



Desenvolvimento farmacêutico e validação do método analítico de uma suspensão contendo paracetamol

Ana Filipa Pinheiro Vilela Ferreira

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Desenvolvimento farmacêutico e
validação do método analítico de uma
suspensão contendo paracetamol**

Ana Filipa Pinheiro Vilela Ferreira

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado
em Química, ramo de Controlo de Qualidade e
Ambiente**

Professor Doutor Jorge L. G. F. S. Costa Pereira
Mestre Ricardo Filipe dos Reis Campante

**Setembro de 2010
Universidade de Coimbra**

Índice

	Pág.
1. Introdução	2
1.1. Laboratórios Basi	2
2. Fundamentos teóricos	6
2.1. Formas farmacêuticas líquidas	6
2.2. Paracetamol	7
2.2.1. Características físico-químicas	9
2.2.2. Propriedades farmacológicas	11
2.2.2.1. Indicações terapêuticas	11
2.2.2.2. Farmacocinética	12
2.2.2.3. Dosagem e administração	13
2.3. Solubilidade	14
2.4. Métodos instrumentais de análise	16
2.4.1. Espectrofotometria de absorção no UV/vis	17
2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência	17
2.5. Tratamento estatístico de dados	19
2.5.1. Desvio padrão	19
2.5.2. Intervalo de confiança	20
2.5.3. Testes estatísticos	22
2.5.3.1. Teste de hipóteses e significância	22
2.5.3.2. Procedimento	23
2.5.4. Análise de variância	25
2.6. Validação de métodos analíticos	26
2.6.1. Especificidade e selectividade	29
2.6.2. Gama de trabalho	31
2.6.3. Linearidade	31
2.6.3.1. Preparação da curva de calibração	31

2.6.4. Limiares analíticos	34
2.6.4.1. Limite de decisão	36
2.6.4.2. Limite de detecção	36
2.6.4.3. Limite de quantificação	37
2.6.5. Sensibilidade	38
2.6.6. Precisão	38
2.6.6.1. Repetibilidade	39
2.6.6.2. Precisão intermédia	40
2.6.6.3. Reprodutibilidade	41
2.6.7. Exactidão	41
2.6.8. Robustez	44
2.6.9. Coerência	45
2.6.10. Adequabilidade do sistema	45
2.6.11. Estabilidade das amostras	45
3. Secção experimental	48
3.1. Materiais e equipamento	48
3.1.1. Paracetamol	48
3.1.2. Ácido cítrico monohidratado	48
3.1.3. Citrato de sódio	49
3.1.4. Sacarose	49
3.1.5. Metilparabeno e Propilparabeno	50
3.1.6. Aroma de laranja	51
3.1.7. Tartrazina	51
3.1.8. Goma xantana	52
3.1.9. Água purificada	52
3.1.10. Medicamento de referência	53
3.1.11. Reagentes	53
3.1.12. Fase móvel HPLC	53
3.1.12.1. Solução aquosa de ácido acético	63
3.1.13. Solução padrão para o doseamento do	

paracetamol, metilparabeno e propilparabeno	54
3.1.13.1. Solução padrão mãe de paracetamol	54
3.1.13.2. Solução padrão mãe de metilparabeno	54
3.1.13.3. Solução padrão mãe de propilparabeno	54
3.1.13.4. Solução padrão a 100%	54
3.1.14. Solução para ensaio de solubilidade	55
3.1.14.1. Solução padrão mãe de paracetamol	55
3.1.15. Equipamento	56
3.2. Métodos	56
3.2.1. Quantificação espectrofotométrica do paracetamol	56
3.2.2. Solubilidade do paracetamol	57
3.2.3. Doseamento por HPLC da substância activa e conservantes	57
3.2.3.1. Condições de trabalho	58
3.2.3.2. Tratamento da amostra	58
3.2.4. Características da suspensão de paracetamol	60
3.2.4.1. Descrição	61
3.2.4.2. Viscosidade	61
3.2.4.3. Densidade	61
3.2.4.4. pH	62
4. Resultados e Discussão	64
4.1. Quantificação espectrofotométrica	64
4.2. Solubilidade	66
4.3. Medicamento de referência	67
4.4. Suspensão contendo paracetamol	67
4.5. Validação do método analítico	68
4.5.1 Especificidade	68
4.5.2. Linearidade e Gama de trabalho	70
4.5.3. Sensibilidade	76
4.5.4. Limiares analíticos	76

4.5.5. Precisão	77
4.5.5.1. Repetibilidade	77
4.5.5.2. Precisão intermédia	78
4.5.6. Exactidão	85
4.5.7. Estabilidade das soluções analíticas	89
4.5.7.1. Estabilidade da solução padrão	89
4.5.7.2. Estabilidade da solução amostra	94
5. Conclusões	101
6. Bibliografia	105
Anexos	108
A.1. Cromatogramas correspondentes ao ensaio de especificidade.	108

Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

Abs – Absorvância

CV – Coeficiente de variação

HR – Humidade Relativa

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

ICH - Conferência Internacional de Harmonização (do inglês *International Conference on Harmonisation*)

ISO - Organização Internacional para a Padronização (do inglês *International Organization for Standardization*)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LQ – Limite de quantificação

LD – Limite de decisão

MRC – Materiais de Referência Certificados

Mw – Massa molar

Ndf – número de graus de liberdade

OLS - *Ordinary Least Squares*

P - Pureza

RSD – Desvio padrão relativo

R² – Coeficiente de determinação do ajuste linear

TV – Valor experimental

USP - Farmacopeia dos Estados Unidos da América (do inglês *United States Pharmacopoeia*)

UV/VIS - Ultravioleta/Visível

WLS – *Weighted Least Square*

X_d – Limite de decisão
 X_{LD} – Limite de detecção
 X_{LQ} – Limite de quantificação

Resumo

O paracetamol é o medicamento mais consumido e vendido em Portugal e no resto do mundo, para o tratamento da dor e da febre e é facilmente adquirido nas farmácias. Actualmente, encontra-se no mercado várias formas farmacêuticas contendo paracetamol com eficácia clínica comprovada, como comprimidos, xaropes e supositórios. O produto de referência utilizado, que serviu de base este projecto foi o xarope Ben-U-ron®, paracetamol a 40mg/ml, que se encontra comercializado em todo o mundo.

Deste modo, com o presente trabalho pretendeu-se numa primeira fase caracterizar o produto de referência de uma forma geral, e em particular determinar e estabelecer a formulação qualitativa e as especificações técnicas do produto acabado. A segunda fase do trabalho consistiu no desenvolvimento da formulação farmacêutica contendo paracetamol, tendo como base a formulação qualitativa do produto referência e especificações do produto acabado e posteriormente a validação do método de análise do produto acabado. Na validação foram avaliados os parâmetros: especificidade, gama de trabalho, sensibilidade, limites analíticos, precisão, exactidão e estabilidade das amostras.

Abstract

Paracetamol is one of the most popular and widely used drugs for treatment of pain and fever in Portugal and in world and is easily acquired in pharmacies. Currently, the market is more dosage forms containing acetaminophen with proven clinical efficacy, such as tablets, syrups and suppositories. The reference product used in this project ,was the syrup Ben-U-ron ®, paracetamol 40mg/ml, which is marketed worldwide.

Thus, initially with this work the characterization of the reference product in a global way was attempted and in particular to determine and establish the design quality and technical specifications of the finished product. The second phase of work was the development of pharmaceutical formulation containing paracetamol, based on the formulation of the reference product quality and specifications of the finished product and further validation of the method of analysis of finished product. In the validation parameters were evaluated: specificity, working range, sensitivity, analytical limits, precision, accuracy and stability of the samples.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Jorge L.G.F.S. Costa Pereira pela oportunidade de realizar este trabalho, por todos os conhecimentos e orientação científica, pela sua disponibilidade, pela opinião e revisão crítica.

Ao Mestre Ricardo Filipe dos Reis Campante, meu orientador externo, pela integração no seu grupo de trabalho, simpatia, paciência, compreensão, disponibilidade e por tudo que me ensinou.

A todos os colegas de trabalho dos Laboratorios Basi gostaria de agradecer o apoio, a ajuda laboratorial, a compreensão, o companheirismo e a boa disposição que demonstraram, proporcionando um bom ambiente de trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos por todo o seu apoio, carinho, paciência durante estes anos, com períodos bons e outros menos bons e ainda aos meus colegas de curso que estiveram por perto na minha vida académica.

Obrigada a toda a minha família, em especial à minha mãe e ao meu irmão, pela paciência, carinho, disponibilidade e apoio. Por último o meu muito obrigada á minha sobrinha por todas as brincadeiras, carinho e sorrisos e ao meu pai, o meu anjo da guarda.

Prefácio

Este trabalho encontra-se desenvolvido sob a forma de cinco capítulos. No primeiro capítulo procurou-se transmitir e resumir, sob a forma de uma perspectiva global o tema do trabalho e o objectivo do mesmo. No segundo capítulo pretendeu-se abordar os fundamentos teóricos essenciais para a execução do mesmo enquanto no terceiro capítulo apresenta-se a secção experimental onde se descreve os métodos e materiais necessários. No quarto capítulo apresenta-se os resultados obtidos no decorrer do trabalho, bem como o seu tratamento estatístico e discussão dos mesmos. No último capítulo apresenta-se as conclusões finais do trabalho realizado.

Por uma questão de simplicidade prescindiu-se da utilização da vírgula, como separador decimal dos números reais, tendo recorrido, para este efeito, ao ponto decimal. Esta substituição permitiu transportar, de uma forma expedita, toda a informação numérica, computacional e gráfica para o texto. Para facilitar a transferência e permitir manter a coerência dessa informação, optou-se por representar os números reais sob a forma exponencial com a notação utilizada nos programas de cálculo onde, por exemplo, 3.201E-08 representa o valor 3.201×10^{-8} escrito correctamente no formato científico.

Sempre que possível e adequado, os valores estimados estão representados com a sua incerteza associada, respectivo erro padrão, indicada entre parêntesis, seguida das respectivas unidades, de forma a conferir maior significado estatístico aos resultados obtidos.

1. Introdução

1. Introdução

O uso de analgésicos naturais, para alívio das dores remonta aos primórdios da história (cerca de 3.000 a.C.) onde se recorria ao uso de plantas. Posteriormente, o rápido avanço dos conhecimentos fitoquímicos levaram à descoberta e ao desenvolvimento dos analgésicos.

Um exemplo clássico foi a síntese do ácido salicílico, em 1860, e dos compostos do grupo da pirazolona, representado pela antipirina, em 1883. A fenacetina foi sintetizada em 1886 e finalmente em 1890, tem-se o desenvolvimento do paracetamol (acetaminofeno) ^[1].

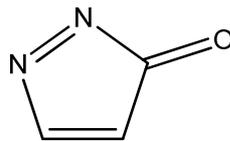


Figura 1.1 – Estrutura química da pirazolona.

Actualmente o paracetamol é um dos fármacos mais utilizado a nível global para o alívio das dores crónicas e é um dos melhores analgésicos disponíveis no mercado. Encontra-se disponível em diversas formas farmacêuticas com eficácia clínica aprovada, como é o caso de comprimidos, supositórios e xaropes.

Desta forma, o objectivo deste trabalho, foi numa primeira fase caracterizar o produto de referência (Ben-u-ron®, paracetamol a 40mg/ml, xarope) de uma forma geral e numa segunda fase foi o desenvolvimento de uma formulação contendo paracetamol tendo como base a formulação qualitativa do medicamento de referência e especificações do produto acabado e validação do seu método de

análise. O projecto foi desenvolvido nas instalações da Basi-Laboratórios de indústria farmacêutica em Coimbra.

1.1. Laboratórios BASI

Os Laboratórios BASI, S.A. (seguidamente designado por Basi) encontram-se sediados em Coimbra na Rua do Padrão nº 98 e actualmente são um dos mais antigos Laboratórios da Indústria Farmacêutica Portuguesa. Desde a sua fundação, em 1956, consolidaram a sua presença no mercado nacional, e ao longo das últimas décadas em países de língua oficial Portuguesa. É reconhecida como uma empresa de referência no seu sector que conta com uma história de mais de 50 anos, erigida sobre uma enorme diversidade de acontecimentos, experiência e aprendizagens.

Em 2007 e com a aquisição de 98% do capital da companhia pelo novo accionista, é promovida uma profunda reestruturação organizativa e a requalificação de toda a unidade fabril, sendo também definida uma nova orientação estratégica de acordo com as Boas Práticas de Fabrico.

A missão dos laboratórios Basi é fornecer às pessoas soluções terapêuticas ajustadas às suas necessidades, ao melhor preço possível e com a garantia de excelência de décadas de actividade. Para tal, têm implementado um sistema de gestão de qualidade conforme as normas UNI EN ISO 9001 que permite uma contínua melhoria de processos, garantia de bons serviços e resposta às exigências da população. Este sistema de gestão de qualidade é diariamente acompanhado pelo Responsável de Gestão da Qualidade (GQ) do Departamento de Garantia da Qualidade.

O portfólio dos laboratórios Basi conta com produtos éticos, medicamentos não sujeitos a receita médica, dermocosméticos e suplementos alimentares dedicando-se à produção de medicamentos sólidos, semi-sólidos e líquidos não estéreis, nomeadamente, supositórios, xaropes, pomadas, cremes, géis e suplemento alimentares.

Os laboratórios BASI mantêm actualmente uma relação de parceria estratégica com as empresas FHC Farmacêutica, Overpharma (Produtos Médicos e Farmacêuticos), Phagecon (Consultoria e Serviços Farmacêuticos) e ainda com a Organização PharmaPortugal.

2. Fundamentos teóricos

2. Fundamentos teóricos

2.1. Formas farmacêuticas líquidas

Segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto, o estatuto de medicamento, forma farmacêutica é o “estado final que as substâncias activas ou excipientes apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado”^[2].

A classificação das formas farmacêuticas pode ser realizada utilizando vários critérios, como a sua acção terapêutica, o tipo de administração, estado físico, método de fabrico e o modo de libertação dos constituintes.

As suspensões são sistemas heterogéneos em que a fase externa ou contínua (fase dispersante) é líquida ou semi-sólida e a fase interna ou dispersa é constituída por partículas sólidas insolúveis no meio utilizado. Com o repouso e a acção da gravidade as partículas sedimentam, o que implica a agitação da embalagem antes do uso. As suspensões podem ser usadas para uso oral, aplicação tópica na pele, aplicação nas mucosas e administração parenteral mas não podem ser usadas na via sanguínea, pelo perigo de formação de êmbolos. O uso de suspensões justifica-se devido à insolubilidade dos fármacos nos veículos habitualmente usados, o mau sabor que os compostos podem apresentar em solução ou em pó e para prolongar a acção do princípio activo.

Uma suspensão representa um sistema termodinamicamente instável. As partículas dispersas na grande superfície e energia livre tendem a agrupar-se para que a área inicial seja reduzida, como também o seu nível energético. Assim numa suspensão líquida vai haver tendência para que as partículas sólidas se unam umas às outras, o que poderá gerar agregados mais firmes que sedimentam e que não são susceptíveis de serem novamente suspensos. Do ponto de vista farmacêutico interessa obter suspensões que não depositem rapidamente, que possam reconstituir facilmente com agitação, que o produto apresente aspecto homogêneo durante o maior período de tempo possível e que durante o seu armazenamento não se verifique aparecimento de cristais.

2.2. Paracetamol

O paracetamol ou acetaminofeno apresenta-se como o fármaco mais versátil e mais usado no tratamento da febre (antipirético) e da dor (analgésico) em diversos pacientes incluindo crianças, mulheres grávidas e idosos. É um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas, mas sem propriedades anti-inflamatórias clinicamente provadas ^[3]. Quando administrado nas doses recomendadas apresenta um excelente perfil de segurança ^[4,5].

A origem das palavras acetaminofeno e paracetamol deriva da nomenclatura usada em química orgânica N-**acetil-para-aminofenol** e **para-acetilaminofenol**. A IUPAC recomenda, desde 1993, o nome sistemático N-(4-hidroxifenil)acetamida.

Nos tempos primórdios da história e durante o período medieval utilizavam-se analgésicos naturais para o alívio das dores, recorrendo para tal ao uso de plantas na sua preparação. Os

antipiréticos naturais conhecidos eram os compostos presentes na casca do salgueiro-branco e outros compostos contidos na casca da quina. A cortiça da quina era utilizada para a obtenção de quinino, composto que apresenta actividade antimalária e antipirética. Em 1880 a quina começou a escassear, sendo necessário procurar alternativas, e assim dois compostos antipiréticos foram desenvolvidos, em 1886 a acetanilida e em 1887 a fenacetina, ambas com a vantagem de apresentarem propriedades analgésicas e antipiréticas ao contrário dos produtos naturais que até aí eram usados. Nesta altura já o paracetamol tinha sido sintetizado (1873) por Harmon Northrop Morse, através da redução do p-nitrofenol com o estanho em ácido acético glacial, embora não tenha sido utilizado para fins medicinais durante décadas. Em 1893, este composto foi encontrado na urina dos indivíduos que tinham tomado fenacetina que depois de isolado foi descrito como um composto branco, cristalino e de sabor amargo. Em 1899 foi identificado como sendo um metabolito da acetanilida, mas estas descobertas foram ignoradas durante algum tempo. O Instituto para o Estudo de Drogas Analgésicas e Sedativas, em 1946, atribuiu um subsídio ao Departamento de Saúde de Nova Iorque, para o estudo de problemas associados ao uso de analgésicos e Bernarde Brodie e Julius Axelrod foram nomeados para investigar a origem pela qual compostos diferentes da aspirina estavam associados ao desenvolvimento de metahemoglobinémia (conversão excessiva da hemoglobina em metahemoglobina, que é incapaz de transportar oxigénio). Em 1948, ambos os investigadores relacionaram o uso da acetanilida e fenacetina com a metahemoglobinémia e deduziram que o seu efeito analgésico era devido ao seu metabolito maioritário, o paracetamol. Assim propuseram o seu uso como analgésico, uma vez que não apresentava os efeitos tóxicos da acetanilida ^[6].

Na década de 50, devido ao trabalho destes dois investigadores, houve a introdução de paracetamol no mercado. Em 1955 pelos laboratórios McNeil sob o nome registado Tylenol ® (elixir das crianças), em 1956 no Reino Unido, comprimidos de 500 mg de paracetamol com o nome Panadol ®, produzido pela Frederick Stearns & Co. e em Junho de 1958 iniciou-se a comercialização de xarope, uma nova forma de apresentação, Elixir Panadol ®, destinado às crianças. Em 1963, o paracetamol foi adicionado à Farmacopeia Britânica e a partir desta data, o seu uso vulgarizou-se^[6].

Actualmente o paracetamol é um dos analgésicos mais utilizados por ser seguro e não interagir com a maioria dos medicamentos. Encontra-se disponível em diferentes formas farmacêuticas como cápsulas, comprimidos, gotas, xaropes, supositórios e injectáveis. Em Portugal encontra-se disponível com o nome comercial Ben-U-Ron®, Panadol ® e Supofen ® entre outros e segundo o Infarmed (Autoridade Nacional do Medicamento) o paracetamol, é o medicamento não sujeito a receita médica mais vendido em Portugal.

2.2.1. Características físico-químicas

O paracetamol quimicamente designado por N-(4-hidroxifenil)acetamida ou 4-Hidroxiacetanilida, tem como fórmula molecular $C_8H_9NO_2$ e massa molar correspondente 151.2 g/mol, a sua estrutura encontra-se representada na Figura 2.1^[7].

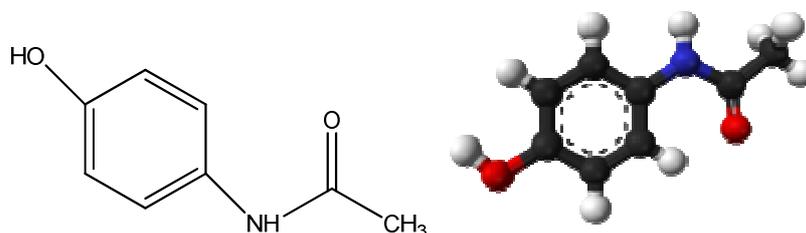


Figura 2.1 - Estrutura química do paracetamol (N-(4-Hidroxifenil)acetamida).

O paracetamol apresenta-se como um pó cristalino branco, com um ligeiro sabor amargo e inodoro e ponto de fusão entre 169-170.5°C sendo quimicamente estável a 200°C [8]. O paracetamol é solúvel em 1:70 partes de água (temperatura ambiente) e em 1:20 partes de água em ebulição. No entanto, encontra-se igualmente descrito na bibliografia que a solubilidade aquosa do paracetamol é de 14.7mg/ml (20°C), 14.3 mg/ml (25°C) e 23.7 mg/ml (37°C) [9,10]. É solúvel em etanol, metanol, solução de hidróxido de sódio 1N, dimetilformamida, dicloroetano, acetato de etilo e acetona. É ligeiramente solúvel em diclorometano e éter e praticamente insolúvel em pentano e benzeno [7,11].

A molécula de paracetamol caracteriza-se por apresentar um pK_a de 9.51 a 25°C e um coeficiente de partilha Log P (octanol/água) de 0.5 [11].

Foram isoladas e caracterizadas 3 formas metastáveis de paracetamol. O acetaminofeno ortorrômbico (forma II), é adequado para compressão directa e pode ser ligeiramente mais solúvel, contudo tem sido cristalizado apenas em pequenas quantidades. A única forma comercialmente disponível é o acetaminofeno monoclinico (forma I), caracterizado por ser a forma termodinamicamente mais estável [4,5,10,12].

Numa solução aquosa saturada o pH do paracetamol encontra-se entre 5.5 e 6.5. A solução aquosa saturada é estável, durante vinte anos, embora a sua estabilidade vá diminuindo em condições ácidas ou alcalinas, uma vez que o paracetamol vai sendo lentamente transformado em ácido acético e p-aminofenol [6]. Sob condições de alta temperatura e pH, o paracetamol sofre hidrólise originando o 4-aminofenol e ácido acético como produtos de degradação [3].

No que respeita à estabilidade o acetaminofeno deve ser armazenado em recipientes fechados de forma hermética, para que

desta forma se encontre protegido da luz, calor e humidade. No estado puro, é estável a temperaturas inferiores a 45°C [7].

A determinação do paracetamol em produtos farmacêuticos, quer isolado ou em combinações, é de grande importância sendo, para tal, propostos diversos métodos analíticos para a sua quantificação, como, espectroscopia de fluorescência, colorimetria, absorção Ultravioleta-Visível (UV-Vis), voltametria, sistemas de injeção em fluxo com detecção colorimétrica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, análise electroquímica, espectrometria de massa, cromatografia gasosa, electroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) entre outros [3,13]. Contudo a Farmacopeia Americana (USP) sugere para análise do paracetamol em pó, o método de espectrofotometria de absorção UV/vis e para todas as outras preparações HPLC. A Farmacopeia Britânica apresenta vários procedimentos analíticos para o doseamento do paracetamol quer em pó ou noutras formas farmacêuticas como a titulação com sulfato de cério, espectrofotometria de absorção UV/vis e HPLC [14].

2.2.2. Propriedades farmacológicas

Dentro das propriedades farmacológicas mais relevantes ao nível da indústria farmacêutica enquadram-se a farmacocinética e as respectivas indicações farmacêuticas, que resultam do estudo do desempenho *in vitro* e/ou *in vivo* da respectiva formulação.

2.2.2.1. Indicações terapêuticas

O paracetamol é o medicamento anti-inflamatório não esteroide (AINES) mais usado para no tratamento da dor e no alívio da febre em todo o mundo, ocupando desta forma, uma posição única dentro dos medicamentos analgésicos [3]. Ele é indicado no tratamento

sintomático de situações clínicas que requerem um analgésico e/ou antipirético, como, síndromes gripais, ou outras hipertermias infecciosas, reacções hipergénicas da vacinação, cefaleias, enxaquecas, dores de dentes, ouvidos, menstruais, traumáticas, musculares e articulares e como analgésico antes e após intervenções cirúrgicas. A maior vantagem do paracetamol é não apresentar efeitos secundários graves, sendo muito bem tolerado quando administrado nas doses terapêuticas recomendadas.

Embora o paracetamol seja usado clinicamente à mais de um século, o seu modo de acção tem sido um mistério. Como o paracetamol apresenta efeito analgésico e antipirético e não apresenta actividade anti-inflamatória, durante muito tempo se pensou que a sua acção analgésica fosse atribuída à inibição da síntese da prostaglandina (composto relacionado com os processos febris e da dor) no sistema nervoso central^[15] mas recentemente foi descoberto que o seu efeito analgésico é devido à activação indirecta dos receptores canabinóides CB₁^[14].

2.2.2.2. Farmacocinética

Para que um medicamento actue é necessário que atinja concentrações eficazes no seu local de acção, que, geralmente é longe do ponto de aplicação do fármaco, ou seja, o fármaco tem de ser absorvido e distribuído pelo sangue dos tecidos onde vai actuar. Entretanto, vai sendo metabolizado e eliminado. À absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos fármacos denomina-se farmacocinética. Para que um fármaco tenha efeito terapêutico, deve possuir características farmacocinéticas adequadas.

Após administração oral, a absorção do paracetamol é rápida e completa. Esta é essencialmente realizada através do tracto gastrointestinal, atingindo, após 10 a 60 minutos, concentrações plasmáticas máximas, dependendo das suas formulações. O

metabolismo do paracetamol ocorre essencialmente por três vias: conjugação com ácido glucurónico, conjugação com o ião sulfonato ou via citocromo P450 (complexo enzimático localizado maioritariamente a nível hepático, responsável pela metabolização de muitos medicamentos). As duas primeiras vias são responsáveis por cerca de 90% do metabolismo e a terceira via por cerca de 5%. Os metabolitos farmacologicamente inactivados são excretados via renal sendo apenas excretados 4% inalterados. Pequenas quantidades de metabolitos tóxicos são produzidas o p-aminofenol (via N-hidroxilação) e N-acetil-p-benzoquinona^[16].

Os efeitos hepatotóxicos¹ do paracetamol são causados por um metabolito alquilado menor, a imina N-acetil-p-benzoquinona (NAPQI) que resulta da acção das duas isoenzimas do citocromo P450 no fígado e no rim^[17]. A quantidade de imina N-acetil-p-benzoquinona produzida depois de uma dose normal de paracetamol vai ser completamente eliminada pelos rins após conjugação com a glutatona. Quando ocorre sobredosagem as vias de glucuronidação e sulfonação ficam saturadas, podendo originar danos hepáticos^[5].

A semi-vida de eliminação² do paracetamol varia entre uma a três horas. Geralmente dentro de vinte e quatro horas a sua excreção é completa. A semi-vida do paracetamol é prolongada quando existe insuficiência hepática ou renal, em caso de sobredosagem e em recém-nascidos. O efeito máximo e a duração de acção média deste composto estão em parte relacionados com a concentração plasmática^[18].

2.2.2.3. Dosagem e administração

O paracetamol deve ser administrado tendo em conta o peso corporal e idade do doente e a situação clínica para que é pretendido.

¹ Substâncias que são tóxicas para o fígado.

² Tempo necessário para eliminar metade da concentração da substância activa.

A dose única recomendada é 10-15 mg de paracetamol por kg de peso corporal e a dose diária total é 50mg/kg de peso corporal. A administração pode ser repetida em intervalos de quatro a oito horas, ou seja, três a quatro doses únicas diárias. Por exemplo, num adulto a dose máxima diária recomendada é 4000mg de paracetamol e numa criança até 12 anos é 2000mg. Em indivíduos com insuficiência hepática ou renal ou com a doença de *Gilbert* a dose de paracetamol deve ser reduzida ou administrada em intervalos mais alargados ^[19].

Os comprimidos podem ser tomados inteiros ou desfeitos na água e deve-se ter em conta que a sua administração após as refeições pode retardar o seu efeito. Os xaropes são medicamentos prontos a usar e podem ser tomados com as refeições, a administração de alimentos não demonstrou ter qualquer influência sobre o efeito do medicamento ^[19].

2.3. Solubilidade

A determinação da solubilidade de um novo fármaco em meio aquoso é de extrema importância, pois o sólido deve dissolver-se nos fluidos aquosos do tracto gastrointestinal para que possa ocorrer absorção deste.

É importante conhecer a solubilidade dos fármacos em toda a gama de pHs fisiológicos, normalmente limitada entre pH 1 e 8 já que a velocidade de dissolução dos fármacos a nível do tracto gastrointestinal pode também influenciar a velocidade e extensão da absorção ^[20].

Dado que a velocidade de dissolução de um fármaco depende da sua solubilidade no meio em causa, esta influencia a absorção,

principalmente quando o soluto é pouco solúvel. Contudo, este pressuposto não pode ser aplicado de modo indiscriminado, uma vez que se deve considerar também a dose de fármaco a administrar e a sua estabilidade ao nível do fluido gastrointestinal. Deste modo, em alguns casos, se a solubilidade de um fármaco for inferior à concentração necessária para a dose recomendada, deve recorrer-se a técnicas para melhorar a sua solubilidade ^[20].

A determinação da solubilidade de um fármaco pode ser realizada através de diversos métodos consoante se quer um resultado quantitativo ou semi-quantitativo, ou consoante a quantidade de fármaco disponível para o ensaio.

Uma determinação semi-quantitativa da solubilidade pode ser efectuada adicionando pequenas porções de soluto a um volume fixo de solvente, seguido de forte agitação e examinação visual de partículas não dissolvidas. Quando uma parte fica por dissolver, a quantidade de soluto adicionada até àquele ponto serve como um indicador da solubilidade. Outra técnica consiste em colocar um excesso de soluto num solvente, sob agitação, sendo retiradas e filtradas amostras a intervalos de tempo regulares. A concentração vai ser determinada por método apropriado. A amostragem continua até se obter dois valores consecutivos semelhantes ^[21], que serão, então, tidos como o valor da solubilidade.

No entanto, quando já existe na literatura informação acerca da solubilidade do fármaco que se pretende estudar, pode recorrer-se a técnicas menos laboriosas. Uma delas consiste em colocar excesso de fármaco (de acordo com a informação bibliográfica) em volume fixo de solvente. A metodologia utilizada consiste habitualmente em agitação durante sete dias (normalmente vinte e quatro horas são

suficientes para atingir o valor de solubilidade), seguida de repouso por doze horas³.

Normalmente, considera-se que se um composto apresenta solubilidade aquosa superior a 1% (massa/volume) provavelmente não vai apresentar problemas de absorção relacionados com a dissolução^[21].

A determinação da solubilidade é então um ensaio importante que pode ajudar a nível da formulação e na determinação das condições de armazenamento do fármaco.

2.4. Métodos instrumentais de análise

Os métodos analíticos tem uma vasta aplicação e importância na nossa sociedade, pois com eles é possível verificar a especificidade, diagnosticar e controlar processos, garantir a qualidade de bens produzidos ao nível industrial e na prestação de serviços, diagnosticar e rastrear anomalias, identificar causas e responder a diversos fenómenos.

Um método analítico é um conjunto de procedimentos que envolvem técnicas laboratoriais, criteriosamente desenvolvidos, planeados e sistematizados, visando quantificar com rigor um determinado analito numa determinada matriz a um certo nível de concentração. Para cumprir tal objectivo, o método tem que apresentar certos requisitos como ser fiável, acessível e adequado ao analito na matriz ao nível de concentração pretendida.

No presente trabalho destacam-se dois métodos, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível (que é usado no estudo de solubilidade do paracetamol) e cromatografia líquida de

³ A solubilidade é determinada após filtração das soluções seguida de diluição conveniente e quantificação por método mais apropriado.

alta eficiência (HPLC – usado no doseamento do princípio activo e conservantes da formulação em estudo).

2.4.1. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível

A espectrofotometria no ultravioleta e visível é um dos métodos analíticos mais usados em determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, no doseamento e identificação do princípio activo em fármacos.

A absorção na região visível e ultravioleta depende do número e do arranjo dos electrões nas moléculas ou dos iões absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está a ser estudada.

O aspecto mais importante no cálculo quântico é a determinação da quantidade da luz absorvida pela amostra, que está baseada na medida de transmitância (T) ou absorvância (A). Esta medida é descrita pela lei de Beer- Lambert (equação 2.1), que dá a relação entre a intensidade da luz monocromática incidente na solução (I_0) e a intensidade da luz monocromática transmitida (I).

$$A = \epsilon cb = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

Sendo c a concentração do analito (moles por litro, M), b o percurso óptico (expresso em centímetros, cm) e ϵ o valor da absorvidade molar do analito (expresso em $M^{-1}cm^{-1}$).

2.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A separação de substâncias pode ser realizada por diversos métodos que se baseiam nas suas diferentes propriedades físico-químicas. É um método físico-químico de resolução de componentes

de misturas que depende da diferença entre o comportamento dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com as duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iónica, bipolar, apolar, e efeitos de afinidade e solubilidade específicos.

A cromatografia é um poderoso método de separação com aplicação em todos os ramos da ciência que abrange um diversificado e importante conjunto de métodos que possibilitam a separação de componentes muito semelhantes de misturas complexas que com outros métodos seria impossível. Foi inventada e denominada pelo botânico russo Mikhail Tswett no início do século XX.

Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma “fase móvel”, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido super crítico. Esta é obrigada a passar através de uma “fase estacionária” imiscível fixa, colocada na coluna ou superfície sólida. Na escolha das duas fases, o objectivo é que as mesmas permitam que os componentes da amostra se distribuam em ambas com diferentes graus, garantindo, deste modo, a separação das substâncias. A separação ocorre em forma de bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente.

Um equipamento de HPLC é constituído por um sistema de bomba, um injector, uma coluna cromatográfica (eventualmente termostataada), um detector e um sistema de obtenção de dados (um integrador ou um registador). A fase móvel que sai de um ou vários reservatórios, circula através da coluna, em geral, a fluxo constante, chegando em seguida ao detector.

Quando um detector que responde à concentração do soluto for colocado no fim da coluna e o seu sinal for representado num gráfico em função do tempo (ou do volume de fase móvel adicionada), obtém-se uma série de sinais. Este gráfico designa-se cromatograma e fornece informações úteis para análise qualitativa e quantitativa. As

posições dos sinais no eixo do tempo podem identificar os componentes da amostra. As áreas sob os sinais dão uma medida quantitativa de cada componente da amostra (por comparação da altura ou da área do pico obtido com o analito com a de um ou mais padrões)⁴.

A cromatografia líquida de alta eficiência é bastante aplicada, na indústria, nomeadamente na farmacêutica, e em investigação devido à sua sensibilidade (desde 10^{-6} ppm), fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequabilidade à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, principalmente, à sua ampla aplicabilidade a uma vasta gama de substâncias.

2.5. Tratamento estatístico de dados

A estatística é uma ferramenta fundamental na análise qualitativa e quantitativa de um analito numa certa matriz. As medidas são inerentemente variadas ^[25], isto é, os dados analíticos obtidos apresentam variações em torno de um valor central, regra geral, mais frequente. No entanto, a distribuição normal dos dados pode ser assumida na grande maioria dos resultados de análise físico-química.

2.5.1. Desvio padrão

O desvio padrão é um importante parâmetro para descrever a largura da distribuição normal, isto é, o grau de dispersão dos dados. Este parâmetro corresponde à distância horizontal entre o vértice e o

⁴ Idealmente, um cromatograma apresenta-se como uma sequência de picos gaussianos sobre uma linha da base.

ponto da inflexão da curva Gaussiana. O desvio padrão (σ_x) traduz-se pela equação 2.2.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (2.2)$$

onde σ_x é um estimador da dispersão da distribuição, N o número de observações, x_i valor obtido e \bar{x} valor médio obtido.

Quando a dimensão da amostra é pequena ($N < 30$) o desvio padrão apresenta tendencialmente valores por defeito, como tal deve ser efectuada uma correcção atendendo ao número de graus de liberdade da amostra. Esta correcção é feita através da estimativa do desvio padrão (s_x), determinado pela equação 2.3.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (2.3)$$

Na indústria farmacêutica as séries de dados geralmente disponíveis, são pequenas e variam pouco extensamente dentro da escala teórica possível da população inteira e quanto menor for o número de dados, mais elevada é a variabilidade do desvio padrão calculado. Quanto mais dados são usados para calcular o desvio padrão, mais a distribuição se torna mais estreita e simétrica.

Geralmente, a variabilidade analítica é exposta como um desvio padrão relativo (RSD) ou Coeficiente de variação (CV, %), isto é, o desvio padrão dividido pela média respectiva. Esta normalização permite uma comparação directa das precisões.

2.5.2. Intervalo de confiança

Na ausência de erro sistemático e assumindo que as estimativas efectuadas são não-tendenciosas, espera-se que os valores obtidos no método de análise se encontrem próximos do valor

correcto contudo, este nunca poderá ser um valor exacto devido à contribuição do erro aleatório.

As estimativas podem ser:

- a) Pontuais - expressa através de um único valor numérico;
- b) Por intervalos - estimativa dada por um conjunto de dois valores limites no qual o parâmetro estimado tem grande probabilidade de estar localizado.

Contudo, devido essencialmente a erros de quantificação como também à falta de homogeneidade /representatividade da amostra não faz sentido exprimir a estimativa através de uma valor pontual mas sim através de um intervalo de confiança que abranja, com certo grau de confiança, o verdadeiro valor esperado.

Na ausência de erro sistemático, a amostragem de uma determinada população normal ($x \sim N[\mu, \sigma^2]$) conduz à estimativa

$$x \sim N[\bar{x}, s^2]$$

Para exprimir os resultados teríamos de indicar a gama de valores que cobre o “grosso” da distribuição – por exemplo os percentis $P_{0.025}$ e $P_{0.975}$ (percentis entre 0.025 e 0.975) permitem definir o intervalo de confiança central dos valores da distribuição ao nível de 95%.

Caso a dispersão seja expressa pelo desvio padrão (s), o resultado também pode ser expresso em termos de uma estimativa central e o respectivo intervalo de confiança onde se localizam os valores de população inicial é dado por:

$$E[x] \sim \bar{x} \pm z_c \times s_x$$

Onde o multiplicador z_c exprime um factor de cobertura da distribuição identificada e que permite associar uma certa probabilidade de encontrar o valor central da população original (μ) dentro desse intervalo de cobertura.

2.5.3. Testes estatísticos

Os testes estatísticos são baseados nos conceitos estatísticos referidos anteriormente. O procedimento geral para executá-los é descrito em seguida.

2.5.3.1. Teste de hipóteses e de significância

Devido ao pequeno número de dados normalmente usados em análise farmacêutica, intervalos de confiança largos podem obscurecer diferenças inaceitáveis. Por outro lado, devido a pequenas anomalias que ocorrem por vezes, nas séries analíticas, as diferenças são identificadas como significantes, o que não apresenta qualquer relevância prática.

A componente aleatória intrinsecamente envolvida implica sempre a possibilidade de se cometer um erro de juízo. Atendendo à forma como estes se desviam em relação ao valor tomado como correcto, os erros estatísticos podem ser classificados em erros por excesso e erros por defeito. Os erros por excesso correspondem a uma falsa rejeição → erro do tipo I (α) – a hipótese nula estava correcta e foi abusivamente rejeitada por ter sido considerada falsa. Os erros por defeito referem-se a uma falsa aceitação → erro do tipo II (β) – a hipótese nula estava errada e foi abusivamente aceite como verdadeira.

O *nível de significância* de teste, designada por α , (frequentemente expresso sob a forma percentual $100\%.\alpha$) corresponde à probabilidade máxima com que se pretende proceder à rejeição abusiva (erro tipo I). A probabilidade de aceitação de hipótese correcta designa – se de *nível de confiança* e corresponde à probabilidade de $(1-\alpha)$ (em termos percentuais $100(1-\alpha)\%$).

Na formulação de hipóteses estatísticas, a hipótese nula (H_0) vai no sentido de não haver diferença significativa, isto é, de pertencer ao grosso da distribuição também designado de $(1 - \alpha)$; a hipótese alternativa (H_1) encontra-se direccionada para a diferença significativa (α), o complemento da hipótese nula.

2.5.3.2. Procedimento

Os testes estatísticos constituem uma ferramenta para, com critérios estatísticos, auxiliar na tomada de decisões na interpretação de resultados. Cada teste estatístico depende do nível de confiança para o qual as conclusões são desejadas assim como do número de graus de liberdade para essas circunstâncias.

Os testes estatísticos devem ser efectuados com base num procedimento lógico que passa pelos seguintes passos:

1. Formulação do problema: Deve-se realizar uma análise do evento de forma a racionalizar a questão e poder testar.
2. Escolha do teste: O teste é escolhido de acordo com o objectivo pretendido, ou seja, com base na distribuição estatística que melhor se adequa⁵.
3. Nível de significância: Nível com o qual se pretende obter conclusões. Deve ser estabelecido previamente – previsão do erro máximo admissível para se tirar conclusões erradas por rejeição abusiva (α). Regra geral o nível de significância refere-se a $\alpha = 0.05$ podendo também ser reduzido para $\alpha = 0.01$ para serem tiradas conclusões mais definitivas.
4. Hipóteses de trabalho: As hipóteses devem ser complementares e de forma a abranger o universo do

⁵ As distribuições estatísticas mais comuns para efectuar testes estatísticos são a normal, *t – student*, *F-Fisher* e qui-quadrado.

evento. A hipótese nula (H_0) deve ser formulada no sentido de não haver diferença (está tudo correcto, dentro do IC da estimativa, $(1 - \alpha)$). A hipótese alternativa (H_1) incide sobre a diferença significativa (não está conforme, fora do IC da estimativa (α)).

5. Simetria do teste: Esta depende do modo como as hipóteses foram formuladas. Se o que se pretende é um teste de desigualdade (superior a ou inferior a), apenas se está interessado em considerar um extremo da distribuição como referencia e por isso o teste estatístico tem uma simetria unilateral. Pelo contrário, se o que se pretende é um teste de igualdade, ou seja, comparar a parte central da distribuição com determinada estimativa, agora o teste estatístico apresenta uma simetria bilateral.
6. Cálculo do teste: Calcula-se com base na expressão da distribuição estatística correspondente.
7. Comparação com valores críticos (X_{crit}): Os valores críticos estão tabelados de acordo com o nível de significância e com o número de graus de liberdade. Estes valores permitem definir as regiões de aceitação e de rejeição das hipóteses formuladas.
8. Conclusão: No caso do valor experimental ultrapassar os limites tabelados (região de rejeição) diz-se que, ao nível de confiança $100(1 - \alpha)\%$ há diferença significativa e a hipótese nula deve ser rejeitada em detrimento da hipótese alternativa; caso contrário, não existe evidência estatística para rejeitar a hipótese nula. Os testes estatísticos podem ser efectuados a diferentes níveis de significância. As normas ISO recomendam testes de significância aos níveis de 5% ($\alpha=0.05$, probabilidade de efectuar 1 insucesso em

cada 20 decisões) e 1% ($\alpha=0.01$, probabilidade de taxa de insucesso de 1/100).

2.5.4. Análise de variância

A análise de variância (ANOVA)⁶ é uma ferramenta que permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatórias e a contribuição sistemática entre amostras. Ou seja, permite verificar se as amostras exercem um efeito significativo fazendo com que estas se sobreponham à componente aleatória contribuindo para diferenças significativas entre si.

Se o factor em estudo (factor A) não influi de modo significativo, ambas as dispersões são estimativas da variância da componente aleatória. Já se o factor influi de modo significativo, a dispersão devida ao factor A (s_A) torna-se maior que a componente puramente aleatória (s_0).

A comparação das dispersões é conseguida através do teste F (equação 2.4)

$$F = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{0.05(n-1, n(m-1))} \quad (2.4)$$

onde n e m representam o número de níveis de factor e o número de réplicas em cada nível, respectivamente.

Caso o valor do teste calculado não exceda o respectivo valor crítico previsto para o nível de confiança de 95%, a hipótese nula pode ser assumida como verdadeira. Se este valor ultrapassar o valor crítico ao nível de confiança de 95% mas não exceder o valor crítico para o nível de confiança de 99% a hipótese nula é dúbia. Caso o valor exceda o respectivo valor crítico previsto para o nível de confiança de 99% a hipótese nula é rejeitada e a hipótese um é aceite.

⁶ A sigla ANOVA provém do inglês, Analysis Of Variance.

2.5. Validação de métodos analíticos

Actualmente, pretende-se que todos os caminhos levem à busca da qualidade total, tornando-se desta forma, indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. Neste caso, a validação de um método analítico é uma ferramenta adequada que verifica a garantia de qualidade operacional e o desempenho analítico. Através deste processo pode-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise de um determinado analito numa certa matriz a um determinado nível de concentração, levando a resultados fiáveis, com boa exactidão e precisão, pois o objectivo da validação é demonstrar que o método é adequado para o fim pretendido ^[22].

Na indústria farmacêutica, a fiabilidade dos resultados analíticos são cruciais para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos fármacos. Por este motivo, exigências reguladoras foram publicadas por muitos anos. A Conferência Internacional sobre a Harmonização (ICH) de exigências técnicas para o registo dos fármacos para o uso humano foi iniciado em 1990, como um fórum para um diálogo construtivo entre autoridades reguladoras e indústria, a fim de harmonizar as exigências da submissão para fármacos novos entre a Europa, os Estados Unidos da América e Japão. Um dos primeiros tópicos dentro da secção da qualidade foi a validação analítica e a ICH foi muito útil nos termos da harmonização e nas definições ^[22] assim como na determinação das exigências básicas ^[23].

A validação embora possa ser uma actividade algo complexa e exigente, é necessária, pois as consequências de um método não validado traduzem-se num desperdício de tempo, dinheiro e recursos,

pois os resultados obtidos não apresentam fiabilidade. A validação é um processo moroso mas vital na garantia de qualidade analítica de um processo analítico desenvolvido. Não deve ser considerada como uma actividade singular, mas deve ser sempre compreendida no que diz respeito ao ciclo de vida do procedimento analítico. Iniciando-se com o desenvolvimento ou a optimização do método, o desempenho do procedimento analítico deve ser combinado com exigências num processo interactivo.

Segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025 o laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de aplicação e extensões ou modificações de métodos normalizados ^[24].

Para satisfazer as necessidades de uma dada aplicação ou campo de aplicação, a validação deve ser tão exhaustiva quanto necessário. O laboratório deve registar os resultados obtidos, o procedimento utilizado para a validação e uma declaração quanto é adequação do método para o uso pretendido. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido ^[25].

Antes de se iniciar o processo de validação de um determinado método analítico deve-se ponderar sobre o âmbito de aplicação pretendido e quais os critérios de validação que é necessário demonstrar. Algumas das questões mais relevantes deste processo passam por reflectir sobre o analito que se pretende determinar, os níveis de concentração esperados, o tipo de matriz envolvida e se se

pretende no final uma informação apenas qualitativa⁷ ou quantitativa, correspondendo à estimativa do seu teor.

Devido a variedade de ensaios analíticos vamos ter diferentes métodos que necessitam de diferentes programas de validação. A tabela 2.1 descreve os parâmetros a determinar, consoante o âmbito de análise a realizar [26].

Tabela 2.1 -Exigências de validação dos métodos analíticos de acordo com a ICH.

Parâmetros de desempenho	Métodos Analíticos				
	Doseamento	Pesquisa de impurezas		Características de desempenho	Identificação
		Quantitativo	Limites		
Exactidão	+	+	-	+(4)	-
Repetibilidade	+	+	-	+(4)	-
Precisão intermédia	+(1)	+(1)	-	+(4)	-
Especificidade (2)	+	+	+	+(4)	+
Limite de detecção	-	-	+	-	-
Limite de quantificação	-	+	-	-	-
Linearidade	+	+	-	-	-
Gama de trabalho	+	+	-	-	-
Coerência	+	+	+	+	-
Robustez	+	+	-(3)	+(4)	-

(-) Característica normalmente não avaliada; (+) Característica normalmente avaliada; (1) Nos casos em que a reprodutibilidade foi avaliada, não é necessário determinar a precisão intermédia; (2) A ausência de especificidade de um método analítico pode ser compensada por outro método analítico de suporte; (3) Pode ser necessário em alguns casos. (4) Pode não ser necessária em alguns casos.

A validação de um método analítico garante e confere confiança ao processo de quantificação do analito numa determinada matriz a um certo nível de concentração. De acordo com a USP os parâmetros analíticos usados para a validação de um método analítico são:

⁷ (presente / ausente, correcto / incorrecto,...)

1. Especificidade e selectividade
2. Gama de trabalho
3. Linearidade
4. Limiares analíticos (limite de decisão, limite de detecção e limite de quantificação)
5. Sensibilidade
6. Precisão
7. Exactidão
8. Robustez
9. Coerência

Quando ocorrem alterações no procedimento analítico, as mudanças podem conduzir à necessidade de revalidação do procedimento analítico. Esta revalidação deve ser desenvolvida para garantir que o procedimento analítico mantém as suas características e para demonstrar que continua a assegurar a identidade, qualidade, potência da substância activa e do fármaco, e a biodisponibilidade. O grau da revalidação vai depender da natureza da mudança, por exemplo, quando um procedimento analítico regulador diferente é substituído, o novo procedimento deve ser validado ^[27].

2.6.1. Especificidade e selectividade

A selectividade e a especificidade são parâmetros que confirmam a confiança das medições na presença de interferências. Ambos estão relacionados com a capacidade de quantificar correctamente um determinado analito na presença de outras substâncias da matriz da amostra. Podem ser medidos como um tipo de erro sistemático devido à presença de interferentes, substâncias susceptíveis de originar desvios no valor instrumental referente ao analito, e assim provocar consequentemente desvios sistemáticos. Estes interferentes podem ser impurezas ou produtos de degradação.

Em HPLC estes parâmetros são avaliados geralmente através da capacidade de resolução cromatográfica, da eficiência da separação e do factor de assimetria.

A *especificidade* corresponde à capacidade de um método analítico determinar inequivocamente um analito na presença de outros componentes esperados na matriz, no caso de uma forma farmacêutica pode ser impurezas, produtos de desagregação e excipientes. Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias eventualmente presentes na matriz amostra a analisar, ou seja, quando se tem garantia que a grandeza medida provém apenas do analito.

O termo *selectividade* corresponde à capacidade de o método analítico responder preferencialmente a um determinado analito, ou seja, identificar e distinguir um analito numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes.

2.6.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais elevada determinadas experimentalmente com precisão, exactidão e linearidade. Normalmente, pretende-se que na gama de concentrações o sinal instrumental forneça uma resposta linear como também homogeneidade da variância na variável dependente. Estas concentrações são evidenciadas estatisticamente através da calibração analítica do método. Segundo a ICH, a especificação para o doseamento dum produto farmacêutico acabado, geralmente faz-se na gama analítica referente a 80 a 120% da concentração teste ^[28].

2.6.3. Linearidade

A linearidade de um método analítico revela a habilidade do método produzir resultados directamente proporcionais à concentração do analito numa dada faixa de aplicação. Ou seja, verificar se existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações dos padrões de calibração.

Em termos gráficos a linearidade do método pode ser comprovada através do coeficiente de determinação (R^2) da equação da recta de calibração obtida, que reflecte o grau de relação ou ligação entre as variáveis X (concentração) e Y (resposta), e considera-se o resultado conforme se o valor de R^2 for superior a 0,999 ^[29]. Estatisticamente a linearidade é verificada, usando o teste de Mandel.

2.6.3.1.Preparação da curva de calibração

Para garantir a rastreabilidade do processo utilizam-se, inicialmente, padrões de concentração conhecida de forma a testar a resposta do equipamento que fará a quantificação. Com a calibração pretende-se obter uma relação entre o padrão submetido e o correspondente sinal instrumental. A curva de calibração correcta deve apresentar os seguintes aspectos:

- i. o limite inferior é estimado com base na menor concentração capaz de originar um sinal estatisticamente distinto do branco. Após a determinação do limite de quantificação (X_{LQ}) deve-se sempre verificar se o menor padrão (X_1) excede esse valor ($X_1 \geq X_{LQ}$);
- ii. os padrões devem abranger a gama de concentrações das amostras. O ideal é que as amostras se situem próximo do centróide da curva de calibração;

- iii. a variância dos valores medidos deve ser constante uma vez que a introdução de pesos estatísticos implica um custo adicional no esforço da quantificação;
- iv. a gama de trabalho do método analítico é definida como amplitude de concentrações usadas para a definição de curva de calibração (X_1 e X_N).

A calibração é um processo crítico uma vez que dela depende a qualidade das estimativas da quantificação das amostras em termos de precisão e exactidão. Uma vez excluído o problema do erro sistemático cuja estatística não consegue tratar, tem que se ter em conta três passos fundamentais para obter uma curva de calibração correcta que irá condicionar a qualidade dos resultados estimados. Os três passos fundamentais são: representatividade dos valores na curva de calibração (homogeneidade da variância), escolha do modelo e detecção de eventuais valores discrepantes.

A análise da *homogeneidade das variâncias* para o sinal medido é realizada através do Teste Fisher (F) onde se compara as variâncias nos extremos do intervalo de calibração (equação 2.5).

$$F = \frac{s_1^2}{s_N^2} (s_1^2 > s_N^2) \quad (2.5)$$

De igual modo as hipóteses de trabalho a considerar são apenas duas: existe homogeneidade da variância (H0) ou não existe homogeneidade da variância (H1).

Para a escolha do modelo deve usar-se diagnósticos simples mas com fundamento estatístico, sendo o teste de Mandel geralmente mais usado. O passo inicial deste teste corresponde a ajustar um polinómio de primeiro grau (P1), bem como um polinómio de segundo

grau (P2) e calcular, para cada um deles, as respectivas somas de resíduos quadrados. Pretende verificar-se se o aumento na variância do ajuste causada pela eliminação de um parâmetro é equiparável à variância aleatória [*pure error*], para realizar tal verificação recorre-se à equação 2.6:

$$F = \frac{\Delta \sigma_{fit}^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(\Delta SS / \Delta \nu)}{\sigma_{pe}^2} \quad (2.6)$$

Se o valor de F calculado não exceder o valor de F tabelado ($F_{0,01}(\Delta \nu; \Delta pe)$, onde $\Delta \nu$ corresponde aos graus de liberdade que vai ser apenas um) a hipótese nula é aceite, o que corresponde a dizer que ambos os polinómios (primeiro e segundo graus) ajustam os pontos experimentais de modo similar, concluindo-se que o polinómio de primeiro grau é o mais adequado para curva de calibração, já que apresenta maior número de graus de liberdade. Caso o valor de F obtido ultrapassa este valor crítico a hipótese nula não seria válida (o polinómio de segundo grau conduzia a um melhor ajuste dos valores experimentais da curva de calibração), deve-se reduzir a gama de trabalho para se obter uma função de calibração linear, pois o tratamento estatístico do polinómio de segundo grau é bastante complexo (norma ISO 8466:2).

Os eventuais *outliers*⁸ presentes nos dados obtidos podem ser detectados de diferentes formas. Uma delas trata-se da regressão robusta que pode ser bastante eficaz na detecção de outliers já que é bastante insensível a este tipo de valores. Outras alternativas passam por realizar o teste F (de modo semelhante ao teste de Mandel), e /ou um teste do tipo t-student.

⁸ Valores discrepantes que se afastam dos valores previstos pelo modelo.

Os padrões da curva de calibração devem ser preparados com o máximo rigor analítico possível para que, desta forma, a sua fonte de erro associada seja desprezável quando comparada com o erro da variável dependente.

Os padrões a utilizar devem obedecer a determinadas condições:

- i. possuir elevada pureza e ausência de matriz;
- ii. possuir homogeneidade na sua composição;
- iii. ser representativo (propriedades físico-químicas similares aos analitos a utilizar);
- iv. apresentar elevada estabilidade;
- v. boas condições de armazenamento (padrão não deve ser afectado pelo recipiente nem pelas condições de armazenamento).

A ICH define um mínimo de cinco padrões para estabelecer a gama de linearidade, como 80% a 120% do teor da substância a quantificar ^[29].

2.6.4. Limiares analíticos

Os limiares analíticos especificam e definem os extremos inferior e superior da curva de calibração. Assim os extremos inferiores correspondem a concentrações que permitem saber quais as capacidades de detecção do respectivo método para esses níveis de concentração, temos os limites de decisão, de detecção e de quantificação.

Estes limiares analíticos podem ser estimados por três métodos distintos:

- i. através de réplicas do branco ($m_0 \geq 10$) (método recomendado pela IUPAC e ISO);
- ii. com base nos parâmetros da recta;

- iii. com base no desvio padrão do ajuste.

Deve-se estimar os limiares analíticos através das réplicas de branco de padrão. Não sendo possível desta forma ou se algum destes limites conduzir a uma concentração sem significado físico deve optar-se por utilizar os parâmetros da recta da calibração. Só em último caso deve ser utilizado o desvio padrão do ajuste para este objectivo. Os limiares são obtidos por transformação em concentração do sinal respectivo (função inversa da curva de calibração: $X_i = G(Y_i)$).

2.6.4.1 Limite de decisão

O limite de decisão (X_d) corresponde à menor concentração de analito que apresenta probabilidade de 5 % de que o respectivo sinal possa ser considerado como sendo o sinal do branco e 50 % de hipóteses de se tratar de facto do analito ($\alpha=0.05$ e $\beta=0.50$) e pode ser estimado a partir da equação 2.7.

$$X_d = G(\bar{y}_0 + t_{0,05(m_0-1)}^u \cdot \sigma_{\bar{y}_0}) \approx G(\bar{y}_0 + 1.65 \cdot \frac{s_{y_0}}{\sqrt{m_0}}) \quad (2.7)$$

Caso não seja possível obter valores de branco, este limite pode ser estimado através dos parâmetros da calibração linear, através da equação 2.8.

$$X_d = G(b_0 + t_{0,05(m_0-1)}^u \cdot \sigma(b_0)) \approx G(b_0 + 1.65 \cdot \sigma(b_0)) \quad (2.8)$$

Pela equação 2.9 podemos determinar este limiar pelo desvio padrão de ajuste:

$$X_d = G(t_{0,05(n-p)}^u \cdot \sigma_{fit}) \approx G(1.65 \sigma_{fit}) \quad (2.9)$$

2.6.4.2. Limite de detecção

O limite de detecção (X_{LD}) corresponde á menor quantidade de analito que é possível detectar com uma certa confiança estatística, mas não necessariamente quantificar. Esta concentração é útil para especificar a presença/ausência do analito da amostra. Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco. A quantificação deste valor de concentração está sujeita a erros significativos: probabilidade de 5 % de ocorrerem erros tipo I (falsa detecção, $\alpha=0.05$) e de 5 % de ocorrerem erros tipo II (falsa não detecção, $\beta=0.05$).

O limite de detecção pode ser calculado através de: Réplicas de brancos ($m_0 \geq 10$), pela equação 2.10, onde se faz uma estimativa do valor médio do sinal do branco (\bar{y}_0) e respectivo desvio padrão (S_{y_0}):

$$X_{LD} = G(\bar{y}_0 + 2t_{0,05(m_0-1)}^u \cdot \frac{S_{y_0}}{\sqrt{m_0}}) \quad (2.10)$$

Pode também ser determinado a partir da equação 2.11 através da equação da curva de calibração, recorrendo ao valor de intercepção da recta e respectiva incerteza:

$$X_{LD} = G(b_0 + 2 \cdot t_{0,05(m_0-1)}^u \cdot \sigma(b_0)) = G(b_0 + 3.3\sigma(b_0)) \quad (2.11)$$

Pela estimativa com base no desvio padrão residual (σ_{fit}) do ajuste da curva de calibração através de mínimos quadrados e a sensibilidade, o limite de detecção é determinado pela equação 2.12:

$$X_{LD} = 3.3 \times \left(\frac{\sigma_{fit}}{dY/dX} \right) \quad (2.12)$$

Por último, o limite de detecção pode ser determinado através do quociente sinal/ruído da linha de base: concentração que corresponde a um sinal proporcional a um determinado factor do quociente sinal/ruído. A determinação desta razão é realizada por comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se assim a concentração mínima onde o analito pode ser detectado. A razão sinal/ruído com valor 3:1 é geralmente aceite para estimar o limite de detecção.

2.6.4.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação (X_{LQ}) corresponde à menor concentração de analito que é possível quantificar com precisão e exactidão definidas e nas condições de operação especificadas.

Este limiar analítico pode ser estimado com base em:

Réplicas de brancos ($m_0 \geq 10$) através de equação 2.13: concentração de analito capaz de originar um sinal equivalente a,

$$X_{LQ} = G(\bar{y}_0 + 10S_{y_0}) \quad (2.13)$$

Onde \bar{y}_0 , é a média do sinal medido para uma serie de brancos, preparados de forma independente e S_{y_0} é o desvio padrão associado a Y_0 .

Através da equação da curva de calibração: Estimativa com base no desvio padrão residual (σ_{fit}) do ajuste da curva de calibração através de mínimos quadrados e a sensibilidade. A determinação do limite de quantificação por esta via é obtida através da equação 2.14.

$$X_{LQ} = 10 \times \frac{\sigma_{fit}}{\left(\frac{dY}{dX}\right)} \quad (2.14)$$

E finalmente pelo quociente sinal/ruído da linha de base: concentração que corresponde a um sinal proporcional a um determinado factor do quociente sinal/ruído. A razão sinal/ruído típica segundo a ICH é 10:1.

Deve se ter em conta possíveis oscilações isoladas do sinal medido que podem corresponder a valores já significativos e que podem ser proveniente de contaminações.

Os limites de detecção e quantificação calculados devem ser sempre confirmados analisando um número apropriado de amostras que contenham o analito nas concentrações correspondentes e com a leitura de padrões com as concentrações encontradas.

2.6.5. Sensibilidade

A sensibilidade é definida como o menor incremento de concentração (ΔX) necessário para originar uma variação detectável no valor do sinal lido (ΔY) coincidindo esta com o declive da recta de calibração quando se trata do modelo linear (polinómio de primeiro grau) como se pode ver pela equação 2.15.

$$E = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad (2.15)$$

2.6.6. Precisão

A precisão do método analítico expressa o grau de concordância dos resultados entre ensaios independentes sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Pode ser determinada recorrendo a estimativas paramétricas como:

1. Desvio padrão dos resultados (s), determinado pela equação 2.16:

$$s = \sqrt{\frac{SS}{v}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (L_i - \bar{L})^2}{(n-1)}} \quad (2.16)$$

2. Coeficiente de variação (%CV), estimado pela equação 2.17:

$$\% CV = 100 \times \frac{s}{\bar{L}} \quad (2.17)$$

Onde s é o desvio padrão das recuperações e \bar{L} é a estimativa paramétrica central (média).

A ICH recomenda a determinação a três níveis de precisão: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

2.6.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade corresponde à precisão obtida para ensaios efectuados sobre a mesma amostra num curto intervalo de tempo e em condições tão homogéneas quanto possível (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes). Segundo a norma ISO 5725:1 devem se realizar no mínimo dez ensaios sobre uma mesma amostra ou padrão e repetir o procedimento para vários níveis de concentração dentro da zona de aplicação do método.

A repetibilidade é dada pelo desvio padrão s_r , associado à média dos resultados assim obtidos. O limite de repetibilidade (Δr) é o valor máximo permitido para a diferença absoluta entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, calculada para o nível de confiança a 95 %, sendo obtido através da equação 2.18.

$$\Delta r = \sqrt{2} \times t_{0.05(m-1)}^b \times \frac{s_r}{\sqrt{m}} \quad (2.18)$$

O coeficiente de variação de repetibilidade (% CV_r) dá informação acerca da ordem de grandeza relativa esperada para a imprecisão dos valores em condições de repetibilidade e é determinado a partir da equação 2.19.

$$\% CV_r = 100 \times \frac{s_r}{\bar{X}} \quad (2.19)$$

onde \bar{X} corresponde ao valor médio da gama analítica do método ou, alternativamente, ao nível de concentração a que se refere a estimativa. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 1.0%.

2.6.6.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia corresponde à precisão obtida nos ensaios sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente as condições que variam. Este tipo de estudo tem por objectivo avaliar a interferência que a mudança de determinadas condições intra-laboratoriais podem ter no resultado final (análises em dias diferentes, com diferentes operadores, etc).

Esta medida de imprecisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados do laboratório. Segundo a norma ISO 5725:3, a precisão intermédia pode ser avaliada de três formas distintas: através de cartas de controlo de amplitudes aplicadas a réplicas, a duplicados da amostra e a padrões, quando se realizam n ensaios sobre t amostras ou padrões ou quando se realizam n medições sobre uma mesma amostra, amostras supostamente idênticas ou o mesmo padrão.

De acordo com esta norma o método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação for inferior a 2.0 %.

2.6.6.3.Reprodutibilidade

Esta precisão é obtida quando se efectuam vários ensaios sobre a mesma amostra em diferentes laboratórios, com diferentes operadores, usando diferentes equipamentos e em períodos diferentes, ou seja, realizando estudos interlaboratoriais. Esta é uma medida de imprecisão global do método analítico pois é obtida através de resultados publicados por diversos laboratórios independentes que realizam esse mesmo método, em condições operacionais idênticas, efectuando análises sobre o mesmo conjunto de amostras.

2.6.7. Exactidão

A exactidão de um procedimento analítico expressa a proximidade entre a média de uma série de resultados de vários ensaios e um valor aceite como verdadeiro de um padrão de referência. Indica, desta forma, a capacidade do método analítico proporcionar resultados o mais próximo possível do valor aceite como verdadeiro.

A exactidão de um método, ou de um resultado, está condicionada pela existência de erros sistemáticos, erros que se manifestam sempre da mesma forma, para um dado conjunto de ensaios independentes. Os erros sistemáticos obedecem a causas determinadas e levam ao aparecimento de resultados significativamente afastados do seu valor verdadeiro. Este tipo de erros pode ser classificado em categorias: erros instrumentais (onde se encontram incluídas a má calibração do material e as avarias parciais do equipamento), erros operativos onde são incluídos alguns erros dos analistas e erros de método, associados a interferências de ordem variada, à existência de reacções secundárias no processo analítico. Os erros sistemáticos colocam em causa a veracidade do resultado experimental, provocando o seu afastamento relativamente

ao valor verdadeiro presente na amostra analisada. Este tipo de erro pode ser minimizado pela utilização de ensaios em branco e pela aplicação da mesma metodologia na preparação das soluções padrão de calibração.

Os testes estatísticos para diagnóstico do desempenho de exactidão do método são geralmente realizados em relação a:

- I. Erro absoluto (Δ): a variável normalizada deve apresentar uma distribuição *t-student* evidenciada pela equação 2.20.

$$t_{\text{exp}} = \frac{[\bar{x} - \tau]}{s_{\bar{x}}} \quad (2.20)$$

Onde \bar{x} corresponde à média dos dados obtidos, $s_{\bar{x}}$ ao desvio padrão associado à media e τ ao valor correcto. O valor correcto deve ser um valor certificado do MRC ou valor de referência de um ensaio.

Este teste permite verificar a exactidão por via interna, onde vamos ter as seguintes hipóteses de trabalho:

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0: \bar{x} \cong \tau \Rightarrow \text{Há concordância estatística dos valores} \\ H_1: \bar{x} \neq \tau \Rightarrow \text{Há diferença significativa entre os valores.} \end{array} \right.$$

A hipótese nula deve ser aceite se o valor calculado não exceder o valor previsto para a distribuição bilateral *t-student* ao nível de confiança a 99%. Caso contrário, estima-se o valor previsto com 95% de confiança. Se ainda o valor de teste for superior ao valor previsto com 95% de confiança, rejeita-se a hipótese nula e aceita-se a hipótese 1.

- II. Erro relativo (%RE): quociente entre o erro absoluto (Δ) e o valor correcto (τ);

O valor obtido através da equação 2.21 fornece indicação percentual do desvio obtido que serve como termo de avaliação e permite a comparação com outras situações.

$$\% RE = 100 \times \frac{(x_{lab} - \tau)}{\tau} = 100 \times \frac{\Delta}{\tau} \quad (2.21)$$

- III. Factor de desempenho (Z-score): Expressa-se em termos de variável reduzida e é estimado através da equação 2.22.

$$Z = \frac{(\bar{x}_{lab} - \tau)}{S} \quad (2.22)$$

Onde S representa a incerteza associada ao material certificado (MRC) ou o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial.

Segundo um protocolo com a AOAC, ISO e IUPAC se o factor de desempenho em módulo for menor ou igual a um, temos um bom desempenho, se for menor ou igual a dois temos desempenho satisfatório, caso se encontre entre dois e três temos desempenho questionável e por último se for superior ou igual a três temos mau desempenho do método.

- IV. Erro normalizado (En): O erro normalizado é estimado através da equação 2.23 onde U_{lab} corresponde à incerteza associada ao laboratório e U_{CRM} à incerteza associado ao valor de referência. Quando o valor de erro normalizado em absoluto é menor ou igual a 2 o ensaio realizado é satisfatório.

$$En = \frac{(x_{lab} - \tau)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{CRM}^2}} \quad (2.23)$$

- V. Testes de recuperação: Os testes de recuperação permitem avaliar a exactidão sem recorrer a materiais certificados, o que é uma excelente vantagem económica para o laboratório, usando somente soluções de padrão e amostras. Este tipo de teste permite testar a resposta na presença da própria matriz da amostra em causa, o que é bastante vantajoso pois não é comum haver materiais certificados com matrizes idênticas ou similares aquele que se está interessado.

Caso se represente a concentração recuperada em função da concentração adicionada obtém-se um gráfico com variação linear que pode ser ajustado por um polinómio de primeiro grau conhecido por função de recuperação (equação 2.24):

$$x_{rec} = a_f + b_f \times x_{add} \quad (2.24)$$

Com esta função podemos interpretar o tipo de erro sistemático cometido no método. Assim, a ordenada na origem (a) está relacionada com um erro sistemático constante e o declive (b) está relacionado com um erro sistemático proporcional.

2.6.8. Robustez

A robustez de um método é a capacidade do método exibir estabilidade ao longo do tempo e não ser afectado por pequenas variações nas condições de operação no laboratório. Os factores normalmente estudados são a estabilidade das soluções, o tempo de conservação da amostra, tempo de preparação e as condições experimentais do equipamento utilizado.

A robustez pode ser determinada através de um teste ao método em condições de precisão intermédia. Deve-se salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento quanto à sua precisão e maior insensibilidade (dependência) de factores experimentais deliberadamente alterados, o que é muito benéfico pois o método continua a conduzir a valores concordantes apesar das alterações realizadas.

2.6.9. Coerência

A coerência de um método analítico expressa a concordância de valores obtidos quando são introduzidas variações aleatórias nas condições experimentais do método.

De acordo com a USP este parâmetro pode ser medido através da reprodutibilidade dos resultados obtidos sob a variação de diferentes condições (diferenças dentro do laboratório, analistas, instrumentos, reagentes, períodos de trabalho).

2.6.10. Adequabilidade do sistema

Os testes de adequabilidade do sistema são uma parte de vários procedimentos analíticos e pretendem garantir que o sistema implementado é adequado para o tipo de análise que se pretende realizar e pode ser mantido em funcionamento sem perda das características analíticas. Estes testes são baseados no conceito de que o equipamento, operações analíticas e amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal ^[29].

2.6.11. Estabilidade das amostras

Para se obter resultados reprodutíveis e confiáveis durante o processo de validação a estabilidade das soluções amostra e padrões

deve ser determinada. Muitas vezes é essencial que as soluções sejam estáveis, para que desta forma, se ocorrer algum atraso durante o processo, isso não vá influenciar os resultados obtidos. A estabilidade das amostras bem como dos padrões deve ser testada durante um período de vinte e quatro horas no mínimo. O coeficiente de variação da razão das áreas das amostras obtido deve ser inferior a 2.0 % ^[29].

3.Secção Experimental

3. Secção experimental

3.1. Materiais e Equipamento

Nos materiais e equipamento são descritos e enumerados as matérias-primas utilizados na preparação da suspensão contendo paracetamol como também os reagentes para a análise da formulação.

3.1.1. Paracetamol

A substância activa, paracetamol, apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, ligeiramente solúvel em água e facilmente solúvel no álcool. É ligeiramente solúvel em água fria, solúvel em etanol, metanol, solução de hidróxido de sódio 1N, dimetilformamida, dicloroetano, acetato de etilo e acetona. É ligeiramente solúvel em diclorometano e éter e praticamente insolúvel em pentano e benzeno ^[7].

3.1.2. Ácido cítrico monohidratado

O ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, $M_w = 210.14 \text{ g.mol}^{-1}$ e $P > 99.5 \%$) apresenta-se na forma pó cristalino branco ou incolor, é inodoro e apresenta um forte sabor amargo. Numa solução aquosa a 1% (m/v) apresenta $pH=2.2$. Este composto apresenta densidade de 1.542 g.cm^{-3} e ponto de fusão de aproximadamente $100 \text{ }^\circ\text{C}$. É solúvel em álcool e água e pouco solúvel no éter. Na indústria

farmacêutica é usado essencialmente para ajustar o pH das soluções [30].

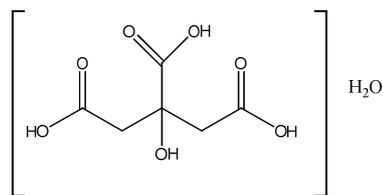


Figura 3.1 - Estrutura química do ácido cítrico monohidratado.

3.1.3. Citrato de sódio

O citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7$, $M_w = 258.07 \text{ g.mol}^{-1}$). Apresenta-se na forma cristalina incolor ou na forma de pó cristalino branco. É inodoro e apresenta sabor salgado. É solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol. É amplamente usado em formulações farmacêuticas, uma vez que actua como estabilizador, controlador de acidez, agente tamponizante e ainda tem função anticoagulante [30].

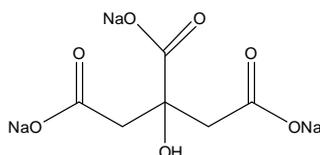


Figura 3.2 - Estrutura química do citrato de sódio.

3.1.4. Sacarose

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$ e $M_w = 342.30 \text{ g.mol}^{-1}$) é formada pela união de uma molécula de glicose e uma de frutose. É obtida através da cana-de-açúcar ou da beterraba, não contendo substâncias adicionadas. Apresenta-se na forma de cristais incolores ou como um pó branco cristalino, que é inodoro e de sabor doce. Na indústria

farmacêutica é usada em formulações orais, onde vai originar valor energético, desempenhando funções de edulcorante e de conservante, sendo também usado para aumentar a viscosidade da formulação [30].

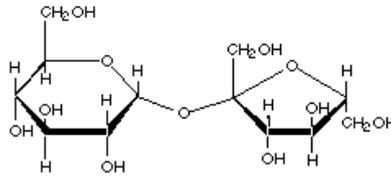


Figura 3.3 - Estrutura química sacarose.

3.1.5. Metilparabeno e Propilparabeno

O metilparabeno ($C_8H_8O_3$ e massa molar $152.15 \text{ g.mol}^{-1}$) apresenta-se como pó cristalino branco ou cristais incolores, é inodoro e o seu ponto de fusão encontra-se entre 125°C e 128°C . O propilparabeno ($C_{10}H_{12}O_3$ e massa molar correspondente $180.20 \text{ g.mol}^{-1}$) apresenta-se como um pó cristalino branco, inodoro e insípido. O ponto de fusão deste composto encontra-se compreendido entre 96 e 99°C . Ambos os compostos são pouco solúveis em água, facilmente solúveis em acetona, etanol e éter etílico.

O metil e o propilparabeno são usados como conservantes em produtos cosméticos, alimentares e farmacêuticos. Podem ser usados individualmente ou em conjunto com outro parabeno ou outro agente conservante. Os parabenos são eficazes numa ampla faixa de pH e apresentam uma ampla actividade antimicrobiana, embora sejam mais eficazes contra leveduras e bolores. A actividade antimicrobiana aumenta com o aumento da cadeia alquílica, mas em contrapartida diminui a solubilidade em meio aquoso; portanto, uma mistura de parabenos é usada frequentemente para fornecer uma conservação mais eficaz. [30].

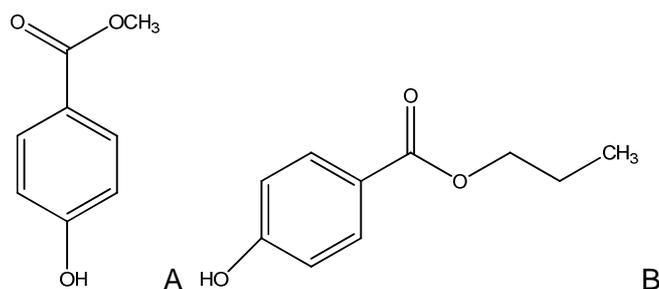


Figura 3.4 - Estrutura química metilparabeno (A) e propilparabeno (B).

3.1.6. Aroma de laranja

O acetato ou etanoato de octila é o composto que dá nome ao aroma de laranja que se apresenta na forma de um líquido límpido, de cor amarelo escuro e com forte odor característico a laranja. É miscível com o álcool e praticamente insolúvel na água. Na indústria farmacêutica é usado como edulcorante e aromatizante.

3.1.7. Tartrazina

A tartrazina ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$; $M_w = 534.39 \text{ g.mol}^{-1}$) é um corante que se apresenta na forma de pó de cor amaro-alaranjado, com fluorescência laranja e é solúvel na água. As soluções aquosas apresentam cor amarela. Este composto apresenta um máximo de absorvância a 425 nm.

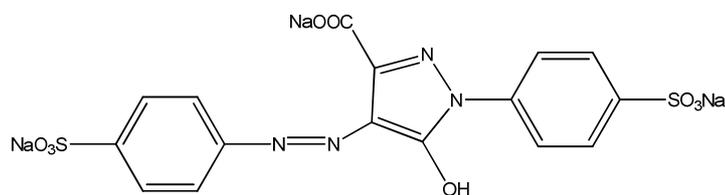


Figura 3.5 - Estrutura química da tartrazina.

Os corantes são usados para dar uma aparência distinta na forma farmacêutica. A cor dum medicamento é uma ferramenta útil para ajudar a identificar o produto no seu processo de fabrico, na sua distribuição e também é útil para os pacientes, principalmente para

aqueles que utilizam varia medicação. O uso de cores diferentes para diferentes dosagens de um mesmo fármaco pode também ajudar a eliminar erros ^[30].

3.1.8. Goma xantana

A goma xantana ($C_{35}H_{49}O_{29}$) é uma mistura polissacarídica com elevado peso molecular obtida naturalmente pela fermentação da bactéria *Xanthomonas campestris*, que sintetiza a goma para evitar sua desidratação.

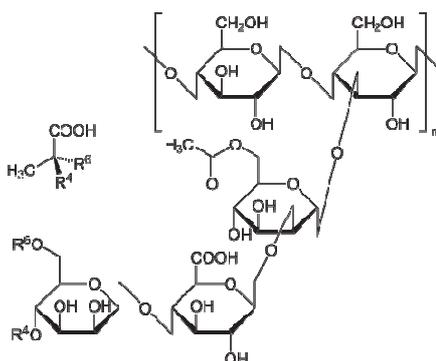


Figura 3.6 - Estrutura química da tartrazina.

Apresenta-se na forma de um pó fino branco e é inodoro, sendo bastante usada na indústria farmacêutica e alimentar como agente espessante, estabilizante e emulsionante. Esta mistura heterogênea de polissacarídeo supera os outros devido principalmente às suas propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas a baixas concentrações (0,05-1,0%), e à sua estabilidade numa ampla faixa de pH e temperatura ^[30].

3.1.9. Água purificada

A água purificada (H_2O) apresenta-se como líquido límpido, incolor, inodoro e insípido. É amplamente utilizada como matéria-prima servindo de diluente e veículo de transformação, elaboração e

fabrico de produtos farmacêuticos. A água purificada é obtida por osmose inversa (Millipore ELIX 10).

3.1.10. Medicamento de referência

O medicamento de referência Ben-U-ron ® usado neste trabalho apresenta-se na forma de xarope. É um líquido viscoso de cor laranja, aspecto homogêneo com odor e sabor a natas. Contém 40 mg de paracetamol por cada ml de xarope.

3.1.11. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (Merck e Sigma-Aldrich), nomeadamente: metanol grau gradiente para HPLC (CH_3OH , $M_w = 32.04 \text{ g.mol}^{-1}$, densidade de 0.792 g.cm^{-3} , pureza de 99.9%) ácido acético glacial (CH_3COOH , $M_w = 60.05 \text{ g.mol}^{-1}$, densidade 1.05 g.cm^{-3} , pureza de 99.8 %), metanol, paracetamol padrão secundário, metilparabeno padrão secundário, propilparabeno padrão secundário. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada obtida por osmose inversa (Millipore ELIX 10).

3.1.12. Fase móvel (HPLC)

A fase móvel utilizada no doseamento do paracetamol, do metilparabeno e propilparabeno no produto acabado consiste numa mistura de 570 mL da solução aquosa de ácido acético e 450 mL de metanol grau gradiente para HPLC. A fase móvel obtida é filtrada através de filtro membrana GHP de 47 mm de diâmetro e $0.45 \mu\text{m}$ de porosidade e desgaseificada sob vácuo.

3.1.12.1. Solução aquosa de ácido acético

Para um balão volumétrico de 1000 mL colocar aproximadamente 800 mL de água para HPLC e adicionar 36.4 mL de

ácido acético glacial. Misturar bem e completar o volume com o mesmo solvente.

3.1.13. Soluções padrão para doseamento do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno.

Neste subcapítulo encontra-se descrito o procedimento para a preparação das soluções padrão para o doseamento da substância activa e dos conservantes na suspensão obtida.

3.1.13.1. Solução padrão mãe de Paracetamol

Pesar 50.0 mg de paracetamol padrão para um balão volumétrico de 20 ml e dissolver em 15 mL de metanol R. Levar 5 minutos ao ultrassons, agitar durante mais 5 minutos e perfazer o volume com metanol R. ($C_{\text{final}} = 2.5 \text{ mg/mL}$).

3.1.13.2. Solução padrão mãe de Metilparabeno

Pesar 25.0 mg de metilparabeno para um balão de 100 mL e dissolver em metanol R. Completar o volume com o mesmo solvente. ($C_{\text{final}} = 0.25 \text{ mg/mL}$).

3.1.13.3. Solução padrão mãe de Propilparabeno

Pesar 2.5 mg de propilparabeno para um balão de 100 mL e dissolver em metanol R. Completar o volume com o mesmo solvente. ($C_{\text{final}} = 0.025 \text{ mg/mL}$).

3.1.13.4. Solução padrão 100 %

Para um balão de 10 mL, retirar 2 mL da solução padrão mãe de paracetamol e 1 mL da solução padrão mãe de metil e propilparabeno. Diluir e perfazer o volume com fase móvel. ($C_{\text{Paracetamol}} = 500 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Metilparabeno}} = 25 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Propilparabeno}} = 2,5 \mu\text{g/mL}$). Filtrar a

Solução padrão 100 % através de filtros seringa PP 0.45µm, para um vial de HPLC de 2 mL.

3.1.14. Soluções para o ensaio de solubilidade

Para o ensaio de solubilidade da substancia activa, paracetamol, foram usadas quatro soluções diferentes, que abaixo se descrevem:

- HCl 0.1 M (meio gástrico simulado sem enzimas)

Para um balão de 1000 mL retirar 50 mL de solução de ácido clorídrico 2 M. Diluir e perfazer o volume com água destilada.

- Tampão acetato (pH=4.5)

Dissolve-se 63 g de acetato de sódio anidro R em água destilada e junta-se 90 ml de ácido acético R. ajusta-se o pH e perfaz-se o volume para 1000 mL com água destilada (segundo Farmacopeia Britânica).

- Tampão fosfato (pH=5.8)

Dissolve-se 1.19 g de fosfato dissodico di-hidratado R e 8.25 g de dihidrogenofosfato de potássio R em água destilada e completa-se 1000 mL com o mesmo solvente (segundo Farmacopeia Britânica).

- Tampão fosfato (pH=6.8) (meio intestinal simulado sem enzimas)

A 77.3 mL de solução de fosfato dissodico R a 71.5 g/L adiciona-se 22.7 mL, de solução de ácido cítrico R a 21 g/L (segundo Farmacopeia Britânica).

3.1.14.1. Solução padrão mãe de Paracetamol

Pesar 5.0 mg de paracetamol padrão para um balão volumétrico de 100 mL e dissolver em 90 mL no solvente em estudo. Completar o volume com o mesmo solvente ($C_{\text{final}} = 50 \mu\text{g/mL}$).

3.1.15. Equipamento

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- HPLC LaChrom Elite (desgaseificador e forno integrados e autoinjector) com detector U.V./visível;
- Agitador magnético.
- Balança analítica Mettler Toledo XS205DU
- Titulador automático Metrohm 794 Basic Titrino
- Filtros seringa PP Acrodisc 0,45 µm
- Papel de filtro Whattman nº4
- Viscosímetro Brookfield modelo DV II + PRO
- Densímetro
- Espectrofotómetro UV/visível Hitachi U2001

3.2. Métodos

Nesta secção encontra-se a descrição dos métodos utilizados no decorrer do trabalho para a quantificação do paracetamol para o estudo de solubilidade e o doseamento por HPLC do paracetamol e dos conservantes na suspensão em estudo.

3.2.1. Quantificação Espectrofotométrica do paracetamol

Pesar quantidades exactas de paracetamol (5.00 mg) e dissolver nos solventes utilizados no ensaio de solubilidade. A partir destas soluções preparar, por diluição, vários padrões de concentrações diversas. O doseamento é efectuado por absorção espectroscópica no ultravioleta (UV) a 242.8 nm, por este

corresponder a um máximo de absorção do analito nesta região espectral, nos diferentes meios, conforme verificado por varrimento de espectro de 300 a 210 nm. Construir as curvas de calibração de absorvância *versus* concentração para utilizar na quantificação do paracetamol no estudo de solubilidade. O método foi validado para o parâmetro linearidade, tendo sido determinado a partir do coeficiente de correlação (r^2) de cada curva, que foi sempre superior a 0.999.

3.2.2. Solubilidade de paracetamol

Foi determinada a solubilidade de paracetamol em quatro soluções diferentes (HCl; tampão acetato (pH=4.5), tampão fosfato (pH=5.8); tampão fosfato (pH=6.8)) a 37 °C.

Um excesso de paracetamol (1250 mg) é suspenso em 50 mL de cada um dos meios em estudo ficando em agitação durante 72 h. As soluções permanecem posteriormente 24 h em equilíbrio antes de serem filtradas. Sofreu diluição apropriada e a quantidade de paracetamol foi determinada espectrofotometricamente, recorrendo a curvas de calibração de absorvância *versus* concentração.

3.2.3. Doseamento por HPLC da substância activa e conservantes

A metodologia utilizada para doseamento, em simultâneo, do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno foi desenvolvida e validada com base no descrito na monografia “Acetaminophen” e “Acetaminophen Oral Solution” (USP31, 2008).

3.2.3.1. Condições de trabalho

As condições cromatográficas de trabalho para o doseamento da substância activa (paracetamol) e dos conservantes (metil e propilparabeno) em simultâneo na suspensão foram:

- Pré-coluna: LiChroCart 4 – 4 Purospher STAR RP-8e, 5 μ m;
- Coluna: LiChroCART 250 – 4.6 Purospher STAR RP-8 e (5 μ m);
- Detecção: Ultravioleta a $\lambda=280$ nm;
- Fluxo: 1,0 ml/min;
- Temperatura do forno: 40°C;
- Volume de injeção: 20 μ l.
- Auto-injector: Temperatura ambiente
- Tempo de corrida: 28 minutos
- Fase móvel: metanol/ solução aquosa de ácido acético (45:57, v/v)

3.2.3.2. Tratamento da amostra

Agitar bem a suspensão e pesar para um balão de 20 mL o equivalente a 50 mg de paracetamol (cerca de 1.5 g de suspensão). Dissolver em metanol e levar aos ultrassons durante dez minutos e a agitar durante mais cinco minutos. Deixar arrefecer, perfazer volume com metanol. Filtrar com papel de filtro Whattman nº4. Do filtrado retirar 2 mL para balão volumétrico de 10 mL e perfazer o volume com fase móvel. Filtrar a solução através de filtro seringa PP acrodisc 0.45 μ m. Injectar a amostra em triplicado e calcular o teor de cada uma das substâncias na amostra.

A identificação do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na suspensão é feita por comparação dos tempos de

retenção obtidos com a solução padrão 100% e solução amostra, respectivamente. A quantidade de paracetamol e parabenos na é determinada a partir das seguintes fórmulas:

- **Paracetamol:**

A quantidade de paracetamol, na porção de suspensão tomada para ensaio, é determinada através da equação 3.2:

$$C_{\text{paracetamol}} = \frac{A_a \times M_{ta} \times M_{pp} \times 2 \times P \times 100}{A_p \times M_{pa} \times 100 \times 10 \times 20} \times 1000 \quad (3.1)$$

$$\% \text{Paracetamol} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Onde A_a é o valor correspondente à média de áreas obtidas para a amostra, M_{ta} à massa teórica de amostra (g), M_{pp} à massa pesada do padrão (mg), P à pureza do padrão, A_p à média de áreas obtida para o padrão, M_p à massa pesada de amostra (g), C à concentração de Paracetamol obtida ($\mu\text{g/ml}$) e $C_0 = 500 \mu\text{g/ml}$.

O teor de paracetamol na amostra deve estar compreendido entre 95.0 % e 105.0 % de $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$, respectivamente.

- **Metilparabeno:**

A quantidade de metilparabeno na suspensão é determinada pela equação 3.4.

$$C_{\text{Metilparabeno}} = \frac{A_a \times M_{ta} \times M_{pp} \times 1 \times P \times 100}{A_p \times M_{pa} \times 100 \times 10 \times 100} \times 1000 \quad (3.3)$$

$$\% \text{Metilparabeno} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (3.4)$$

Onde A_a é o valor correspondente à média de áreas obtidas para a amostra, M_{ta} à massa teórica de amostra (g), M_{pp} à massa pesada do padrão (mg), P à pureza do padrão, A_p à média de áreas obtida para o padrão, M_p à massa pesada de amostra (g), C à concentração de metilparabeno obtida ($\mu\text{g/ml}$) e C_0 a 25 $\mu\text{g/mL}$.

O teor de metilparabeno na amostra deve estar entre 90.0% e 110.0%.

- **Propilparabeno:**

A quantidade de Propilparabeno, na porção de suspensão tomada para ensaio, é determinada através da equação 3.6:

$$C_{\text{Propilparabeno}} = \frac{A_a \times M_{ta} \times M_{pp} \times 1 \times P \times 100}{A_p \times M_p \times 100 \times 10 \times 100} \times 1000 \quad (3.5)$$

$$\% \text{Propilparabeno} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (3.6)$$

Sendo que A_a corresponde à média de áreas obtidas para a amostra, M_{ta} à massa teórica de amostra (g), M_{pp} à massa pesada do padrão (mg), P à pureza do padrão, A_p à média de áreas obtidas para o padrão, M_p à massa pesada de amostra (g), C à concentração de Propilparabeno obtida ($\mu\text{g/ml}$) e C_0 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

O teor de propilparabeno na amostra deve estar entre 90,0% e 110,0% de 4-hidroxibenzoato de propilo.

3.2.4. Caracterização da suspensão de paracetamol

Para além do doseamento, por HPLC, do paracetamol e dos conservantes metilparabeno e propilparabeno existem outros ensaios

igualmente importantes, e que permitem fazer uma caracterização adequada da forma farmacêutica desenvolvida.

3.2.4.1. Descrição

A suspensão deve apresentar-se como um líquido viscoso, cor amarela, aspecto homogêneo e com odor e sabor característico laranja.

3.2.4.2. Viscosidade

A viscosidade da forma farmacêutica é obtida através de um viscosímetro Brookfield modelo DV-II + PRO (figura 3.7), utilizando agulha nº3 a velocidade de 60 RPM. Nestas condições, para este tipo de preparações farmacêuticas esperam-se valores de viscosidade situados entre 500.0 e 1500.0 cP⁹.



Figura 3.7 - Viscosímetro Brookfield modelo DV-II + PRO.

3.2.4.3. Densidade

A densidade da suspensão é determinada a 20°C utilizando um densímetro/picnómetro. Os valores da densidade esperados para a formulação obtida situam-se entre 1.100 – 1.250.

⁹ cP: Centipoise

3.2.4.4. pH

O pH da suspensão é determinado por potenciometria, sob agitação suave a 20°C. Nestas condições, para este tipo de solução esperam-se valores de pH compreendidos entre 4.5 a 6.5.

4.Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Quantificação Espectrofotométrica

Foram construídas quatro curvas de calibração de paracetamol dissolvido nos diferentes meios (HCl, tampão acetato (pH=4.5), tampão fosfato (pH=5.8), tampão fosfato (pH=6.8)).

A absorvância foi determinada a 242.8 nm, em virtude de este comprimento de onda (λ) corresponder ao máximo de absorção do paracetamol, para os diferentes meios, conforme pode ser verificado através dos respectivos espectros, ver figura 4.1.

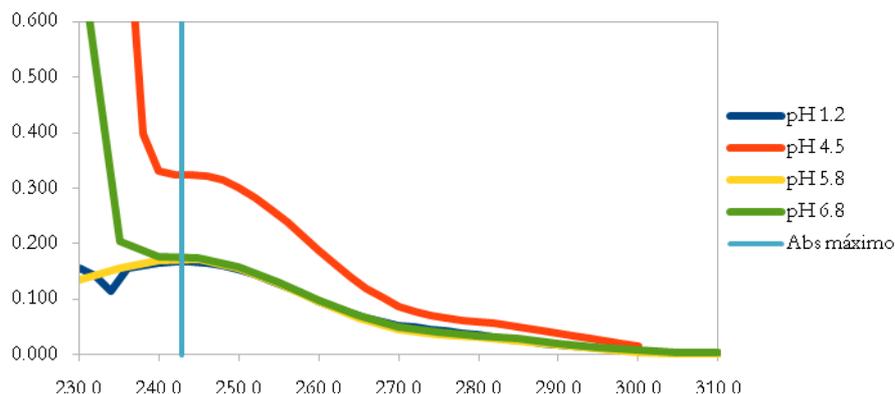


Figura 4.1 - Espectro de absorvância das soluções em função do comprimento de onda (nm).

Na figura 4.1 encontra-se também representada uma linha vertical (azul claro) que se situa no espectro na zona máximo de absorvância correspondente ao paracetamol. Na tabela 4.1. encontram-se sistematizados os valores de absorvância registados para cada uma das soluções a este comprimento de onda (242.8 nm).

Tabela 4.1 - Pico máximo obtido no espectro do paracetamol de 300 a 210 nm.

Soluções	Pico	
	λ (nm)	Abs
HCl 0.1M (pH=1.2)	242.8	0.168
Tampão acetato (pH=4.5)	242.8	0.325
Tampão fosfato (pH=5.8)	242.8	0.173
Tampão fosfato (pH=6.8)	242.8	0.176

Cada curva de calibração foi determinada com cinco padrões de paracetamol (concentrações entre 1.00 a 6.00 $\mu\text{g/ml}$ preparados a partir de solução mãe a 50 $\mu\text{g/ml}$). As equações das rectas obtidas bem como o valor do coeficiente de correlação (r^2) de cada uma das curvas encontram-se discriminados na tabela 4.2. Como evidenciado pelos valores de r^2 , todas as curvas de calibração apresentam boa linearidade entre absorvância e concentração, podemos assim admitir a correcta quantificação do paracetamol sempre que os valores a determinar se encontrem dentro dos limites de concentração utilizadas.

Tabela 4.2- Estimativas obtidas nas curvas de calibração do paracetamol nos diferentes meios: indicação dos parâmetros do modelo e do respectivo coeficiente de determinação (n=5).

Soluções	a_0	a_1	R^2
HCl 0.1M (pH=1.2)	-0.00310(0.0024)	0.06592(0.00056)	0.99978
Tampão acetato (pH=4.5)	-0.0385 (0.0044)	0.06598(0.0010)	0.99928
Tampão fosfato (pH=5.8)	0.01011 (0.0019)	0.06489(0.00044)	0.99986
Tampão fosfato (pH=6.8)	-0.00471(0.0025)	0.06342(0.00059)	0.99974

4.2. Solubilidade

A solubilidade foi determinada a diferentes valores de pH, nomeadamente, 1.2, 4.5, 5.8 e 6.8. Os valores de solubilidade encontrados para o paracetamol encontram-se descritos na tabela 4.3.

Tabela 4.3- Valores de solubilidade do paracetamol.

Soluções	Solubilidade (mg/mL)	Solub./ Sol. Max (%)
HCl 0.1M (pH=1.2)	12.98 (0.14)	49.8
Tampão acetato (pH=4.5)	25.99 (0.21)	100
Tampão fosfato (pH=5.8)	12.55 (0.11)	48.3
Tampão fosfato (pH=6.8)	14.25 (0.09)	54.8

Da tabela 4.3 verifica-se que a solubilidade do paracetamol é cerca do dobro em tampão acetato (pH=4.5) do que em relação às restantes condições testadas. Verifica-se ainda que numa amplitude grande de pH entre 1.2 e 6.8 (mais de cinco ordens de grandeza em termos de actividade do protão em solução) a solubilidade deste fármaco quase não varia, recorrendo a tampões constituídos com compostos inorgânicos. Tal facto faz-nos pensar que a cadeia pequena carbonada do ácido acético pode ter um peso determinante a promover a solubilidade deste fármaco. Para validar esta hipótese ter-se-ia de testar um tampão inorgânico com pH = 4.5 e por exemplo uma tampão orgânico com pH = 6.8.

4.3. Medicamento de referência

O medicamento de referência encontra-se disponível em frascos de vidro, com 85 ml (100 g) de xarope. Apresenta-se na forma de um líquido viscoso de cor laranja, aspecto homogêneo e com odor e sabor a natas. De forma a caracterizar o produto de referência, verificou-se o pH, viscosidade, densidade, identificação e doseamento do princípio activo (paracetamol) e dos conservantes (metilparabeno e propilparabeno). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4- Caracterização do Ben-U-ron ®.

Ben-U-ron	
pH	5.43
Viscosidade (cP)	893.81
Densidade (g.dm⁻³)	1.199
Identificação de conservantes	Positivo
Doseamento de metilparabeno	97.6%
Doseamento de propilparabeno	98.4%
Identificação paracetamol	Positivo
Doseamento paracetamol	104.5%

4.4. Suspensão contendo paracetamol

Tendo como base a formulação qualitativa do produto de referência e as especificações do produto acabado obteve-se uma suspensão contendo paracetamol a 40 mg/ml. A solução final obtida apresenta-se como um líquido viscoso de cor amarela, aspecto

homogêneo com odor e sabor a laranja. Na tabela 4.5. encontra-se resumido os resultados dos ensaios realizados.

Tabela 4.5- Suspensão contendo paracetamol 40mg/ml.

Ensaio	X_m	CV %
pH	5.375 (0.063)	1.2
Viscosidade (cP)	724 (27)	3.7
Densidade (g/dm ³)	1.187 (0.0017)	0.1
Identificação de conservantes	Positivo	-
Doseamento de metilparabeno	103.3 (1.3)	1.2
Doseamento de propilparabeno	103.1 (3.1)	3.0
Identificação paracetamol	Positivo	-
Doseamento paracetamol	101.63 (0.88)	0.9

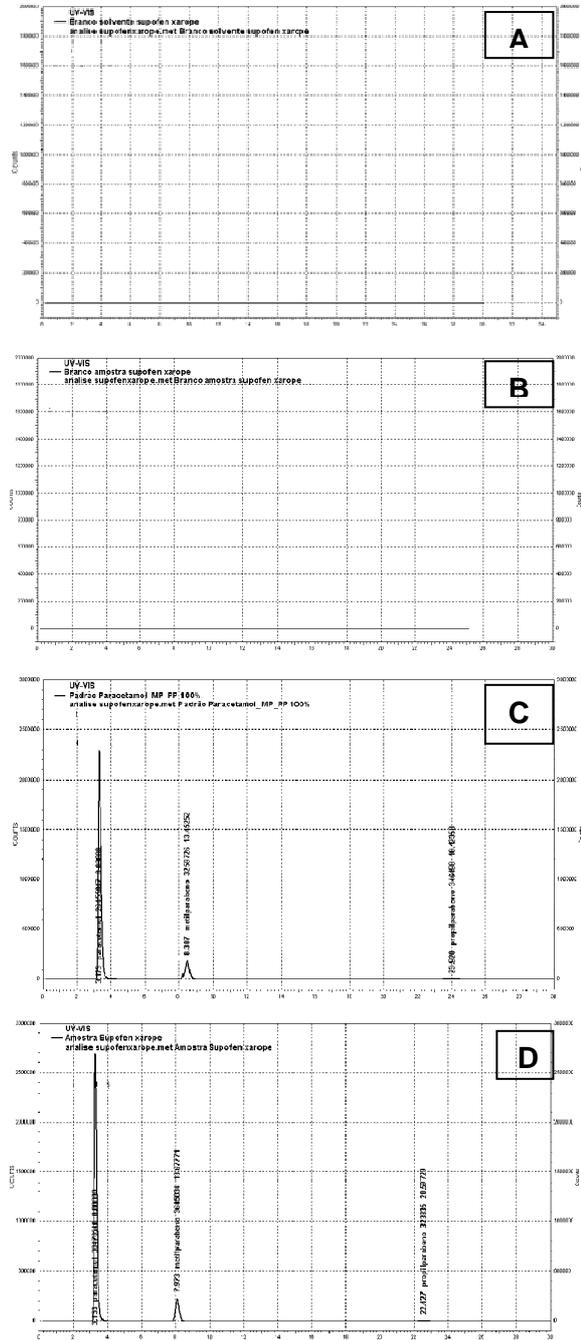
4.5. Validação do método analítico

Para caracterizar de forma adequada o medicamento em estudo tornou-se fundamental implementar uma metodologia analítica precisa, exacta e robusta, que permitisse o doseamento da substância activa e dos conservantes. Para assegurar a fiabilidade dos resultados analíticos obtidos tornou-se necessário validar o método analítico o que foi feito de acordo com as exigências da ICH. O método de doseamento utilizado foi descrito no capítulo “Materiais e Métodos”, sendo realizado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

4.5.1. Especificidade

A especificidade foi avaliada através da injeção de soluções do branco de fase móvel, do branco da amostra, solução padrão de referência (paracetamol, metil e propilparabeno) dissolvido em fase móvel, amostra de suspensão e solução de referência Be-u-ron®

dissolvida em fase móvel. Os cromatogramas obtidos encontram-se na figura 4.2. No anexo A.1 encontram-se os cromatogramas em maior dimensão, para melhor visualização.



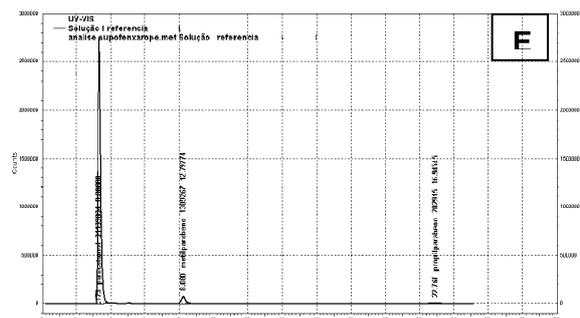


Figura 4.2- Cromatogramas correspondentes ao ensaio de especificidade no método de doseamento do paracetamol e de metil e propilparabeno: A – Branco de fase móvel; B – Branco da amostra; C – Solução padrão de Paracetamol, Metil e Propilparabeno ($C_{\text{Paracetamol}}: 500\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Metilparabeno}}: 25\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Propilparabeno}}: 2,5\mu\text{g/ml}$); D - Amostra de suspensão 40mg/ml ($C_{\text{Paracetamol}}: 500\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Metilparabeno}}: 25\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Propilparabeno}}: 2,5\mu\text{g/ml}$); E – Amostra de solução de referência Ben – u – ron ® 40 mg/ml.

Pela observação dos cromatogramas verifica-se que a ordem de eluição dos componentes é: paracetamol, metilparabeno e propilparabeno.

Após a análise dos cromatogramas pode-se concluir que não existem interferências dos excipientes e do solvente/fase móvel com a substância activa (paracetamol) e conservantes (metilparabeno e propilparabeno) a dosear, havendo uma perfeita separação dos picos correspondentes a cada um dos compostos em análise, pelo que se pode afirmar que o método apresenta especificidade.

4.5.2. Linearidade e Gama de trabalho

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva de calibração para as três substâncias a dosear. Deste modo preparam-se sete padrões abrangendo o intervalo de concentração entre 10 % e 120 % para paracetamol, metilparabeno e propilparabeno. Na tabela 4.6 podemos observar as áreas médias obtidas para cada padrão e as respectivas incertezas associadas.

Tabela 4.6- Áreas da curva de calibração do doseamento do paracetamol (PA), metilparabeno (Metil) e propilparabeno (Propil).

[PA] ppm	Área média (1×10^6)	[Metil] ppm	Área média (1×10^6)	[Propil] ppm	Área média (1×10^6)
50	2.693(0.013)	2.5	0.292 (0.0020)	0.25	3.019 (0.11)
250	13.513 (0.010)	12.5	1.609 (0.0024)	1.25	16.759(0.062)
400	21.142 (0.018)	20.0	2.588 (0.0032)	2.00	27.392 (0.13)
450	23.951 (0.005)	22.5	2.938 (0.0058)	2.25	30.809 (0.17)
500	26.454 (0.013)	25.0	3.260(0.00016)	2.50	34.751 (0.43)
550	28.782 (0.018)	27.5	3.544 (0.0038)	2.75	37.440(0.030)
600	31.589 (0.020)	30.0	3.930 (0.0036)	3.00	41.262 (0.22)

Para um melhor ajuste para cada curva de calibração realizaram-se testes estatísticos adequados referentes às três fases críticas da calibração:

- 1- Representatividade dos valores na curva de calibração (homogeneidade da variância);
- 2- Escolha do modelo;
- 3- Detecção de outliers.

A homogeneidade das variâncias para o sinal medido é verificada através do Teste Fisher (F) com intervalo de confiança de 99% ($F_{b0.01}=F_{u0.005}$). Neste caso assume-se como hipótese inicial (H_0) que as variâncias obtidas são estatisticamente equivalentes e como hipótese alternativa a sua diferença. Os valores calculados através do teste F bem como os respectivos valores prova (PH_0), encontram-se na tabela 4.9.

Tabela 4.9- Resultados da homogeneidade da variância para as três substâncias.

	Valor de teste F	P(H0)
Paracetamol	2,64	0.6
Metilparabeno	3,35	0.5
Propilparabeno	3,75	0.4

Uma vez que nenhum dos valores do teste F obtido ultrapassa o valor crítico a 99% de confiança (14.94), a hipótese nula é válida, ou seja, as variâncias são estatisticamente semelhantes para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno. O elevado valor de prova obtido para cada composto (0.6, 0.5 e 0.4) auxilia na confirmação de que há homogeneidade da variância.

Como as variâncias são estatisticamente semelhantes, transportam-se todos os valores para a segunda fase da calibração, a escolha do modelo através do teste Mandel. Os valores de teste obtidos como os respectivos valores prova dos compostos a dosear na suspensão encontram-se na tabela 4.10.

Tabela 4.10- Resultados do teste de Mandel para a escolha do modelo.

	Valor de teste F	P (H0)
Paracetamol	3.73	0.1
Metilparabeno	0.0003	0.99
Propilparabeno	0.02	0.9

Uma vez que o valor de teste F obtido para os componentes a dosear não ultrapassou o F crítico a 99% de confiança (21.2), a hipótese nula é aceite, ou seja, os polinómios P1 e P2 apresentam

ajustes idênticos, o modelo escolhido é P1 para cada curva de calibração. O valor de prova ajuda a confirmar a opção escolhida.

O último passo para a construção da curva de calibração foi a verificação da existência de *outliers*, onde numa primeira fase foram verificados por regressão robusta, através da análise de resíduos, que podemos observar na figura 4.3.

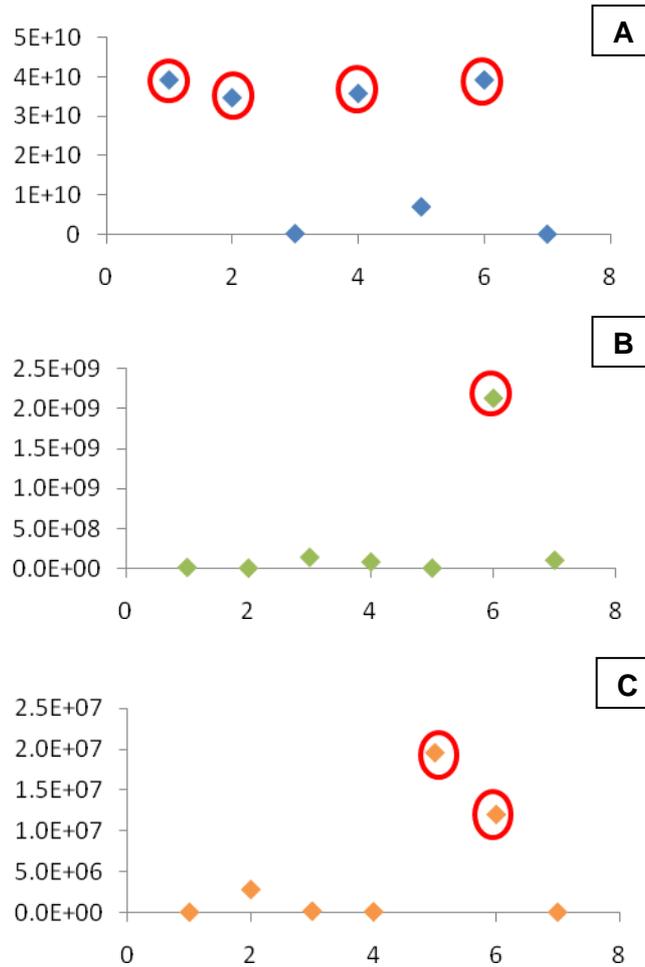


Figura 4.3- Representação gráfica dos resíduos (em valor absoluto) em função do índice do padrão utilizado. Para a verificação de *outliers* da curva de calibração do paracetamol (A), metiparabeno (B) e propilparabeno (C). Eventuais *outliers*, para testar a sua rejeição, encontram-se assinalados com marca a vermelho.

No caso da curva do paracetamol, os possíveis valores discrepantes correspondem ao padrão 1, 2, 4 e 6 sendo o primeiro padrão aquele cujo valor experimental mais se afasta da respectiva estimativa robusta. Na curva do metilparabeno o possível *outlier* é o padrão 6 e por último, na curva do propilparabeno, os possíveis valores discrepantes são os resíduos correspondentes ao padrão 5 e 6. O diagnóstico destes valores foi efectuado através do teste Mandel (tabela 4.11).

Tabela 4.11- Resultados do teste de Mandel para verificar a existência de outliers.

	Valor de teste F	F crítico
Paracetamol	0.01	21.2
Metilparabeno	25.32	21.2
	9.57	34.1
Propilparabeno	9.54	21.2

Pela análise dos valores obtidos no teste estatístico realizado, verificamos que apenas o padrão 6 na curva de calibração do metilparabeno corresponde a um *outlier*, pois o valor obtido através do teste Mandel é superior ao valor crítico a 99 % de confiança, sendo desta forma, rejeitado na construção da respectiva curva de calibração. Após eliminação deste outlier foi verificado se existia outro valor discrepante, mas tal não se verificou, pois o valor do teste F não excedeu o valor de F crítico a 99 %.

Após verificar da homogeneidade da variância, escolha do modelo e detecção de outliers foi construída a respectiva curva de calibração para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, onde se estabeleceram curvas de calibração apresentadas na tabela 4.12.

Tabela 4.12- Equações da curva de calibração e respectivos coeficientes de correlação.

	A_0	A_1	R^2
Paracetamol	2.36 (1.6) E+05	5.23 (0.03) E+04	0.99975
Metilparabeno	-4.28 (0.80) E+04	1.32 (0.0039) E+05	0.99997
Propilparabeno	-4.95 (2.44) E+03	1.39 (0.011) E+05	0.99968

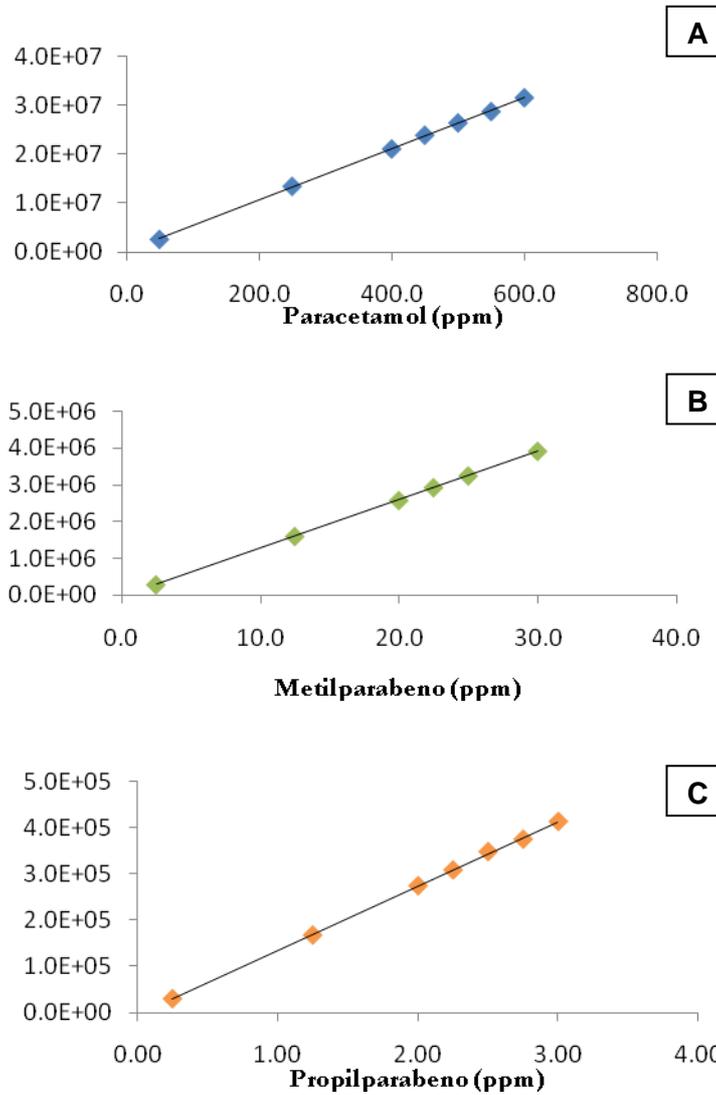


Figura 4.4- Representação gráfica das respectivas curvas de calibração do paracetamol e parabenos. A- Paracetamol; B- Metilparabeno e C- Propilparabeno.

A gama de trabalho linear fica estabelecida com uma faixa de concentrações 50 a 600 ppm, 2.5 a 30 ppm e 0.25 a 3 ppm para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, respectivamente.

4.5.3. Sensibilidade

A sensibilidade do método corresponde à primeira derivada da curva de calibração, neste caso, como temos uma curva de calibração modelo P1 (polinómio de primeiro grau) vai corresponder ao valor de a_1 . Assim, para a curva do paracetamol o valor é $5.23 (0.03) E+04 \text{ ppm}^{-1}$, para o metilparabeno é $1.32 (0.0039) E+05 \text{ ppm}^{-1}$ e para o propilparabeno corresponde a $1.39 (0.011) E+05 \text{ ppm}^{-1}$.

4.5.4. Limiares analíticos

Os limites de decisão (X_d), limites de detecção (X_{LD}) e limites de quantificação (X_{LQ}) foram estimados a partir dos parâmetros das rectas de calibração dos três compostos, paracetamol, metilparabeno e propilparabeno. Os resultados obtidos para os limites encontram-se na tabela 4.13.

Tabela 4.13- Valores dos limiares analíticos para a substância activa e conservantes.

	Limiares analíticos (ppm)		
	X_d	X_{LD}	X_{LQ}
Paracetamol	6.3	12.5	37.6
Metilparabeno	0.13	0.26	0.78
Propilparabeno	0.035	0.059	0.21

Os limites de quantificação para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno encontram-se abaixo da concentração do primeiro padrão (50 ppm, 2.5 ppm e 0.25 ppm, respectivamente) o que está em

conformidade com os requisitos no estabelecimento deste mesmo limite.

4.5.5. Precisão

A precisão do método de análise para o doseamento do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno foi verificada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

4.5.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade é avaliada através da análise do coeficiente de variação de um conjunto de réplicas consecutivas da mesma amostra. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 1.0 %. Neste caso fizeram-se dez injeções consecutivas de uma solução amostra da suspensão e da solução padrão no mesmo dia, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista e procedeu-se à análise do coeficiente de variação das áreas obtidas tanto para a amostra da suspensão como para a solução padrão, os resultados obtidos encontram-se presentes na tabela 4.14.

Tabela 4.14- Coeficientes de variação da substância activa e conservantes da amostra.

	Amostra		Padrão	
	Concentração (ppm)	CV %	Concentração (ppm)	CV %
Paracetamol	756.64 (1.18)	0.2	511.19 (0.65)	0.1
Metilparabeno	37.08 (0.14)	0.4	25.16 (0.15)	0.6
Propilparabeno	3.15 (0.019)	0.6	2.54 (0.013)	0.5

Pela análise dos coeficientes de variação pode-se considerar o método validado em termos de repetibilidade para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, uma vez que os valores obtidos são inferiores a 1.0 %.

4.5.5.2. Precisão intermédia

Para estudar a precisão intermédia do método foram realizadas análises de amostras de padrão e de xarope preparadas a 80%, 100% e 120% em dias diferentes, tendo sido avaliado o coeficiente de variação decorrente da injeção de três gamas de concentração diferentes de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno ao longo dos três dias.

O método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação obtido for inferior a 2.0%. O factor efeito dia também foi estudado com o auxílio da ferramenta ANOVA.

Na tabela 4.16 encontram-se os valores de concentração obtidos para o paracetamol, na solução amostra e na solução padrão, para o estudo de precisão intermédia.

Tabela 4.16- Precisão intermédia do método para o paracetamol.

	[Solução amostra] (ppm)			[Solução Padrão] (ppm)		
	80%	100%	120%	80%	100%	120%
1º Dia	411.85	576.52	673.92	411.73	511.50	608.31
	411.46	577.97	675.03	411.86	510.64	607.28
	411.39	576.33	673.43	412.12	510.24	607.78
2º Dia	411.27	575.21	672.00	396.35	501.37	597.93
	411.45	576.33	671.62	397.25	500.67	598.98
	412.08	575.26	673.09	397.15	500.26	601.01
3º Dia	411.52	577.77	675.51	399.52	501.21	599.21
	411.96	576.86	675.64	400.03	500.95	599.05
	411.12	576.99	676.48	399.37	501.43	599.79

Na solução amostra para a gama de 80% o valor do teste (0.02) é muito inferior em relação ao valor crítico unilateral da distribuição de Fisher ao nível de confiança de 95 % (5.14) indicando que o factor dia não apresenta efeito relevante. O respectivo valor de prova (0.98) é muito superior a 0.05 confirmando que, para esta amostra, nestas condições de análise interdiária, a variabilidade obtida é exclusivamente devida ao efeito da repetibilidade (0.37 ppm). Ao nível de concentração de 411.57 ppm verifica-se que estas análises são extremamente precisas já que a repetibilidade assume um coeficiente de variação de apenas 0.1 %.

Ao nível de concentração de 576.58 ppm (gama a 100 %) na solução amostra obtém-se um valor de teste de 4.62 que é inferior ao respectivo valor crítico previsto para a distribuição unilateral de Fisher (0.05) (5.14) indicando que o efeito dia também não se faz sentir neste caso. Esta decisão estatística é reforçada pelo respectivo valor de prova (0.06) que é superior ao limite 0.05. Assim, a repetibilidade assume agora o valor 0.70 ppm sendo o ensaio muito preciso (CV% = 0.1 %).

Já quando o teor é da ordem de 674.08 ppm (na gama de 120 %) o valor de teste é elevado (19.51) excedendo o valor crítico ao nível de confiança de 95% e 99% (5.14 e 10.92, respectivamente). O valor de prova é demasiado baixo (0.002) de forma que a hipótese alternativa tem de ser considerada revelando que existe efeito interdiário. Tendo a repetibilidade a contribuição de 0.71 ppm, a precisão intermédia assume o valor 1.8 ppm. Este ensaio é muito preciso (CV% = 0.1 %) e apresenta o efeito interdiário que corresponde a uma incerteza da ordem de 0.3 %.

Na solução padrão ao nível de concentração de 402.82 ppm, o valor de teste é excessivo (1412.68) e o respectivo valor de prova é nulo (0.000) indicando inequivocamente que o efeito diário contribui significativamente nesta determinação. Enquanto que a repetibilidade

assume um valor baixo (0.37 ppm) indicando uma boa precisão em condições de repetibilidade (CV% = 0.1 %). Contudo a variabilidade introduzida aqui pelo efeito dia assume a grandeza de 8.0 ppm (CV% = 2.0 %).

Na solução padrão ao nível de concentração de 100 %, 504.25 ppm, o valor de teste é excessivo (366.54) e o respectivo valor de prova é nulo (0.000) concluindo que o efeito diário contribui de forma significativa. Enquanto que a repetibilidade assume um valor de 0.57 ppm, indicando uma boa precisão em termos de repetibilidade (CV% = 0.1 %). Embora a variabilidade introduzida pelo efeito dia assumam a grandeza de 5.7 ppm (CV % = 1.1 %).

Ao nível de concentração de 602.15 ppm (gama de 120%) observa-se de novo o efeito diário na imprecisão desta determinação. O valor do teste é elevado (75.27) ultrapassando largamente os valores críticos respectivos e também nesta gama de concentração o valor de prova é nulo (0.000) reafirmando o efeito em causa. A repetibilidade permanece reduzida (0.98 ppm) indicando que o ensaio é muito preciso em termos de repetibilidade (CV% = 0.2 %). O efeito diário sobre a dispersão estima-se ser da ordem de 4.9 ppm (CV% = 0.8 %).

Na tabela 4.17 encontram-se discriminados os valores de concentração obtidos para o metilparabeno, na solução amostra e na solução padrão, para validação de precisão intermédia deste composto na suspensão.

Tabela 4.17- Precisão intermédia do método para o metilparabeno.

	[Solução amostra] (ppm)			[Solução Padrão] (ppm)		
	80%	100%	120%	80%	100%	120%
1º Dia	20.92	27.82	33.46	20.08	24.76	29.98
	20.88	27.89	33.57	20.06	25.15	29.91
	20.91	27.89	33.52	20.07	25.16	29.94
2º Dia	20.91	27.82	33.36	20.01	25.30	30.45
	20.68	27.94	33.43	20.01	25.24	30.45
	20.95	27.85	33.46	20.15	25.22	30.56
3º Dia	20.91	27.99	33.66	19.89	24.98	30.02
	20.95	27.96	33.66	19.93	24.98	30.07
	20.91	27.97	33.72	19.88	24.98	30.06

Na solução amostra, para o metilparabeno, na gama de 20.89 ppm o valor do teste (0.59) é inferior ao valor crítico unilateral da distribuição de Fisher ao nível de confiança de 95 % (5.14) indicando que o factor dia não apresenta efeito relevante. O respectivo valor de prova (0.58) é muito superior a 0.05 confirmando que, para esta amostra, nestas condições de análise interdiária, a variabilidade obtida é exclusivamente devida ao efeito da repetibilidade (0.09 ppm). Ao nível de concentração de 20.89 ppm verifica-se que estas análises são extremamente precisas já que a repetibilidade assume um coeficiente de variação de apenas 0.4 %.

Já quando o teor de metilparabeno é da ordem de 20.97 ppm (na gama de 100 %) o valor de teste (6.44) é superior ao valor crítico ao nível de confiança de 95% embora não ultrapasse a 99% (5.14 e 10.92, respectivamente). Desta forma, pode-se afirmar a 99% de confiança que não existe efeito interdiário. Tendo a repetibilidade a

contribuição de 0.04 ppm e o respectivo coeficiente de variação 0.15 %.

Na gama de 120 %, ao nível de concentração de 33.54 ppm observa-se o efeito diário na imprecisão desta determinação. O valor do teste é elevado (24.97) ultrapassando os valores críticos respectivos e o valor de prova é praticamente nulo (0.001) reafirmando o efeito em causa. A repetibilidade permanece reduzida (0.047 ppm) indicando que o ensaio é muito preciso em termos de repetibilidade (CV% = 0.1 %). O efeito diário sobre a dispersão estima-se ser da ordem de 0.13 ppm (CV% = 0.4 %).

No estudo do metilparabeno na solução padrão ao nível de concentração de 20.01 ppm (80 %) observa-se efeito diário, uma vez que o valor teste (12.94) é superior aos valores críticos a 95 e 99 % de confiança e o valor de prova é 0.007, reafirmando o efeito dia. A repetibilidade apresenta contribuição de 0.05 ppm e o respectivo coeficiente de variação é de 0.2 %, indicando que o ensaio é preciso em termos de repetibilidade.

Ao nível de concentração de 25.09 ppm na solução padrão obtém-se um valor de teste de 3.64 que é inferior ao respectivo valor crítico previsto para a distribuição unilateral de Fisher (0.05) (5.14) indicando que o efeito dia não se faz sentir neste gama de concentração. Esta decisão estatística é reforçada pelo respectivo valor de prova (0.09) que é superior ao limite 0.05. Assim, a repetibilidade assume agora o valor 0.13 ppm sendo o ensaio preciso (CV% = 0.5 %).

Na solução padrão ao nível de concentração de 120 %, 30.16 ppm, o valor de teste é excessivo (125.92) e o respectivo valor de prova é nulo (0.000) concluindo que o efeito diário contribui de forma significativa. Enquanto que a repetibilidade assume um valor de 0.04 ppm, indicando uma boa precisão em termos de repetibilidade (CV% =

0.1 %). Embora a variabilidade introduzida pelo efeito dia assuma a grandeza de 0.3 ppm (CV% = 1.0 %).

Na tabela 4.18 encontram-se os valores de concentração obtidos para o propilparabeno nas três gamas de concentração em estudo, na solução amostra e na solução padrão, para validação de precisão intermédia deste composto na suspensão.

Tabela 4.18- Precisão intermédia do método para o propilparabeno.

	[Solução amostra] (ppm)			[Solução Padrão] (ppm)		
	80%	100%	120%	80%	100%	120%
1º Dia	1.77	2.38	2.84	2.03	2.53	3.11
	1.80	2.36	2.85	2.02	2.53	3.04
	1.76	2.36	2.84	2.03	2.52	3.05
2º Dia	1.77	2.34	2.83	2.02	2.61	3.10
	1.75	2.37	2.83	2.00	2.59	3.06
	1.76	2.36	2.84	2.01	2.57	3.08
3º Dia	1.77	2.36	2.83	2.01	2.52	2.98
	1.75	2.36	2.79	1.99	2.50	3.00
	1.77	2.36	2.84	2.01	2.57	3.02

Na solução amostra para a gama de 1.77 ppm de propilparabeno o valor do teste (1.04) é inferior em relação ao valor crítico unilateral da distribuição de Fisher ao nível de confiança de 95% (5.14) indicando que o factor dia não apresenta efeito relevante. O respectivo valor de prova (0.41) é muito superior a 0.05 confirmando que, para esta amostra, nestas condições de análise interdiária, a variabilidade obtida é exclusivamente devida ao efeito da

repetibilidade (0.013 ppm). Na gama de 80 %, para este conservante, verifica-se que estas análises são precisas já que a repetibilidade assume um coeficiente de variação de 0.7 %.

Para a gama de 2.36 ppm o valor do teste (0.46) é muito inferior em relação ao valor crítico unilateral da distribuição de Fisher ao nível de confiança de 95 % (5.14) indicando que o factor dia também não apresenta efeito relevante, nesta gama de concentração. O respectivo valor de prova (0.65) é muito superior a 0.05 confirmando que nestas condições de análise interdiária, a variabilidade obtida é exclusivamente devida ao efeito da repetibilidade (0.011 ppm). O coeficiente de variação é 0.5 %, o que leva a concluir que as análises são precisas nesta gama de concentração para o propilparabeno na solução amostra.

Na solução amostra para a gama de 1.83 ppm de propilparabeno o valor do teste (1.89) é inferior em relação ao valor crítico unilateral da distribuição de Fisher ao nível de confiança de 95% (5.14) indicando que o factor dia não apresenta efeito relevante. O respectivo valor de prova (0.23) é muito superior a 0.05 confirmando que, para esta amostra e nestas condições de análise interdiária, a variabilidade obtida é exclusivamente devida ao efeito da repetibilidade (0.016 ppm). O respectivo coeficiente de variação de 0.6%, indica que o ensaio é preciso em termos de repetibilidade.

Na solução padrão quando o propilparabeno se encontra na gama 2.01 ppm (na gama de 80 %) o valor de teste (7.46) é superior ao valor crítico ao nível de confiança de 95 % embora não ultrapasse a 99 % de confiança (5.14 e 10.92, respectivamente). A 99 % de confiança pode-se afirmar que não existe efeito interdiário. Tendo a repetibilidade a contribuição de 0.008 ppm e o respectivo coeficiente de variação 0.4 %, considera-se o ensaio preciso.

Quando o teor de propilparabeno é na ordem de 2.55 ppm (na gama de 100 %) o valor de teste (7.87) volta a ser superior ao valor

crítico ao nível de confiança de 95 % embora não ultrapasse a 99 %. A 99 % de confiança pode-se afirmar que não existe efeito interdiário relevante. A variabilidade obtida também se deve ao efeito repetibilidade que apresenta contribuição de 0.02 ppm e respectivo coeficiente de variação de 0.8 %.

Quando o propilparabeno se encontra na gama de 3.05 ppm (na gama de 120 %), na solução padrão o valor de teste (7.83) é superior ao valor crítico ao nível de confiança de 95 % embora não ultrapasse a 99 % de confiança. Assim, a 99 % de confiança pode-se afirmar que não existe efeito interdiário. A repetibilidade apresenta contribuição de 0.03 ppm e o respectivo coeficiente de variação 0.9 %.

4.5.6. Exactidão

Para avaliar a exactidão do método de doseamento do paracetamol e conservantes na amostra procedeu-se à preparação de amostras de placebo, fortificadas com padrão, de modo a obter soluções com concentrações de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno a 80, 100 e 120 % (tabela 4.19) e posteriormente compararam-se os valores obtidos com um padrão de referência, na mesma gama de concentrações.

A exactidão do método de análise foi avaliada pelo erro absoluto através do teste *t-student* e erro relativo e posteriormente procedeu-se à determinação da percentagem de recuperação, como terceiro parâmetro de desempenho do método.

Tabela 4.19- Resultados obtidos no estudo de exactidão dos métodos de quantificação dos doseamentos de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno aos níveis de concentração de 80, 100 e 120%.

	Doseamento (%)	[Amostra]/ ppm	[Padrão]/ ppm
Paracetamol			
80		406.75	413.86
		407.72	413.09
100		593.46	612.03
		590.34	612.69
120		735.51	746.28
		736.00	745.95
Metilparabeno			
80		20.77	20.08
		20.74	20.06
100		29.00	28.23
		28.98	28.24
120		36.20	36.29
		36.18	36.21
Propilparabeno			
80		1.74	1.74
		1.75	1.74
100		2.45	2.52
		2.44	2.50
120		3.06	3.10
		3.07	3.06

Do estudo da exactidão, tabela 4.19, obteve-se para o paracetamol, para cada gama de concentrações ensaiadas, as estimativas médias 407.3 (0.68), 591.9 (2.2) e 735.75 (0.35) ppm que correspondem ao coeficiente de variação de 0.2, 0.4 e 0.05 %, respectivamente. Tendo como valores de referência 413.48 (0.55), 612.36 (0.46) e 746.11 (0.23) ppm, para cada gama de

concentrações, a exactidão avaliada através do teste t-student conduz ao valor de teste 7.23, 10.55 e 24.85 que é inferior ao valor previsto pela distribuição t-student bilateral ao nível de confiança de 99 % (12.71) excepto para a gama de concentração de 120 % e desta forma verificou-se ao nível de confiança 95 % (63.66) e conclui-se que é inferior. Os valores obtidos como estimativas de erro relativo foram de 1.5, 3.3 e 1.4 % que se encontram dentro da gama pretendida (inferior a 5.0 %) e as percentagens de recuperação obtidas (98.5, 103.5 e 101.4 %) que se encontram dentro o intervalo pretendido (95.0 e 105.0 %). Pela análise dos valores obtidos podemos afirmar que o método se considera validado em termos de exactidão para o paracetamol.

No estudo de exactidão para o metilparabeno, tabela 4.19, obteve-se para cada gama de concentrações 80, 100 e 120% estimativas médias de 20.76 (0.016), 28.99 (0.015) e 36.19 (0.013) ppm que correspondem ao coeficiente de variação de 0.08, 0.05 e 0.03%, respectivamente. Tendo como valores de referência 20.07 (0.086), 28.23 (0.011) e 36.25 (0.054) ppm, para cada gama de concentrações, a exactidão avaliada através do teste t-student conduz ao valor de teste 130.20, 40.25 e 2.15 que é superior ao valor previsto pela distribuição t-student bilateral ao nível de confiança de 99% (12.71) excepto para a gama de concentração de 120%. Desta forma verificou-se ao nível de confiança 95% (63.66) e verificamos que apenas a gama de concentração de 100% é inferior. O valor de prova ($\alpha = 0.005, 0.02$ e 0.28) leva a afirmar que na gama de concentração de 80% o ensaio apresenta erro sistemático. O valor obtido como estimativa de erro relativo foi de 3.5, 2.7 e 0.9 % que se encontra dentro do pretendido (inferior a 5.0%) e a percentagem de recuperação obtida foi 103.4, 102.7 e 100.2% que se encontram compreendidas entre o intervalo permitido (95.0 e 105.0%). Assim,

podemos concluir que o método se encontra validado ao nível de exactidão para o metilparabeno.

Do estudo da exactidão, tabela 4.19, obteve-se para o propilparabeno, para cada gama de concentrações ensaiadas, as estimativas médias 1.74 (0.083), 2.45 (0.0058) e 3.07 (0.0012) ppm que correspondem ao coeficiente de variação de 0.5, 0.2 e 0.04 %, respectivamente. Tendo como valores de referência 1.74 (0.0036), 2.51 (0.014) e 3.08 (0.023) ppm, para cada gama de concentrações, a exactidão avaliada através do teste t-student conduz ao valor de teste 1.05, 18.27 e 0.81 que é inferior ao valor previsto pela distribuição t-student bilateral ao nível de confiança de 99% (12.71) excepto para a gama de concentração de 100 % e desta forma verificou-se ao nível de confiança 95% (63.66) e verificamos que é inferior. O valor obtido como estimativa de erro relativo foi de 0.21, 2.7 e 0.45 % que se encontra dentro do pretendido (inferior a 5.0%) e a percentagem de recuperação obtida foi 100.2, 97.3 e 99.6% que está dentro do intervalo permitido (95.0 e 105.0%). Pela análise dos valores obtidos podemos afirmar que o método se considera validado em termos de exactidão para o propilparabeno.

4.5.7. Estabilidade das soluções analíticas

A solução padrão a 100% e a amostra da suspensão foram mantidas à temperatura ambiente do laboratório (22°C - 24°C / 40% HR – 60% HR) e no auto-injector do HPLC durante 24 horas. Este ensaio permite determinar o período de tempo no qual as amostras podem ser mantidas em bancada, no laboratório, e no auto-injector do HPLC sem sofrerem degradação significativa. A estabilidade das soluções foi verificada estatisticamente pela análise ANOVA de um factor (onde se verifica a influencia do factor tempo) e pelo coeficiente de variação (CV, %).

4.5.7.1. Estabilidade da solução padrão

- Na bancada

A solução padrão 100% foi mantida à temperatura ambiente do laboratório (22 °C - 24 °C / 40% HR – 60% HR), durante um dia. As amostras são injectadas, em duplicado, em diferentes intervalos de tempo, e as concentrações obtidas para a solução padrão encontram-se na tabela 4.20.

Tabela 4.20- Estabilidade das soluções padrão na bancada.

Tempo (horas)	[Paracetamol] (ppm)	[Metilparabeno] (ppm)	[Propilparabeno] (ppm)
0	491.65	23.97	2.40
	496.32	24.21	2.43
6	497.12	24.29	2.44
	497.35	24.37	2.45
12	497.75	24.37	2.46
	497.87	24.32	2.45
24	497.75	24.37	2.46
	497.87	24.32	2.45

No estudo de estabilidade da solução padrão durante um dia obteve-se para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno as estimativas de concentração 496.71 (2.1), 24.28 (0.14) e 2.44 (0.019) ppm, respectivamente. Estas estimativas correspondem ao coeficiente de variação de 0.3, 0.4 e 0.4 %. Pela análise ANOVA de um factor pode-se verificar que durante um dia a solução padrão a 100 % pode permanecer na bancada do laboratório, sem sofrer degradação significativa pois o valor de teste obtido (2.47, 3.53 e 5.89) é inferior ao valor previsto ao nível de confiança de 99 % (6.59), ou seja, o factor tempo não influi na estabilidade da solução padrão durante um dia e quando esta se encontra na bancada. Como os coeficientes de variação são inferiores a 2.0 % quer para a substância activa quer também para os conservantes, auxilia na confirmação da não influência do factor dia.

Foi representado graficamente (figura 4.5) a estabilidade das concentrações (em ppm) do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno em função do tempo.

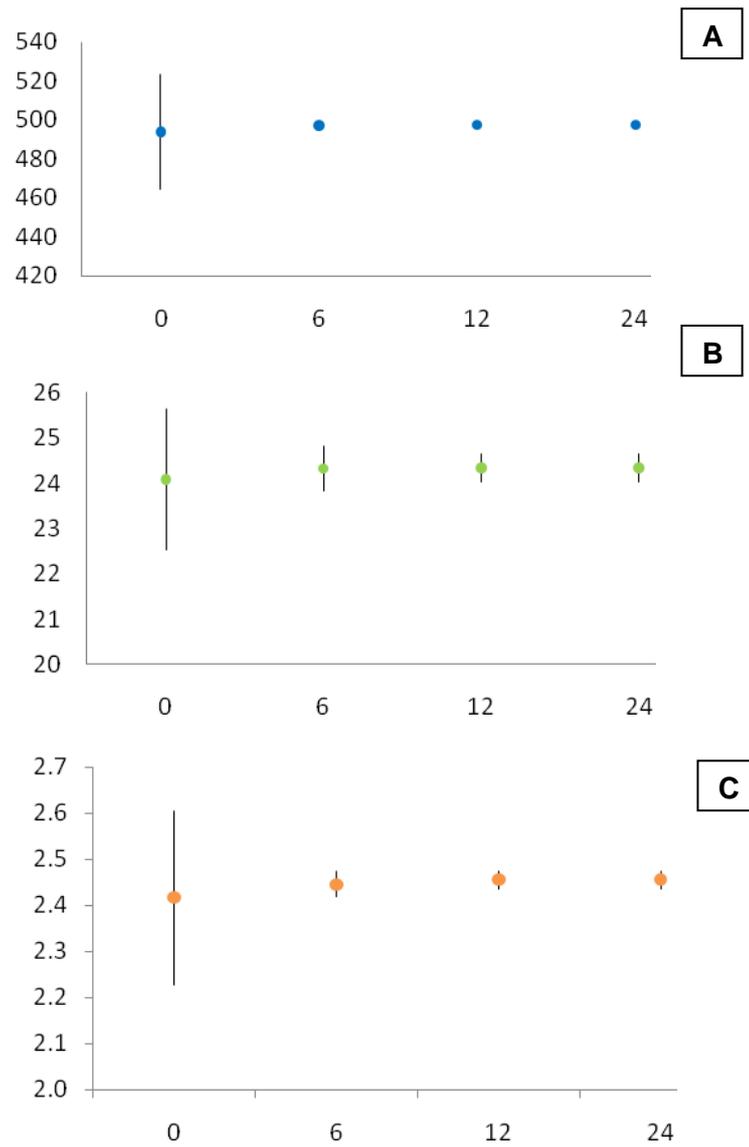


Figura 4.5- Estabilidade da solução padrão na bancada. A- Paracetamol, B- Metilparabeno e C- Propilparabeno.

Através de figura 4.5 pode-se verificar que a média das concentrações obtidas durante um dia que a solução permaneceu na bancada não varia significativamente para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno.

- No auto-injector

A solução padrão 100 % foi mantida em *viales* no auto-injector, à temperatura ambiente, durante um dia sendo injectada, em duplicado, em diferentes intervalos de tempo (tabela 4.21). Este ensaio permite determinar o período de tempo no qual a amostra pode ser mantida no auto-injector do HPLC, sem sofrer degradação significativa.

Tabela 4.21- Estabilidade da solução padrão no auto-injector.

Tempo (horas)	[Paracetamol] (ppm)	[Metilparabeno] (ppm)	[Propilparabeno] (ppm)
0	468.83	21.34	1.79
	469.03	21.33	1.80
6	469.23	21.37	1.82
	469.19	21.34	1.80
12	469.44	21.29	1.78
	469.70	21.32	1.80
24	469.24	21.36	1.76
	468.79	21.33	1.78

Durante o tempo de estudo da estabilidade da solução padrão quando esta se encontra no auto-injector obteve-se as estimativas de concentração média 469.18 (0.30), 21.33 (0.024) e 1.79 (0.018) ppm para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, respectivamente, que correspondem ao coeficiente de variação 0.04, 0.09 e 1.1 %.

Pela análise ANOVA de um factor pode-se verificar que durante um dia a solução padrão pode ser mantida no auto-injector do HPLC, sem sofrer degradação significativa pois o valor de teste obtido para os três compostos em estudo (4.07, 2.60 e 1.09) é inferior ao valor previsto com 99 % de confiança (6.59) e o coeficiente de variação é inferior a 2.0% para os três compostos.

A estabilidade da solução padrão foi verificada visualmente (figura 4.6) através dos valores de concentração obtidos em função do factor horas.

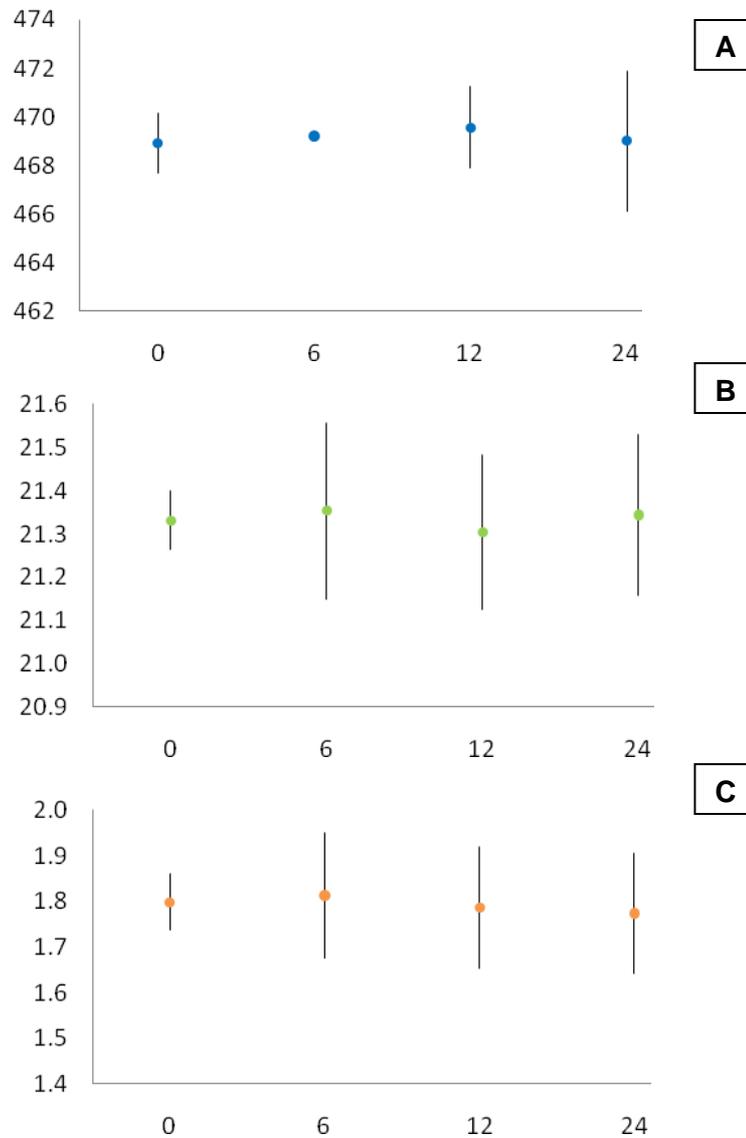


Figura 4.6- Estabilidade da solução padrão no auto-injector. A- Paracetamol, B- Metilparabeno e C- Propilparabeno.

Pela análise da figura 4.6 pode-se verificar que a média das concentrações obtidas para o paracetamol, metilparabeno e

propilparabeno durante este estudo não sofreu alteração significativa, o que confirmar mais uma vez a estabilidade da solução padrão no auto-injector.

4.5.7.2. Estabilidade da solução amostra

- Na bancada

A solução amostra foi mantida à temperatura ambiente do laboratório (22 °C - 24 °C / 40% HR – 60% HR), durante um dia. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.22.

Tabela 4.22- Estabilidade da solução amostra na bancada.

Tempo (horas)	[Paracetamol] (ppm)	[Metilparabeno] (ppm)	[Propilparabeno] (ppm)
0	566.05	26.52	2.24
	567.94	26.50	2.22
6	572.89	26.86	2.23
	566.07	26.56	2.20
12	569.95	26.70	2.21
	570.39	26.73	2.16
24	569.15	26.55	2.29
	568.06	26.52	2.27

As estimativas médias obtidas para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno durante o estudo da estabilidade da amostra foram 568.81 (2.30), 26.62 (0.13) e 2.23 (0.04) ppm, respectivamente, que correspondem ao coeficiente de variação 0.4, 0.4 e 1.1 %. Como os coeficientes de variação são inferiores a 2.0% quer para a substância activa quer também para os conservantes, pode-se dizer que a amostra é estável durante um dia. Pela análise ANOVA de um factor confirmou-se que durante o período de um dia a solução amostra da suspensão pode permanecer na bancada do laboratório, sem sofrer degradação significativa, pois o valor de teste

obtido para os três compostos (0.58, 2.20 e 4.88) é menor que o valor previsto com 99% de confiança (6.59), ou seja, o factor horas na influência na concentração da substância activa quer também para os conservantes.

Na figura 4.7 pode-se visualizar a estabilidade da concentração da amostra em função do factor tempo.

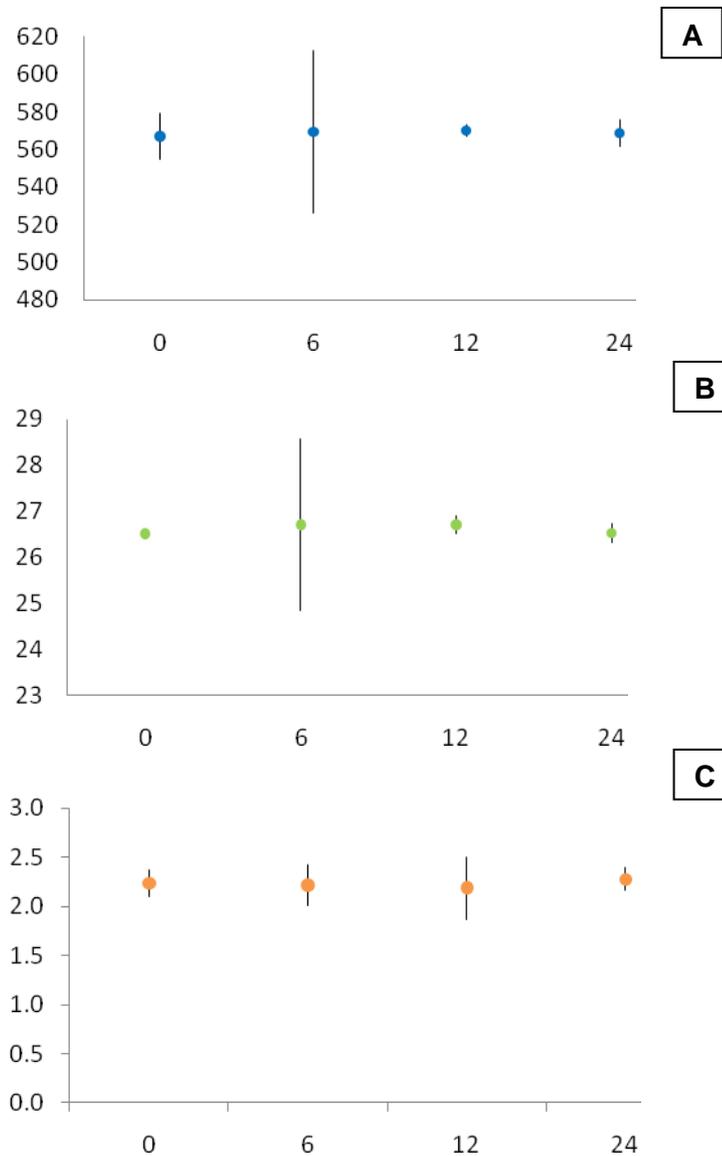


Figura 4.7- Estabilidade da solução amostra na bancada do laboratório. A- Paracetamol, B- Metilparabeno e C- Propilparabeno.

Através da análise da figura 4.7, verificou-se que durante vinte e quatro horas as concentrações médias da amostra não variaram significativamente para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno e assim confirmar o que o factor tempo não influencia as concentrações dos compostos durante o período de um dia.

- No auto-injector

A solução amostra da suspensão foi mantida em *viales* no auto-injector, à temperatura ambiente, durante um dia sendo injectada, em duplicado, em intervalos de tempo diferentes (tabela 4.23).

Tabela 4.23- Estabilidade da solução amostra no auto-injector.

Tempo (horas)	[Paracetamol] (ppm)	[Metilparabeno] (ppm)	[Propilparabeno] (ppm)
0	482.08	22.59	1.94
	481.44	22.59	1.90
6	483.45	22.76	1.91
	484.02	22.72	1.89
12	483.20	22.68	1.91
	483.85	22.69	1.89
24	482.90	22.71	1.95
	483.09	22.80	1.91

Durante a verificação da estabilidade da amostra no auto-injector obteve-se as estimativas de concentrações 483.00 (0.87), 22.69 (0.08) e 1.91 (0.02) ppm para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, respectivamente, que correspondem a um coeficiente de variação de 0.1, 0.2 e 1.1 %. Como os coeficientes de variação são inferiores a 2.0 %, podemos dizer que há estabilidade das concentrações durante um dia. Para a verificar a influência do factor tempo na concentração da amostra realizou-se a análise ANOVA de

um factor a 99% de confiança e verificou-se que o factor tempo influi para o paracetamol e metilparabeno uma vez que o valor de teste obtido (10.63 e 10.20, respectivamente) é superior ao valor previsto com este grau de confiança (6.59) mas o que não se observou para o propilparabeno (o valor teste (1.09) é menor que o valor previsto). Assim para o paracetamol e metilparabeno testou-se a influência do factor a 95 % e verificou-se que durante um dia, o factor tempo não influi (o valor de teste é inferior ao valor previsto com 95 % de confiança, 16.69). Desta forma, pode-se afirmar que a solução amostra da suspensão pode permanecer na bancada do laboratório durante este período de tempo, sem sofrer degradação significativa.

Na figura 4.8, encontra-se representada as concentrações médias dos três compostos em estudo em função do tempo.

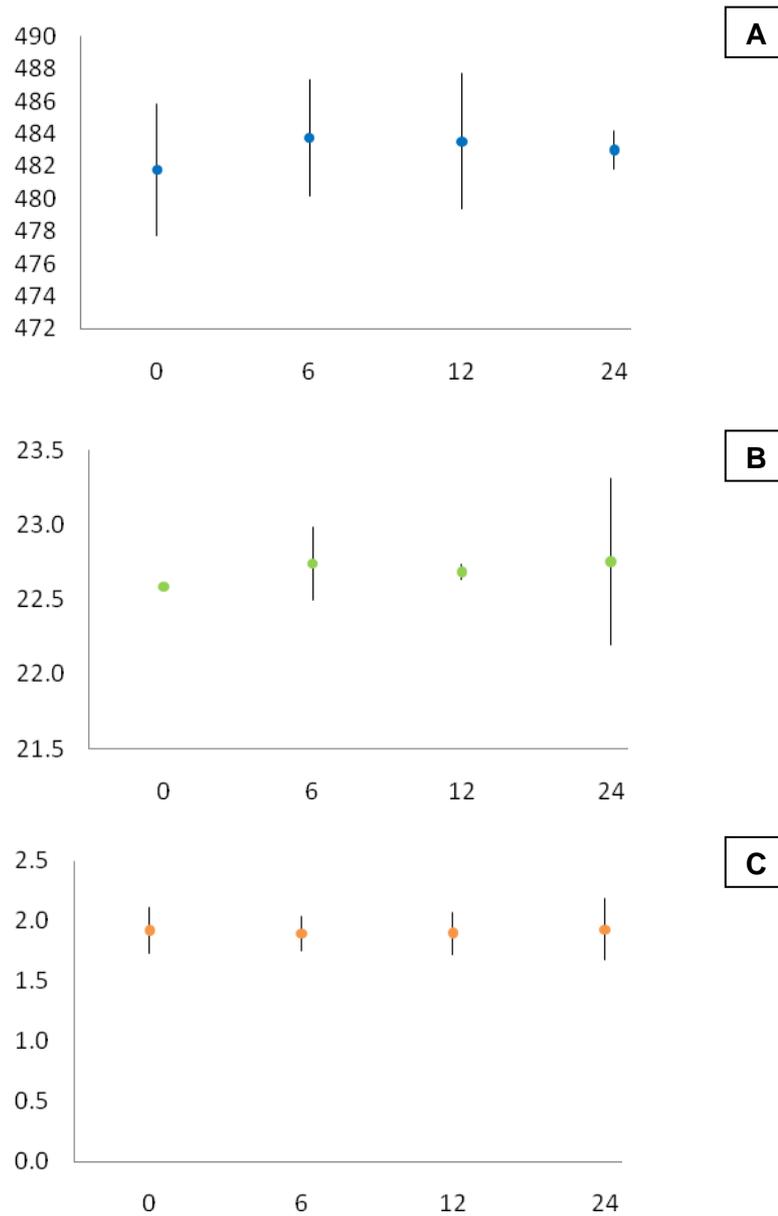


Figura 4.8- Estabilidade da solução amostra no auto-injector do HPLC. Concentração do Paracetamol (A), Metilparabeno (B) e Propilparabeno (C) em ppm em função do tempo em horas.

Através da análise da figura 4.8, verificou-se que durante vinte e quatro horas as concentrações médias da amostra não variaram

significativamente para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno e assim confirma-se o que o factor tempo não influencia as concentrações dos compostos durante o período de um dia quando esta se encontra no auto-injector do HPLC.

5. Conclusões

5. Conclusões

O trabalho desenvolvido visava essencialmente dois objectivos – o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica contendo paracetamol e a validação do respectivo método de análise. Para esse efeito preparou-se uma suspensão de cor amarela contendo 40 mg de paracetamol por mL.

Através do estudo de solubilidade do paracetamol, verificou-se que este parâmetro depende do solvente e do pH do meio, e que com o tampão acetato a pH 4.5 apresenta maior solubilidade.

Para a avaliação dos parâmetros de validação do método de análise do doseamento simultâneo de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na formulação farmacêutica em HPLC começou por se verificar a especificidade/selectividade do método e através dos cromatogramas comprovou-se que não existem interferentes no doseamento do princípio activo e dos conservantes. Pelo parâmetro de linearidade estabeleceu-se para cada composto a respectiva curva de calibração linear com equação de polinómio de primeiro grau. A gama de trabalho construiu-se a partir de sete padrões (excepto para o metilparabeno, foram seis) e definiu-se de 50 a 600 ppm, 2.5 a 30 ppm e 0.25 a 3 ppm, para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, respectivamente. A partir das curvas de calibração estabeleceu-se os limiares analíticos para os três compostos a dosear, onde se obteve como limites de quantificação 37.56 ppm, 0.778 ppm e 0.212 ppm, para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, respectivamente.

A sensibilidade do método de análise determinou-se pelo declive da curva de calibração onde se obteve para o paracetamol

5.23 (0.03) E+04 ppm⁻¹, para o metilparabeno 1.32 (0.0039) E+05 ppm⁻¹ e para o propilparabeno 1.39 (0.011) E+05 ppm⁻¹.

A precisão do método verificou-se pela repetibilidade e precisão intermédia. Em termos de repetibilidade, os coeficientes de variação obtidos para o paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na solução padrão e na solução amostra foram inferiores a 1.0 %, logo o método encontra-se validado em termos de repetibilidade. Quanto à precisão intermédia avaliou-se a solução padrão e amostra em três gamas de concentrações diferentes (80 %, 100 % e 120 %) e em três dias diferentes. Em todos os casos os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 2.0 %, logo o método considera-se validado em termos de precisão intermédia, nestas gamas de concentração. Contudo pela análise ANOVA, verificou-se que existe efeito dia para a solução amostra a 120 % e na solução padrão em todas as gamas de concentração estudadas, no caso do paracetamol. No caso do metilparabeno também se verificou efeito interdiário na solução amostra a 120 % e nas soluções padrão a 80 % e 120 %. Nas concentrações de propilparabeno na solução amostra e padrão não existe efeito interdiário. Como os parâmetros indicadores da precisão do método se encontram validados, o método encontra-se também validado no parâmetro precisão.

A exactidão do método avaliou-se pelo erro absoluto através do teste *t-student* a 95 % de confiança e erro relativo e posteriormente procedeu-se à determinação da percentagem de recuperação, como terceiro parâmetro de desempenho do método, e em ambos os casos verificou-se que o método é exacto, ou seja, não apresenta erro sistemático significativo.

Foi ainda verificada a estabilidade da solução padrão e da solução amostra durante vinte e quatro horas na bancada e no auto-injector do HPLC, no doseamento simultâneo do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno. Pelo estudo de análise ANOVA

verificou-se que o factor tempo não influi na estabilidade das soluções e os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 2.0 %, pelo que se pode confirmar a estabilidade das soluções neste período de tempo.

A metodologia testada para doseamento, em simultâneo, do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, considera-se validada, uma vez que satisfaz as especificações determinadas para cada parâmetro de validação testado.

6.Bibliografia

6. Bibliografia

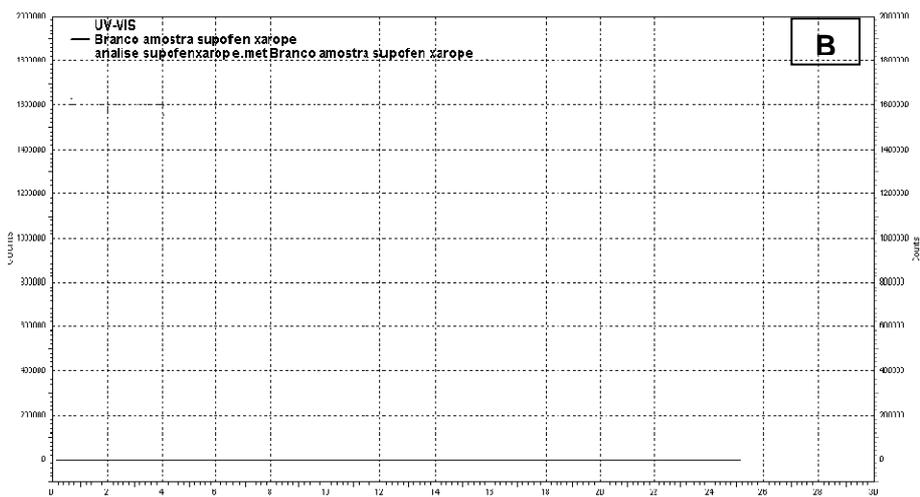
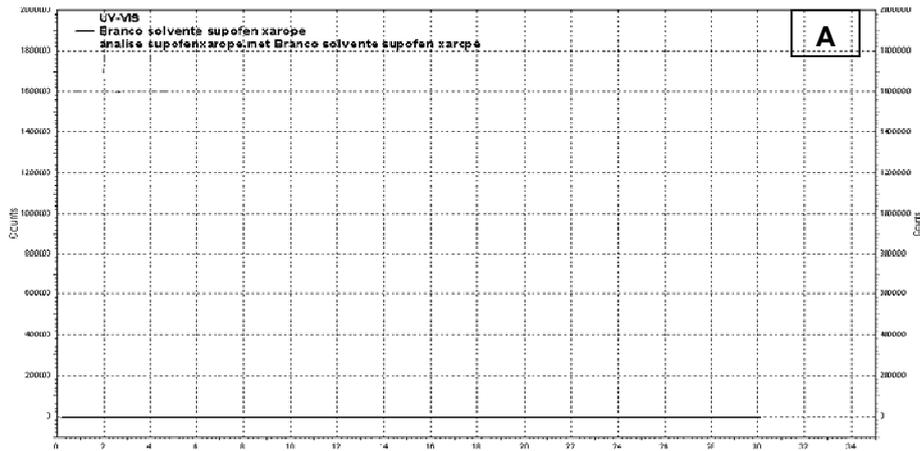
- [1] H. Hass, *The American Journal of Medicine*, **75**, 1983, 1-3.
- [2] Estatuto do Medicamento, Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto.
- [3] R. Rao, A. Narasaraju, *Analytical Sciences*, **22**, 2006, 287-292.
- [4] *Paracetamol*, in *AHFS Drug Information*. January 2007, American Society of Health-System Pharmacists: Maryland, Bethesda.
- [5] *Paracetamol*, in *Martindale: The complete Drug Reference*, 2008, Sean C. Sweetman
- [6] History of paracetamol. Disponível em <http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/paracetamol/pharmwebpic5.html> (acedido em 01/06/2010).
- [7] *Acetaminophen*, *United States Pharmacopeia* 32.
- [8] L. E Zhnyakina, M. L. Tkachenko, A. S. Kosmynin, Y. V. Moshchenskii, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2001, **35**, 32 – 33.
- [9] *Dissolution Test for Solid Dosage Forms*, in *European Pharmacopoeia Sixth Edition*.
- [10] L. Kalantzi, C.Reppas, J. Dressman, G.Amidon, H. Junginger, K. Midha, V. Shah, S.Stavchansky, D.Barends, *Journal of Pharmaceutical Sciences* , **95** (1), 2006,4-14.
- [11] *Paracetamol*, in *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, A. Moffat, M. Osselton, B. Widdop, L. Galichet.
- [12] *Paracetamol*, in *The Merck Index* 2001, Pharmaceutical Press.
- [13] M.A. Olivac, R. A. Olsinaa, A. N. Masi, *Talanta*, **66**, 2005, 229 – 235.

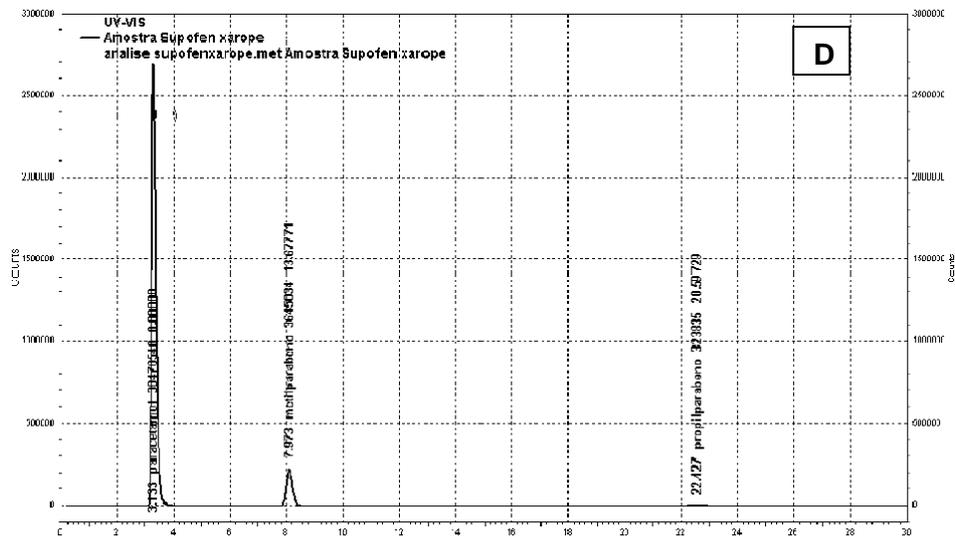
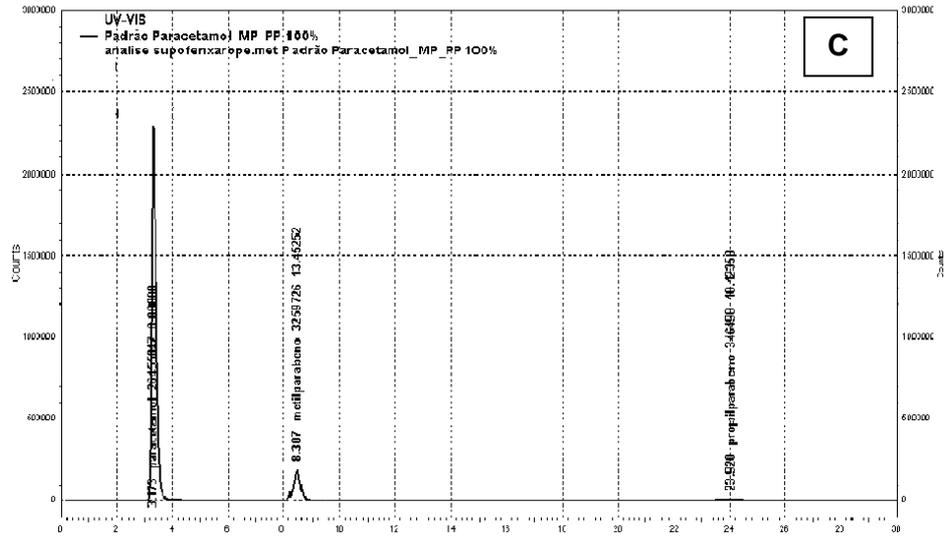
- [14] T. Belal, T. Awad, C.R. Clark, *Journal of Chromatographic Science*, **47**,2009,849-854.
- [15] E. Kumpulainen, H. Kokki, T. Halonen, M. Heikkinen, J. Savolainen, M. Laisaimi, *American Academy of Pediatrics*, 2007, **119**, 766-771
- [16] D. Bartlett, *Journal of Emergency Nursing*, **30 (3)**, 2004, 281-283.
- [17] S. M. Riordana, R. Williams, *Addiction Biology*, **7 (2)**, 2002, 191 – 206.
- [18] C. Van der Marel, B.Anderson, R. Van Lingen, N. Holford, M. Pluim, F. Jansman, J. Van den Anker, D.Tibboel, *European Journal of Clinical Pharmacology*, **60(4)**,2004 297.
- [19] Índice terapêutico, 2009, Tupam Editores, Técnica & Magia Lda.
- [20] J. Swarbrick, J. Boylan, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1995
- [21] D. Wadke, A. Serajuddin, H. Jacobson, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets.*, Marcel Dekker,1989.
- [22] J. Ermer, J. Miller, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley – VCH, Wheinheim, 2005.
- [23] *Validation of Analytical Methods:Definitions and Terminology*, Q2A, ICH Harmonized Guideline,1995
- [24] *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B, ICH Harmonized Guideline, Technical Coordinationn – R.Bass, London E14 4HB, UK ,1996
- [25] Norma Portuguesa: Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração NP EN ISSO/IEC 17025:2005
- [26] *Working Party on Control of Medicines and Inspections*, European Commission, Brussels, 2000
- [27] *Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation*, 2000
- [28] *Validation of analytical procedures: methodology*, ICH, Harmonised Tripartite Guideline, 1996

- [29] G.A.Shabir, *Journal of Chromatography A*, **987**,2003, 57-66.
- [30] R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn, *Pharmaceutical Excipients*, 6.^o edição, Hardcover, 2009.

Anexos

A.1. Cromatogramas correspondentes ao ensaio de especificidade





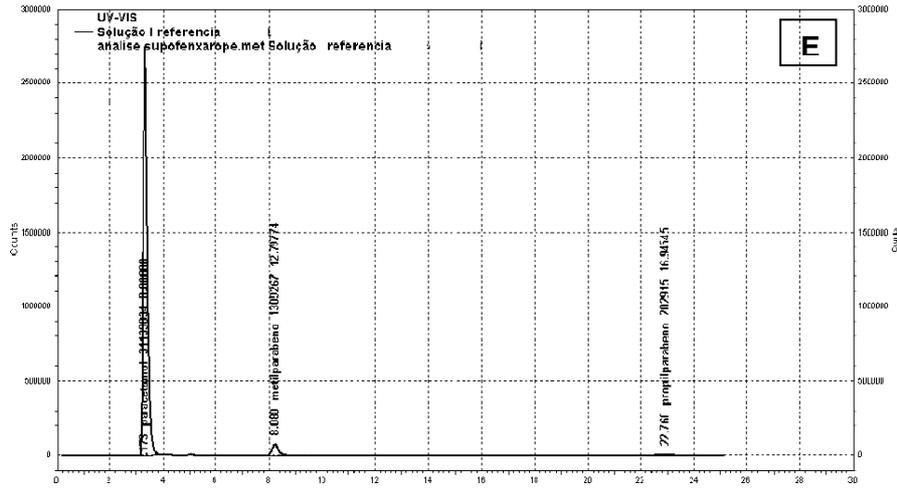


Figura A.1 - Cromatogramas correspondentes ao ensaio de especificidade no método de doseamento do paracetamol e de metil e propilparabeno: A – Branco de fase móvel; B – Branco da amostra; C – Solução padrão de Paracetamol, Metil e Propilparabeno ($C_{\text{Paracetamol}}$: 500 $\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Metilparabeno}}$: 25 $\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Propilparabeno}}$: 2,5 $\mu\text{g/ml}$); D - Amostra de suspensão 40mg/ml ($C_{\text{Paracetamol}}$: 500 $\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Metilparabeno}}$: 25 $\mu\text{g/ml}$, $C_{\text{Propilparabeno}}$: 2,5 $\mu\text{g/ml}$); E – Amostra de solução de referência Ben – u – ron® 40 mg/ml.