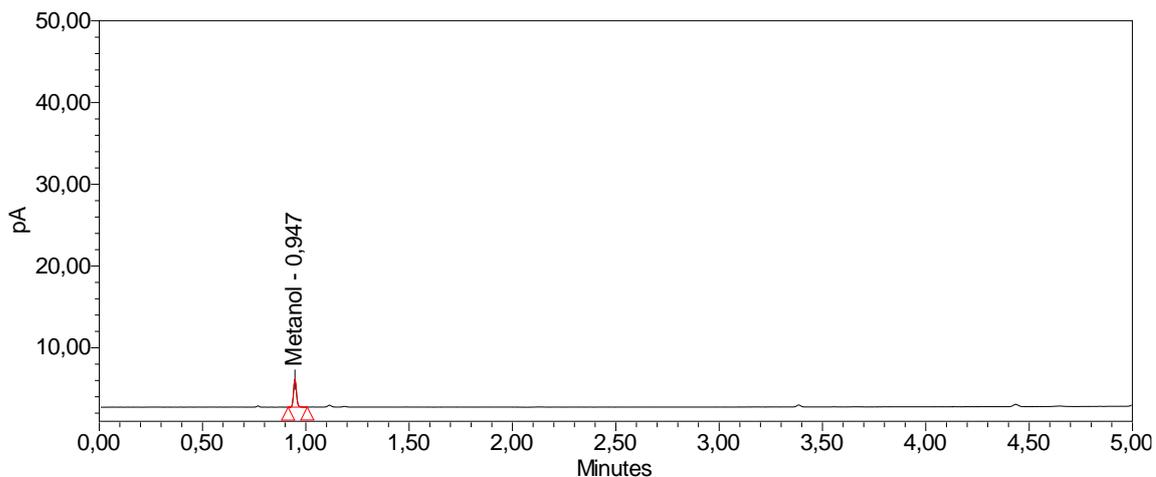


Figura 1 – Cromatograma de identificação do solvente residual Metanol – Solução Padrão Metanol

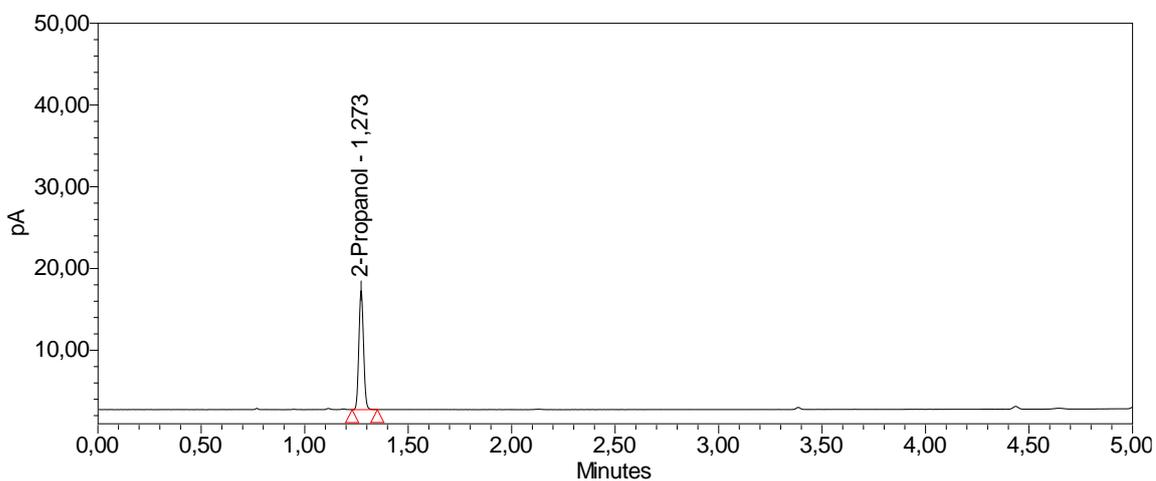


Figura 2– Cromatograma de identificação do solvente residual 2-Propanol – Solução Padrão 2-Propanol

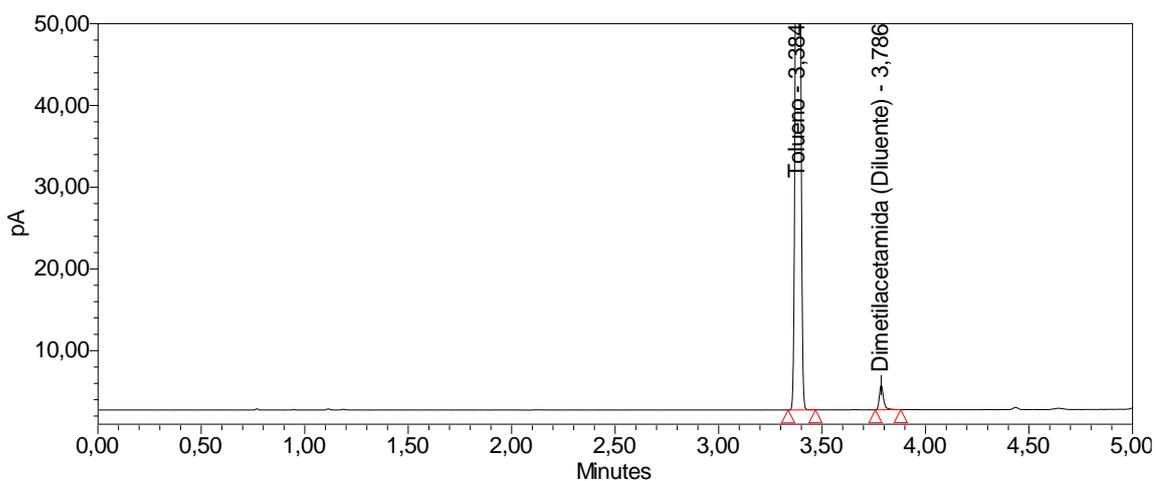


Figura 3 – Cromatograma de identificação do solvente residual Tolueno – Solução Padrão Tolueno