

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Jefferson Samuel Santos

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicada na
determinação de maleato de clorfeniramina residual de processos de limpeza
no contexto farmacêutico**

Belo Horizonte

2023

Jefferson Samuel Santos

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicada na
determinação de maleato de clorfeniramina residual de processos de limpeza
no contexto farmacêutico**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza

Belo Horizonte, MG

2023

Santos, Jefferson Samuel.
S237d Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicada na determinação de maleato de clorfeniramina residual de processos de limpeza no contexto farmacêutico / Jefferson Samuel Santos. – 2023.
81 f. : il.
Orientador: Patterson Patrício de Souza.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.
Bibliografia.

1. Clorfeniramina. 2. Fármacos - Limpeza. 3. Fármacos - Controle de qualidade. 4. Validação. 5. Cromatografia de fase reversa. I. Souza, Patterson Patrício de. II. Título.

CDD: 615.18

Jefferson Samuel Santos

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicada na
determinação de maleato de clorfeniramina residual de processos de
limpeza no contexto farmacêutico**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Belo Horizonte, 14 de novembro de 2023.

Aprovado pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza (Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br RAQUEL VIEIRA MAMBRINI
Data: 05/12/2023 11:31:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Raquel Vieira Mambrini



Prof. Ildefonso Binatti
Departamento de Química
CEFET-MG

Prof. Dr. Ildefonso Binatti

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela oportunidade que me foi dada de desenvolver este estudo.

Agradeço aos meus familiares que sempre me apoiaram em minha rotina de estudos, fornecendo-me recursos para continuar desenvolvendo minha pesquisa e me preparando para minha carreira profissional.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Patterson Patrício, e à sua esposa, Dra. Patrícia Patrício, pelos grandes ensinamentos que me passaram ao longo dos últimos anos.

Agradeço ao Leonardo, farmacêutico e colaborador deste trabalho, que me passou muito conhecimento sobre cromatografia líquida e validação analítica devido à sua vasta experiência na área.

Agradeço também a todos os meus amigos do CEFET-MG e da Polícia Federal que muito me apoiaram durante esses anos.

RESUMO

A produção de fármacos deve seguir rigorosos critérios estabelecidos por normas nacionais e internacionais. O cumprimento desses critérios visa garantir a qualidade e a segurança do produto, de modo que os consumidores tenham acesso a formas eficazes de tratamentos contra diversos tipos de doenças. Algumas anomalias podem comprometer toda produção de um fármaco, como é o caso da contaminação cruzada, que ocorre, por vezes, devido a um processo de limpeza malsucedido que resulta da remoção incompleta de resíduos de medicamentos produzidos anteriormente na mesma linha de produção. A fim de evitar esse tipo de problema, pode-se lançar mão de ferramentas que auxiliem no controle de qualidade de todos os processos que envolvam a preparação de um fármaco, incluindo a fase de limpeza de equipamentos e utensílios. Tendo isso em vista, objetivou-se neste trabalho validar um método analítico capaz de detectar e quantificar, de forma exata e precisa, o ativo maleato de clorfeniramina, presente na composição de um medicamento antigripal muito utilizado no tratamento de gripes e resfriados, e que pudesse ser utilizado para averiguar a eficiência do procedimento de limpeza na remoção desse fármaco. Para tanto, empregou-se a técnica de cromatografia líquida em fase reversa, uma coluna cromatográfica Zorbax SB-CN (250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel em eluição por gradiente composta por metanol e uma solução aquosa de ácido perclórico 0,07% (v/v) ajustada em pH 2,0 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹. Utilizou-se ainda um detector na região do ultravioleta em comprimento de onda de 271 nm para detectar o analito de interesse. O fármaco maleato de clorfeniramina foi satisfatoriamente eluído com tempo de retenção de aproximadamente 6,20 minutos. O método mostrou-se linear (R igual a 0,9998 e R² igual a 0,9996), preciso (DPR% entre a repetibilidade e a precisão intermediária na faixa de 2,8%), exato (médias de recuperações entre 91,48% e 94,24%), seletivo e robusto (exceto para os parâmetros alteração de coluna cromatográfica e estabilidade de solução). Os limites de detecção e quantificação foram iguais a 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Com isso, o método desenvolvido foi considerado validado, podendo ser aplicado para avaliar a qualidade de limpeza dos equipamentos e utensílios após a produção do medicamento estudado.

Palavras-chave: maleato de clorfeniramina, validação, limpeza, RPLC.

ABSTRACT

Producing drugs requires strict adherence to national and international standards to ensure product quality and safety. Contamination can compromise the entire production process of a drug, and cross-contamination can occur if the cleaning process fails to remove residues of previously produced drugs on the same line. To avoid such problems, tools can be employed to assist in the quality control of all processes involved in drug preparation, including equipment and utensil cleaning. This study aimed to validate an analytical method using reversed-phase liquid chromatography (RPLC) to detect and quantify the active ingredient chlorpheniramine maleate in a cold medicine and to evaluate the efficiency of cleaning process in removing the drug. The method employed a Zorbax SB-CN (250 x 4.6 mm, 5 μ m) chromatographic column, a gradient elution in mobile phase that was composed of methanol and an aqueous solution of 0.07% (v/v) perchloric acid adjusted to pH 2.0, a mobile phase flux of 1.8 mL min⁻¹, and a UV detector at a wavelength of 271 nm. The drug was satisfactorily eluted with a retention time of approximately 6.20 minutes. The method was found to be linear (R equal to 0.9998 and R² equal to 0.9996), precise (%RSD between the intraday precision and the intermediate precision equal to 2.8%), accurate (recoveries between 91.48% and 94.24%), selective and robust (except for the chromatographic column alteration parameter and for the solution stability parameter), with detection and quantification limits of 0.15 μ g mL⁻¹ and 0.46 μ g mL⁻¹, respectively. The method was validated and can be applied to assess equipment and utensil cleaning quality after producing the cold medicine studied.

Keywords: chlorpheniramine maleate, validation, cleaning, RPLC.

LISTA DE ABREVIACOES

Anvisa – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *The Association of Official Analytical Chemists*

CEFET-MG – Centro Federal de Educao Tecnológica de Minas Gerais

DPR% – desvio padrão relativo

HPLC – *high-performance liquid chromatography*

ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

LD – limite de deteco

LQ – limite de quantificao

MCF – maleato de clorfeniramina

NPLC – *normal phase liquid chromatography*

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso médio

RPLC – *reversed-phase liquid chromatography*

SQF – substância química de referência farmacopeica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ativo maleato de clorfeniramina. _____	15
Figura 2. Esquema simplificado de um cromatógrafo líquido. _____	16
Figura 3. Reação de formação do grupo octilsilano, que caracteriza a fase estacionária de colunas cromatográficas do tipo C ₈ . _____	17
Figura 4. Estrutura química da fase estacionária composta pelo grupo di-isopropil 3-cianopropil silano. _____	18
Figura 5. Esquema de amostragem das placas de aço inox. _____	29
Figura 6. Sequência experimental seguida para o preparo da solução amostra. _____	29
Figura 7. Estruturas químicas das colunas cromatográficas Zorbax CN SB, em (a), e do tipo C ₁₈ , em (b). _____	42
Figura 8. (a) Gráfico de distribuição de microespécies da molécula de clorfeniramina em função do pH e (b) suas respectivas estruturas químicas. _____	43
Figura 9. Em azul, está representado o cromatograma da solução padrão e, em vermelho, está representado o cromatograma da solução amostra. Observa-se que o pico de interesse aparece em torno de 6,20 minutos. _____	46
Figura 10. Gráfico de linha ajustado para o modelo linear referente ao fármaco MCF. _____	47
Figura 11. Gráfico de valor ajustado em relação aos resíduos. _____	48
Figura 12. Teste de Bartlett para igualdade de variâncias. _____	49
Figura 13. Gráfico para teste de outliers. _____	51
Figura 14. Em (a) é apresentado o gráfico de normalidade dos resíduos e em (b) um histograma que indica sua distribuição normal. _____	52
Figura 15. Gráfico de dispersão de resíduos em função da ordem de observação. _____	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Níveis de limpeza simplificados aplicados em farmoquímicas. _____	20
Quadro 2. Condições para a avaliação da robustez do método analítico. _____	26
Quadro 3. Critérios de avaliação estatística da inclinação e do intercepto da curva analítica. _	34
Quadro 4. Critérios para avaliação da homecedasticidade por do teste de Cochran. _____	35
Quadro 5. Avaliação da homocedasticidade por meio do teste de Bartlett. _____	35
Quadro 6. Critérios para avaliação de outliers por meio do teste de Grubbs. _____	36
Quadro 7. Critérios para avaliação de normalidade de resíduos pelo método de Anderson–Darling. _____	36
Quadro 8. Critérios avaliados no método de Durbin–Watson. _____	36
Quadro 9. Critérios avaliados nos testes F (Snedecor) e T (Student) para análise de variâncias e médias. _____	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de fase móvel. _____	30
Tabela 2. Esquema de diluição para o preparo das curvas analíticas. _____	32
Tabela 3. Ordens de concentração adotadas no preparo das curvas analíticas. _____	33
Tabela 4. Preparações de placebo fortificado com padrão de MCF. _____	39
Tabela 5. Alterações dos parâmetros analíticos para o estudo de robustez. _____	39
Tabela 6. Resultados dos parâmetros de Adequabilidade do Sistema Cromatográfico. _____	41
Tabela 7. Resultados avaliados no estudo de seletividade. _____	45
Tabela 8. $G_{\text{calculado}}$ e p-valor para cada nível de concentração. _____	50
Tabela 9. Resultados estatísticos da linearidade pelo método mínimos múltiplos quadrados. _	54
Tabela 10. Parâmetros concentração e área das curvas analíticas utilizados para determinação dos limites de detecção e quantificação. _____	56
Tabela 11. Valores de intercepto e inclinação para os parâmetros limites de detecção e quantificação. _____	57
Tabela 12. Resultados obtidos para o parâmetro precisão repetibilidade. _____	59
Tabela 13. Resultados obtidos para o parâmetro precisão intermediária. _____	60
Tabela 14. Resultados obtidos na avaliação do DPR% entre a precisão repetibilidade e a precisão intermediária. _____	61
Tabela 15. Resultados para o parâmetro exatidão para o fármaco MCF. _____	63
Tabela 16. Resultados obtidos para os parâmetros avaliados no estudo de robustez. _____	66
Tabela 17. Tempos de retenção e erros relativos das amostras analisadas no estudo de robustez. _____	68
Tabela 18. Resultados obtidos para o parâmetro estabilidade de solução em três períodos. ____	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Medicamento antigripal estudado	14
2.2 Maleato de clorfeniramina	14
2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	15
2.3.1 Cromatografia líquida de fase reversa	16
2.3.2 Desenvolvimento de método em cromatografia líquida	19
2.4 Validação de limpeza	19
2.5 Parâmetros de validação de métodos analíticos	22
2.5.1 Seletividade	23
2.5.2 Linearidade	24
2.5.3 Limites de detecção e quantificação	24
2.5.4 Precisão	25
2.5.5 Exatidão	25
2.5.6 Robustez	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 Reagentes e padrões	27
3.2 Preparo de soluções	27
3.2.1 Solução diluente	27
3.2.3 Solução padrão estoque	27
3.2.4 Solução padrão leitura	28
3.2.5 Solução padrão controle	28
3.2.6 Solução amostra	28
3.3 Equipamento e condições cromatográficas	29
3.4 Adequabilidade do sistema	30
3.5 Validação analítica	31
3.5.1 Seletividade	31
3.5.2 Linearidade	32
3.5.3 Limites de detecção e quantificação	37
3.5.4 Precisão	37

3.5.5 Exatidão	38
3.5.6 Robustez	39
3.5.7 Estabilidade de solução	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico	41
4.2 Seletividade	45
4.3 Linearidade	47
4.3.1 Avaliação da homocedasticidade	48
4.3.2 Teste de <i>Grubbs (outlier)</i>	50
4.3.3 Teste de <i>Anderson–Darling</i> (normalidade de resíduos)	51
4.3.4 Teste de <i>Durbin–Watson</i>	53
4.3.5 ANOVA – Mínimos Múltiplos Quadrados	54
4.3.6 Conclusões sobre os resultados obtidos no teste de linearidade	55
4.4 Limites de detecção e quantificação	56
4.5 Precisão	59
4.6 Exatidão	63
4.7 Robustez	66
4.7.1 Alteração de parâmetros analíticos	66
4.7.2 Estabilidade de solução	69
5 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A – Relatório de linearidade obtido pelo <i>software</i> LabSolutions SC	76
ANEXO B – Tabela do teste de <i>Durbin-Watson</i> com 5% de significância	77
ANEXO C – Tabela do teste de <i>Cochran</i> com 5% de significância	78
ANEXO D – Gráfico de distribuição de microespécies de fenilefrina em função do pH	79
ANEXO E – Gráfico de distribuição de microespécies de maleato em função do pH	80
ANEXO F – Gráfico de distribuição de microespécies de paracetamol em função do pH	81

1 INTRODUÇÃO

No contexto farmacêutico, a produção de medicamentos deve seguir rigorosos critérios para que sejam atendidas as exigências normativas em vigor no Brasil e no mundo. Estas têm por objetivo garantir que o processo de obtenção dos fármacos siga todas as especificações que foram previamente estabelecidas a fim de garantir a eficácia e a segurança do produto que chega aos consumidores. Entretanto, algumas anomalias podem ocorrer durante o processo produtivo, podendo comprometer um ou mais lotes de medicamentos, e, em não havendo um correto controle, gerar problemas para a empresa e para potenciais pacientes, incluindo os relacionados à saúde, sendo estes os riscos mais relevantes [1].

Uma das anomalias que pode surgir é a contaminação cruzada. No Brasil, em 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu um relatório que resultou em uma recomendação do Ministério Público da Paraíba quanto à suspensão da produção do medicamento Pitavastatina Cálcica, de nome comercial Livalo[®], devido à contaminação cruzada ocorrida pela presença do ativo Buspirona [2].

Um dos modos mais eficazes de evitar contaminações cruzadas é a validação de limpeza. Este termo se refere à evidência documentada que garante que os procedimentos de limpeza são capazes de remover resíduos a níveis pré-determinados de aceitação. Para tanto, são considerados diversos fatores, que incluem intermediários de reações, reagentes, solventes, impurezas, dose, toxicologia, tamanho do lote do equipamento do qual são removidos os resíduos, dentre outros [3].

Portanto, a validação tem por objetivo verificar a eficiência do procedimento de limpeza aplicado na remoção de resíduos, valendo-se de metodologias analíticas que sejam adequadas à finalidade a que se destinam e capazes de produzir resultados confiáveis. Os procedimentos de limpeza são de suma importância, pois a produção de um fármaco pode ocorrer em uma linha composta por equipamentos que receberão outros ativos e excipientes para a produção de um segundo medicamento. Logo, se houver resquícios da primeira produção em quantidade significativa, pode ocorrer uma contaminação cruzada que exceda os limites estabelecidos em norma, inviabilizando a comercialização do segundo fármaco [3–5].

Na indústria farmacêutica, muitos métodos analíticos empregam a cromatografia com a finalidade de detectar e quantificar compostos, sendo a cromatografia líquida uma das técnicas mais utilizadas devido à sua versatilidade [6,7].

O desenvolvimento de um método analítico em cromatografia líquida apresenta algumas dificuldades, uma vez que devem ser considerados os diferentes tipos de interações que ocorrem no sistema cromatográfico, como as interações entre analito e fase móvel e entre analito e fase

estacionária. Por esse motivo, a escolha de colunas cromatográficas e solventes que compõem a fase móvel deve ser feita levando-se em consideração o(s) tipo(s) de composto(s) que será(ão) estudado(s) e os tipos de interações de interesse [7,8].

Nesta dissertação, serão apresentados os trabalhos desenvolvidos no IntechLab, localizado no Campus VI do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), em parceria com um colaborador de uma indústria farmacêutica brasileira localizada na região metropolitana de Belo Horizonte. O objetivo geral deste estudo consistiu em desenvolver um método analítico validado, em cromatografia líquida, que permitisse detectar e quantificar o ativo maleato de clorfeniramina, oriundo de um medicamento antigripal, após procedimentos de limpeza em linhas de produção.

Para tanto, buscou-se cumprir os critérios estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e lista quais parâmetros devem ser avaliados nesse processo. Portanto, os objetivos específicos deste trabalho consistiram em obter resultados estatisticamente confiáveis para os parâmetros elencados na norma supracitada, de modo que atendessem à legislação vigente.

A indústria farmacêutica tratada neste trabalho havia desenvolvido, à época do estudo, uma metodologia que utilizava o solvente acetonitrila (gradiente para cromatografia) como a parte orgânica da fase móvel. Todavia, havia baixa disponibilidade do solvente e seu valor de mercado havia aumentado significativamente, o que dificultava a aplicação do método. Por esse motivo, buscou-se utilizar o metanol, um solvente orgânico de menor custo e mais acessível, que, por mais que apresente riscos à saúde humana, possui níveis de exposição ocupacional e concentração letal maiores que os do solvente acetonitrila, ou seja, necessita-se de maiores quantidades de metanol para produzir efeitos tóxicos similares aos da acetonitrila. Como comparação, para turnos de oito horas de trabalho, estipula-se, a fim de evitar qualquer efeito tóxico, um valor limite de exposição ocupacional ao metanol de $0,26 \text{ g cm}^{-3}$, o que corresponde a pouco mais de três vezes o limite de exposição à acetonitrila [9].

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Medicamento antigripal estudado

O medicamento antigripal utilizado neste estudo foi produzido por uma indústria farmacêutica localizada na cidade de Betim, região metropolitana de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, sob o registro 1.1717.0010 no Ministério da Saúde. Ele é indicado para o tratamento de sintomas de gripes e resfriados, atuando no alívio de congestão nasal, coriza, febre, dor de cabeça e dores musculares que surgem durante os estados gripais. Uma cápsula desse medicamento é composta por 400 mg de paracetamol, 4 mg de maleato de clorfeniramina, 4 mg de cloridrato de fenilefrina, além dos excipientes dióxido de silício, estearato de magnésio, lactose e talco [10].

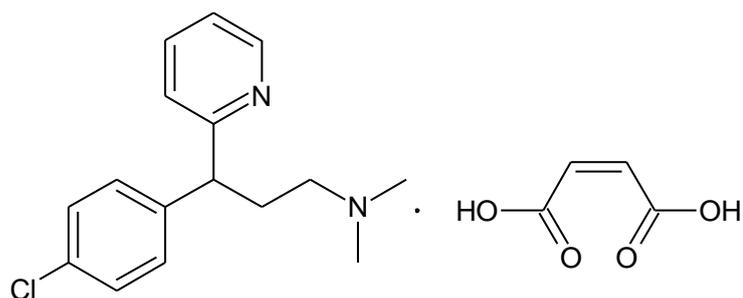
2.2 Maleato de clorfeniramina

O fármaco maleato de clorfeniramina (MCF), um dos princípios ativos do medicamento antigripal estudado, é um anti-histamínico derivado das alquilaminas. Ele atua na diminuição ou inibição da ação da histamina por meio de bloqueio reversível e competitivo dos receptores H₁¹ presentes nos tecidos, sem, contudo, interferir em sua síntese ou liberação. Por isso, esse fármaco é utilizado no tratamento de algumas reações alérgicas, tais como rinites, urticárias e asma, sendo indicado no tratamento de seres humanos e de animais de pequeno porte no contexto veterinário [10–15].

A nomenclatura do MCF, segundo as normas da IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*, é maleato de 3-(4-clorofenil)-*N,N*-dimetil-3-piridin-2-il-propan-1-amina [14]. Trata-se de um composto facilmente solúvel em água e álcool, característica que é devida à formação de um sal entre o grupo carboxílico do ácido maleico e a amina terciária da molécula clorfeniramina pelo processo de transferência de próton [13]. Na Figura 1 (pág. 15), é apresentada sua estrutura química.

¹ Os receptores H₁, ou receptores de histamina (HR)₁, são os responsáveis pelos muitos sintomas de doenças alérgicas, visto que a histamina – molécula que se liga a esses receptores – atua como mediador químico em reações alérgicas, promovendo o aumento da permeabilidade capilar, coceira e vermelhidão da pele [10,15].

Figura 1. Estrutura química do ativo maleato de clorfeniramina.



Na literatura, são apresentados diversos métodos analíticos utilizados para analisar esse fármaco, incluindo espectroscopia Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-Vis ou acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS) [11,12,14].

2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high-performance liquid chromatography* (HPLC), com detector UV ou detector de massas, é o método analítico mais utilizado nos estudos do fármaco MCF, haja vista tratar-se de uma técnica com alto poder de resolução, sensível e sofisticada [13,14]. Ademais, está presente no contexto de muitos laboratórios farmacêuticos, pois é uma técnica versátil que permite analisar diversos compostos não voláteis nem termolábeis, características essenciais para análise por cromatografia gasosa [6,7].

Trata-se, portanto, de uma técnica analítica que permite separar, identificar e quantificar componentes em uma mistura. Ela se baseia no princípio de que diferentes compostos apresentam diferentes afinidades pela fase estacionária, tipicamente um líquido adsorvido ou quimicamente ligado à sílica da coluna cromatográfica², e pela fase móvel, responsável por transportar os analitos pela coluna cromatográfica [6,7].

À medida que os componentes passam pela coluna, ocorrem diferentes interações entre eles e as duas fases, estacionária e móvel, resultando em tempos de eluição variados. O tempo de eluição é o período necessário para que um composto percorra toda a coluna cromatográfica, sendo também denominado de tempo de retenção (t_R). Moléculas que possuem maior afinidade pela fase móvel apresentam t_R menor que o das moléculas que possuem maior afinidade com a fase

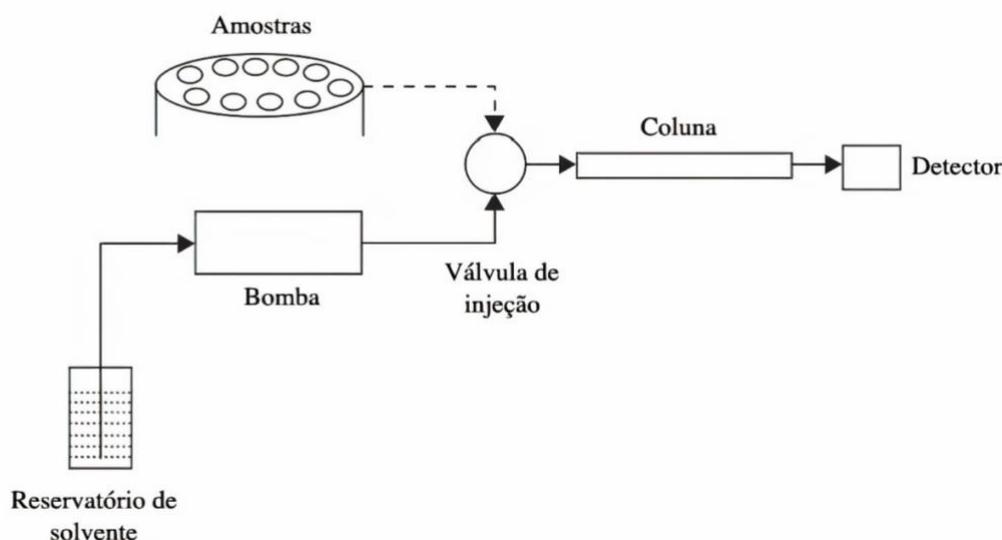
² Atualmente, utiliza-se principalmente a fase estacionária líquida com fase ligada, visto que ela proporciona maior estabilidade à coluna devido às ligações químicas que são formadas entre o líquido e as partículas de suporte do recheio, além de ser compatível com a eluição por gradiente [7].

estacionária. Dessa forma, torna-se possível promover a separação de diferentes compostos em uma mistura [6,8]. Para que o processo de separação ocorra, alguns parâmetros devem ser controlados, como o fluxo e a composição de fase móvel, o tipo de eluição (se isocrática ou por gradiente), a temperatura da coluna e a pressão [7].

Após a análise cromatográfica, as moléculas são observadas por meio de detectores, como os de espectrofotometria no UV-Vis e de espectrometria de massas, dois dos mais utilizados na análise de fármacos. Além desses, existem outros tipos, como os detectores de fluorescência, de índice de refração e condutimétrico [7,14]. O sinal gerado pelo detector é tratado por um *software* apropriado em um computador, que gera um cromatograma referente à análise realizada. No cromatograma, uma relação entre o tempo e os sinais gerados pelo detector é obtida [8].

Na Figura 2, é apresentado um esquema simplificado de um cromatógrafo líquido, indicando o fluxo, por meio de setas, que é seguido pelos solventes e pelos componentes de uma amostra. No esquema, observa-se a presença de um reservatório de solvente, uma bomba, uma válvula de injeção, uma coluna cromatográfica, um detector e um recipiente para amostras.

Figura 2. Esquema simplificado de um cromatógrafo líquido.



Fonte: Adaptado de Snyder *et al* [8].

2.3.1 Cromatografia líquida de fase reversa

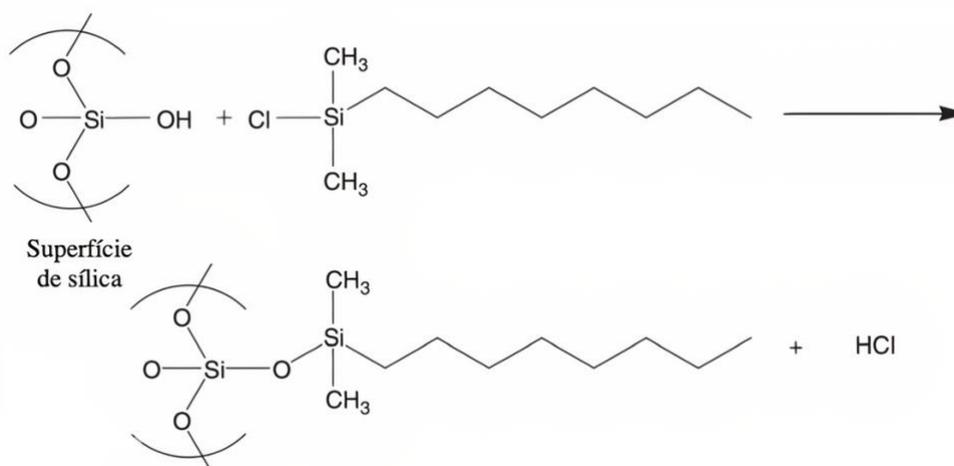
A cromatografia líquida de fase reversa, do inglês *reversed-phase liquid chromatography* (RPLC), é um dos modos mais utilizados atualmente. Ela é caracterizada pelo emprego de uma fase estacionária apolar, ou de baixa polaridade, e de uma fase móvel polar composta por uma mistura de água com um solvente orgânico polar, como metanol, acetonitrila e/ou tetraidrofurano [6,8]. A utilização de água é uma das grandes vantagens desse modo de

cromatografia líquida, haja vista tratar-se de um solvente barato, não-tóxico e sem detecção na região do UV-Vis [7].

A RPLC surge como alternativa ao método tradicional, a cromatografia líquida de fase normal, do inglês *normal-phase liquid chromatography* (NPLC), que se baseia na utilização de uma fase estacionária polar, como colunas de sílica ou de alumina, e de uma fase móvel apolar, composta por solventes orgânicos de baixa polaridade, como éter de petróleo, etanol e acetona. Outra diferença entre os métodos está no mecanismo de retenção. Na NPLC, atua principalmente a **adsorção**, em que o analito é adsorvido pelos compostos que compõem a fase estacionária; na RPLC, atua a partição de solutos (**absorção**), em que o analito é absorvido pelo líquido da fase estacionária que é quimicamente ligado à superfície da partícula de suporte, promovendo a retenção por meio da partição do soluto entre as fases móvel e estacionária [6].

A fase estacionária em RPLC consiste em cadeias, geralmente funcionalizadas, ligadas a partículas de sílica, incluindo a superfície interna de seus poros. Para exemplificar como ocorre a funcionalização de uma fase estacionária em RPLC, é apresentada na Figura 3 a equação química que representa a formação do grupo octilsilano, estrutura química presente em uma coluna do tipo C₈ [6]. O mesmo processo pode ser utilizado para obter diferentes grupos, cada qual caracterizando um tipo de coluna cromatográfica, como a C₁₈, em que se utiliza uma cadeia carbônica contendo dezoito átomos de carbono, fase conhecida como octadecilsilano, ou a do tipo CN, em que se utiliza, em uma de suas versões, o grupo di-isopropil 3-cianopropil silano³ (Figura 4, pág. 18) [6,16].

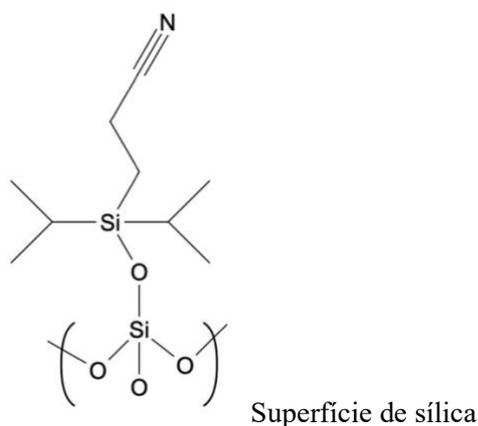
Figura 3. Reação de formação do grupo octilsilano, que caracteriza a fase estacionária de colunas cromatográficas do tipo C₈.



Fonte: Adaptado de Vitha [6].

³ A coluna cromatográfica utilizada neste estudo era funcionalizada com esse grupo.

Figura 4. Estrutura química da fase estacionária composta pelo grupo di-isopropil 3-cianopropil silano.



A RPLC é uma das técnicas mais utilizadas na análise de fármacos, destacando-se em estudos de métodos de validação para detectar e quantificar misturas que contêm MCF. Em alguns desses estudos, foram utilizadas, principalmente, colunas cromatográficas dos tipos C₈ e C₁₈ ligadas a partículas de sílica, e fases móveis compostas por acetonitrila e soluções tamponadas⁴ [12,17,18].

Conforme citado anteriormente, na RPLC, é possível utilizar a **eluição por gradiente** devido à estabilidade das colunas cromatográficas. Ela se difere da **eluição isocrática**, pois nela não há variação na composição da fase móvel no decorrer da corrida cromatográfica, ou seja, se for utilizada uma mistura de água e metanol na proporção 50:50 (v/v), essa razão permanece inalterada até o término do processo. Boa parte dos recentes estudos que abordam a utilização de RPLC para detecção e quantificação de misturas que contêm MCF em sua composição se baseia na utilização desse tipo de eluição [12–14,19].

Diferentemente, na eluição por gradiente, há alteração (ou alterações) na composição da fase móvel, de modo que as proporções dos solventes, que se diferem em suas polaridades, são modificadas no decorrer do processo. Como exemplo, tem-se uma mistura de água e acetonitrila na proporção inicial de 50:50 (v/v), mas que, ao longo do tempo, vai sendo alterada de tal forma que, ao final do processo, a proporção chegue a 20:80 (v/v) [8].

A eluição por gradiente pode ser comparada, ressalvadas as devidas proporções, à **programação de temperatura** em cromatografia gasosa. Na programação de temperatura, busca-se separar os compostos por diferentes pontos de ebulição, em que, à medida que a temperatura aumenta, os compostos vão sendo volatizados e direcionados à coluna. Na eluição por gradiente, busca-se separar os compostos pelas interações entre eles e os solventes da fase móvel, pois a

⁴ A utilização de soluções tamponadas pode promover o desgaste e entupimento de colunas cromatográficas e do próprio equipamento devido à formação de cristais dos sais dos tampões utilizados, caso não sejam adotadas medidas preventivas durante os procedimentos.

alteração na proporção dos constituintes dessa fase permite que moléculas de polaridade próxima às dos solventes sejam menos retidas pela fase estacionária, visto que a afinidade do solvente com o analito torna-se mais intensa. Com isso, os componentes de uma mistura tendem a ser mais facilmente separados, o que pode reduzir o tempo de análise⁵ [6,7].

2.3.2 *Desenvolvimento de método em cromatografia líquida*

O desenvolvimento de método em cromatografia líquida tende a ser mais complexo em relação ao desenvolvimento em cromatografia gasosa, uma vez que ocorrem interações entre os componentes de uma mistura de interesse com as fases móvel e estacionária presentes no sistema. Por isso, a escolha de uma coluna cromatográfica e dos solventes que compõem a fase móvel deve ser feita levando-se em consideração o tipo de analito estudado e os tipos de interações que podem ocorrer durante o processo [7].

Desse modo, percebe-se que a polaridade é um fator determinante a ser considerado quando da escolha das fases estacionária e móvel, sendo de grande utilidade no estudo de seletividade, pois, devido a ele, torna-se possível obter boas resoluções entre os compostos. Todavia, outros fatores devem ser observados no desenvolvimento de um método, como temperatura, fluxo da fase móvel, tipo de detector, dentre outros [6,7].

Um método desenvolvido em cromatografia líquida pode ter diferentes aplicações a depender do contexto, podendo ser aplicado em análises de alimentos, de fármacos, de biomoléculas e de compostos inorgânicos. No contexto farmacêutico, pode-se aplicar a cromatografia líquida no controle de qualidade de medicamentos acabados e de seus excipientes, bem como em análises de contaminação cruzada de insumos de fármacos ativos. Nesse caso, a cromatografia possui significativa relevância, pois, por meio dela, é possível detectar e quantificar pequenas concentrações de compostos não desejados que estejam presentes em equipamentos e demais utensílios em uma linha de produção [3,6].

2.4 **Validação de limpeza**

Para que não haja contaminação cruzada, faz-se necessário realizar a limpeza das linhas de produção por meio de procedimentos aplicados a cada peça de equipamento e a cada final de processo. Todavia, deve-se comprovar sua eficiência por meio de análises instrumentais e estatísticas, aplicando-se um método validado de limpeza [3].

⁵ O tempo de análise cromatográfica depende de diversos fatores, não sendo a eluição por gradiente uma garantia de redução significativa desse tempo.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação de limpeza pode ser definida como:

“[uma] evidência documentada que demonstre que os procedimentos de limpeza removem resíduos a níveis pré-determinados de aceitação, levando em consideração fatores tais como tamanho do lote, dosagem, dados toxicológicos, solubilidade e área de contato do equipamento com o produto” [5].

Portanto, o objetivo da validação de limpeza é verificar a eficiência do procedimento de limpeza aplicado na remoção de resíduos de produtos, produtos de degradação, excipientes e agentes de limpeza, podendo ser aplicada ainda no controle de potenciais contaminantes microbiológicos [20].

De acordo com as normas, existem no mínimo três níveis de limpeza que podem ser aplicados. No Quadro 1, são apresentados esses níveis, a abrangência de limpeza e o status da validação de limpeza [3].

Quadro 1. Níveis de limpeza simplificados aplicados em farmoquímicas.

Nível	Abrangência de limpeza	Status da validação de limpeza
2	A transferência de substâncias para um lote subsequente é crítica, sendo necessária a limpeza até que concentrações dentro dos limites estabelecidos sejam alcançadas.	Essencial
1	A transferência de substâncias para um lote subsequente é menos crítica, sendo necessária a limpeza para reduzir as concentrações para limites menos severos do que aqueles tratados no nível 2.	De não obrigatória a necessária
0	Pode-se realizar apenas a limpeza bruta se as substâncias transferidas de um lote para o outro não forem críticas.	Não necessária

Desse modo, observa-se que a indústria deve seguir protocolos estabelecidos que trazem informações quanto à criticidade de substâncias e processos para, então, realizarem a validação do processo. Para tanto, no estudo, devem ser observados elementos básicos de validação de limpeza, que são:

a. Definição dos critérios de aceitação:

Neste ponto, definem-se os limites do resíduo resultante do processo de limpeza que poderá estar presente no próximo produto a ser fabricado no mesmo equipamento, sem que haja riscos acima dos considerados aceitáveis [3].

Normas internacionais trazem critérios rigorosos quanto à quantidade de resíduo que pode ser transferida para o produto seguinte em uma linha de produção, como [21]:

- I. não deve haver mais que 0,1% da dose terapêutica de um resíduo na dose diária de um produto fabricado em seguida;
- II. a concentração de qualquer produto presente em outro fabricado em seguida não deve ser superior a 10 ppm;
- III. nenhuma quantidade de resíduos deve ser visível no equipamento após procedimento de limpeza.

Para que os critérios sejam atendidos, faz-se necessário determinar a natureza química dos resíduos que estão sendo gerados, verificar visualmente o equipamento, em especial as áreas mais difíceis, e realizar estudos, quando apropriado, referentes à possibilidade de contaminação microbiológica e como ela pode afetar a qualidade do produto [3].

b. Procedimentos de limpeza:

Devem ser estabelecidos procedimentos de limpeza para cada peça do equipamento e para cada processo. Para tanto, levam-se em consideração diversos aspectos, como dificuldade da limpeza, propriedades dos materiais, técnicas de limpeza, resíduos e produtos de limpeza (quanto à solubilidade e a outros aspectos físico-químicos), aspectos ambientais, de saúde e segurança, dentre outros [3].

c. Amostragem:

Para desenvolver um plano de amostragem em validação de limpeza, deve-se basear em justificativa técnico-científica a fim de definir os critérios de aceitação e determinar quaisquer limitações do método de amostragem relacionadas à superfície que será amostrada [3].

No contexto farmacêutico, dois métodos de amostragem são usualmente empregados: esfregação (*swab*) e rinsagem. No método com *swab*, realiza-se o procedimento por meio do esfregamento de uma pequena área, de tal forma que se obtenha um resultado que possa ser extrapolado como representação da área total da superfície do equipamento. Por esse motivo, a região do esfregamento deve ser escolhida com cuidado. Na rinsagem, utiliza-se um solvente no último

ciclo de lavagem, de modo que ele consiga percorrer toda superfície do equipamento e recuperar os resíduos que eventualmente tenham permanecido após o processo [3,21].

Diferentemente do esfregão, a rinsagem é um método indireto de amostragem, haja vista a necessidade de utilizar um solvente para extrair o resíduo do equipamento. No esfregão, o resíduo sobre o equipamento é coletado diretamente por meio de *swab*, que posteriormente é colocado em um frasco com solvente. As soluções obtidas pelos dois métodos de amostragem são examinadas por meio de métodos analíticos adequados, como a cromatografia líquida [3,21].

d. Métodos analíticos

A fim de atestar a confiabilidade dos resultados, os métodos analíticos a serem utilizados na metodologia precisam ser validados e documentados, devendo ser capazes de detectar a(s) substância(s) de interesse em níveis dentro dos critérios de aceitação, bem como detectá-la(s) na presença de outros compostos que possam estar presentes na amostra (seletividade) [3].

e. Protocolos de validação

Para que um método de validação de limpeza seja desenvolvido, deve haver um prévio protocolo de validação que defina itens específicos e atividades a serem realizadas [3].

No protocolo, devem estar presentes o objetivo e o escopo do estudo, a identificação dos parâmetros do processo que serão estudados, os procedimentos de amostragem e inspeção, as responsabilidades durante o estudo, os métodos utilizados, os critérios de aceitação, o controle de mudanças e a sua aprovação antes do início do estudo [3].

f. Relatório de validação

Ao final do estudo, deve ser gerado um relatório de validação que apresente os resultados e conclusões que garantam a credibilidade do método desenvolvido. Nele, devem estar presentes as referências dos procedimentos utilizados, os resultados dos testes físicos e químicos, as conclusões a respeito da aceitabilidade dos resultados, as recomendações baseadas nos resultados ou informações relevantes obtidas durante o estudo, a aprovação da conclusão e a revisão dos possíveis desvios do protocolo [3].

2.5 Parâmetros de validação de métodos analíticos

Um método analítico, para que seja considerado validado, deve atender a uma série de parâmetros estabelecidos em normas. No Brasil, adota-se a Resolução da Diretoria Colegiada –

RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA, como referência para estabelecer quais parâmetros analíticos devem ser atendidos em um estudo de validação.

Segundo a norma supracitada:

“A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos” [4].

Para que o estudo seja desenvolvido, deve-se utilizar uma (ou algumas) **substância(s) química(s) de referência farmacopeica** (SQF) que seja(m) oficializada(s) pela Farmacopeia Brasileira ou por outros compêndios reconhecidos pela ANVISA. Por vezes, as indústrias farmacêuticas apresentam ao órgão relatórios de caracterização do analito contendo resultados de técnicas analíticas aplicadas para este fim, como espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, análise elementar, dentre outras [4].

Além dos dados de caracterização da(s) SQF, outros dados devem constar no relatório apresentado à ANVISA, tais como: número e validade do lote da substância; denominação comum brasileira ou internacional; nº CAS, do inglês *Chemical American Society*; nome químico; fórmulas molecular e estrutural; forma física; propriedades físico-químicas, dentre outros.

Os parâmetros típicos a serem considerados em uma validação dependem do ensaio a ser realizado, sendo normalmente estudados os limites de detecção e quantificação, a exatidão, a repetibilidade, a precisão intermediária, a seletividade, a linearidade e a robustez [4]. Estes são os mesmos parâmetros trazidos pelo ICH, do inglês *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, cujos critérios são seguidos por parte dos estudos de validação de métodos analíticos desenvolvidos para detecção e quantificação de MCF em conjunto com outros fármacos [12,14,18,19].

2.5.1 Seletividade

Este parâmetro é demonstrado por meio de sua capacidade de identificar e/ou quantificar um analito estudado, de forma inequívoca, quando na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e excipientes de uma matriz. Se no estudo for utilizado um método cromatográfico, deve-se comprovar a pureza cromatográfica do sinal do analito (pico cromatográfico) [4].

2.5.2 Linearidade

Este parâmetro é demonstrado por meio de sua capacidade de obter respostas analíticas que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma dada amostra, de modo a ser estabelecida uma relação linear em toda a faixa de concentração trabalhada. Para a construção dessa relação, deve-se utilizar, no mínimo, cinco concentrações diferentes da SQF para as soluções preparadas, realizando-se as leituras em, no mínimo, triplicata, de modo que as soluções sejam preparadas de forma independente [4].

A fim de avaliar a linearidade, alguns dados devem ser apresentados. São eles [4]:

- I. representação gráfica das respostas em função do analito;
- II. gráfico de dispersão de resíduos, bem como sua interpretação estatística;
- III. equação da reta de regressão de y e x , estimada pelo **método dos mínimos quadrados**;
- IV. avaliação dos coeficientes de **correlação (R)** e **determinação (R^2)**;
- V. avaliação da significância do **coeficiente angular**.

2.5.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção representa a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais. Já o limite de quantificação representa a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob determinadas condições experimentais [4].

Existem diferentes formas de determinar esses limites. Uma delas se baseia na determinação da razão sinal-ruído do sinal analítico. No caso do limite de detecção, essa razão deve ser maior ou igual a 2:1; no caso do limite de quantificação, essa razão deve ser maior ou igual a 10:1 [4]. Em algumas normas internacionais, aceita-se uma razão sinal-ruído maior ou igual a 3:1 para avaliar o limite de detecção [22].

Outra forma de determinar esses limites são os cálculos que se baseiam em parâmetros da curva analítica obtida por meio do estudo da linearidade⁶ [4].

⁶ Essa foi a maneira utilizada neste trabalho para determinar os limites de detecção e quantificação. Ela será mais bem apresentada no tópico Metodologia.

2.5.4 Precisão

Este parâmetro é demonstrado por meio de sua capacidade de avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios realizados no estudo de validação. Para tanto, avalia-se a dispersão dos resultados da série de medições por meio do desvio padrão relativo (DPR%) [4].

Expressa-se a precisão por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. A repetibilidade visa avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida cromatográfica, de modo a serem feitas, no mínimo, nove determinações dentro do intervalo linear do método analítico, de tal maneira que sejam analisadas três réplicas para cada concentração do teste (que são: baixa, média e alta), ou seis réplicas a 100% da concentração avaliada [4]. Por convenção, são utilizados os percentuais⁷ de 50%, 100% e 150% para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente.

A precisão intermediária, por sua vez, visa avaliar a proximidade dos resultados obtidos por um segundo analista, em dias diferentes, com os resultados obtidos na repetibilidade. Portanto, devem ser respeitadas as mesmas condições utilizadas pelo primeiro analista, como local, equipamentos, número de amostras, forma de preparo, dentre outros aspectos [4].

A reprodutibilidade é realizada em estudos colaborativos, ou na padronização de métodos analíticos, entre diferentes laboratórios e segue os mesmos critérios descritos em termos de execução de procedimentos [4].

2.5.5 Exatidão

Este parâmetro é demonstrado por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método analítico em relação a um valor considerado verdadeiro [4].

Expressa-se a exatidão por meio do percentual de recuperação (%Recuperação) do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, observada experimentalmente, e a concentração teórica/esperada. Para tanto, devem ser feitas, no mínimo, nove determinações, sendo três réplicas para cada concentração do teste, que são: baixa, média e alta [4].

⁷ Esses percentuais se referem à concentração do analito adotada para o estudo. Neste trabalho, por exemplo, utilizou-se uma concentração limite de 10 µg mL⁻¹. Logo, para os estudos de repetibilidade e de precisão intermediária, bem como de exatidão, os percentuais de 50%, 100% e 150% da concentração de referência correspondem a 5 µg mL⁻¹, 10 µg mL⁻¹ e 15 µg mL⁻¹, respectivamente.

2.5.6 Robustez

Este parâmetro é avaliado por meio da capacidade de o método analítico resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Em métodos quantitativos, a robustez é avaliada com os mesmos critérios utilizados para a exatidão, ou seja, utiliza-se o percentual de recuperação para avaliar o impacto das variações propostas para o sistema [4]. Existem outras formas de determinar a robustez, como o cálculo do DPR%, que será avaliado de acordo com a concentração utilizada no estudo e com os números de amostras e replicatas [23].

De acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, alguns parâmetros devem ser obrigatoriamente contemplados no relatório de validação, sendo, portanto, considerados indispensáveis no estudo de validação de um método analítico no contexto farmacêutico. No Quadro 2, são apresentadas as condições para a avaliação da robustez do método analítico durante as fases de preparo de amostra e de análise por cromatografia líquida [4]. Além dos parâmetros elencados no quadro, outros podem ser abordados durante o desenvolvimento do método analítico, como a temperatura do forno em que fica a coluna cromatográfica.

Quadro 2. Condições para a avaliação da robustez do método analítico.

Fase de estudo	Parâmetro variado
<i>Preparo de amostras</i>	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de filtros
<i>Cromatografia líquida</i>	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas cromatográficas

3 METODOLOGIA

Os equipamentos, as vidrarias e os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram fornecidos pelo laboratório IntechLab, do CEFET-MG, Campus VI, e por colaboradores da indústria farmacêutica localizada em Betim. O estudo foi realizado no período de setembro de 2021 a janeiro de 2022.

3.1 Reagentes e padrões

Neste trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes e padrões: acetonitrila P.A. ($\geq 99,5\%$, CAS 75-05-8, lote 45808), Neon; ácido perclórico (70%, CAS 7601-90-3, lote 556221), Anidrol; água purificada (sistema SimPack 02TM, Millipore); metanol grau HPLC ($\geq 99,9\%$, CAS 67-56-1, lote L690107325), Merck; maleato de clorfeniramina (padrão de referência, CAS 113-92-8, lote N0G316)⁸, USP®; e medicamento antigripal (registro MS: 1.1717.0010, lote 58003/21).

3.2 Preparo de soluções

A seguir, serão descritos os procedimentos de preparo das soluções diluente, padrão estoque, padrão controle, padrão leitura e amostra.

3.2.1 Solução diluente

Para o preparo da solução diluente, utilizou-se a proporção 75:25:0,2 (v/v/v) de água purificada, metanol e ácido fosfórico, respectivamente.

3.2.3 Solução padrão estoque

Realizou-se a pesagem de 10,0 mg de padrão MCF, posteriormente transferidos para um béquer de 100 mL. Ao béquer foram adicionados 50 mL de diluente. A solução foi levada ao ultrassom por 30 minutos até que houvesse a completa dissolução do sólido. Por fim, ela foi transferida para um balão volumétrico de 100,00 mL e seu volume completado com solução diluente (concentração de MCF: 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

⁸ Toda massa de maleato de clorfeniramina aferida na realização deste trabalho foi multiplicada pelo fator 0,998, conforme especificação do fabricante.

3.2.4 Solução padrão leitura

Pipetaram-se 5,00 mL da solução padrão estoque, que foram transferidos para um balão volumétrico de 50,00 mL, cujo volume foi completado com solução diluente (concentração de MCF: $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2.5 Solução padrão controle

Procedeu-se o preparo da solução padrão controle conforme descrito nos subitens 3.2.3 e 3.2.4 (concentração de MCF: $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.2.6 Solução amostra

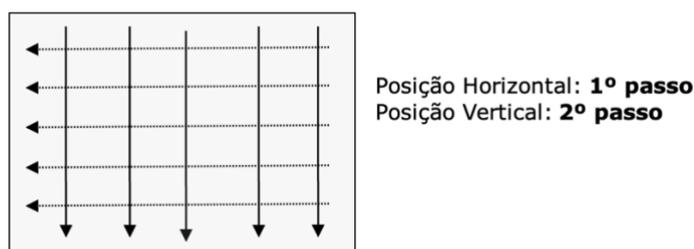
Realizou-se a pesagem de 1 PM⁹, em mg, da amostra do medicamento antigripal em cápsula (cerca de 4,0 mg de MCF, de acordo com o fabricante). Essa massa foi transferida para um béquer de 25 mL, ao qual foi adicionada solução diluente. A solução formada foi levada ao ultrassom por 30 minutos até que houvesse a dissolução de parte do sólido. Por fim, ela foi transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL e seu volume completado com solução diluente (concentração de MCF: $160,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Após o preparo, e com o auxílio de uma micropipeta, 625 μL da solução amostra foram transferidos para uma placa de aço inox de 25 cm². Esta, por sua vez, foi exposta ao ar por aproximadamente 24 horas, a fim de promover a evaporação dos solventes.

Ao término do período, foram transferidos 10,00 mL de solução diluente para um tubo de tipo Falcon de 15 mL, e nele foram colocados 02 (dois) *swabs* TEXWIPE TX761. Estes, devidamente embebidos com solução diluente, foram utilizados, um por vez, na amostragem da placa de aço inox, realizada com movimentos horizontais (primeiro passo) e movimentos verticais (segundo passo), conforme esquema representativo da Figura 5 (pág. 29), de modo a promover o contato das hastes dos *swabs* com a superfície da placa.

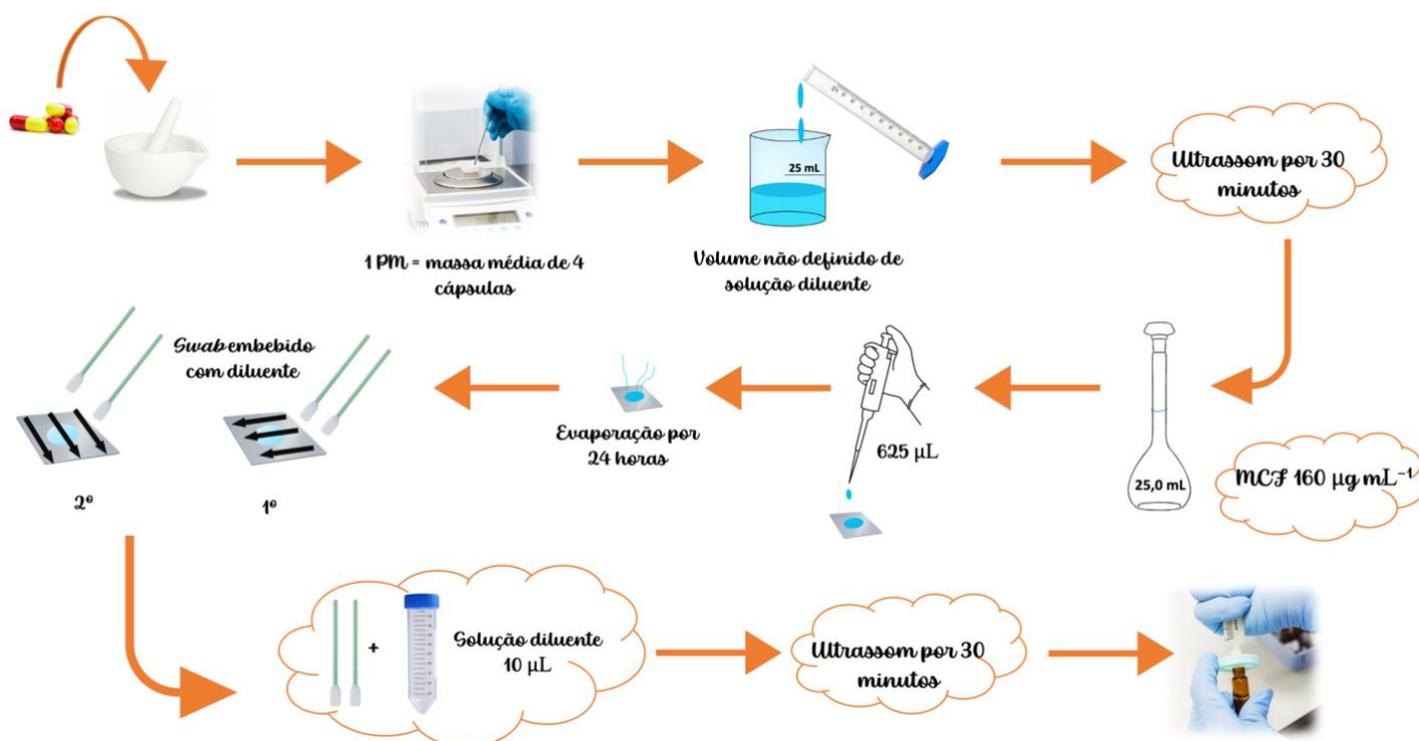
⁹ Neste trabalho, 1PM representa a massa média do conteúdo de quatro cápsulas de comprimidos. Essa quantidade foi utilizada devido à falta de amostras disponíveis. A Farmacopeia Brasileira exige a utilização de vinte comprimidos [50].

Figura 5. Esquema de amostragem das placas de aço inox.



Em seguida, os *swabs* foram novamente transferidos para o tubo de tipo Falcon. Todo o sistema foi levado ao ultrassom por 30 minutos. Após este período, os *swabs* foram retirados da solução, de modo que o líquido retido em sua haste permanecesse no tubo, e, posteriormente, a solução foi vigorosamente homogeneizada, filtrada com um filtro para seringa de membrana de PVDF 0,22 μm e transferida para um *vial*. Na Figura 6, é apresentado um esquema que representa a sequência experimental seguida.

Figura 6. Sequência experimental seguida para o preparo da solução amostra.



3.3 Equipamento e condições cromatográficas

Neste trabalho, as análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se o cromatógrafo líquido Prominence-*i* LC-2030 Plus (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) – contendo um sistema de degaseificação, um sistema de injeção automático de amostra, um compartimento

termostatzado para coluna cromatográfica e detectores UV-Vis – e uma coluna cromatográfica Zorbax SB-CN (250 × 4,6 mm, 5 µm).

As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por metanol e solução de ácido perclórico 0,07% (v/v) ajustada em pH 2,0 (utilizou-se o pHmetro Digimed DM– 22), em eluição por gradiente, conforme especificações apresentadas na Tabela 1; fluxo de fase móvel de 1,8 mL min⁻¹; temperatura de coluna de 30 °C; volume injeção de 10 µL; e comprimento de onda de detecção de 271 nm.

Tabela 1. Gradiente de fase móvel.

Tempo / min	Ácido Perclórico 0,07% / %	Metanol / %
0,0	95,0	5,0
1,0	95,0	5,0
7,0	55,0	45,0
8,0	55,0	45,0
9,0	95,0	5,0
10,0	95,0	5,0

As pesagens dos sólidos utilizados no preparo das soluções foram realizadas na balança analítica Shimadzu ATX224, com resolução de 0,1 mg, pertencente ao IntechLab. Houve uma exceção para as pesagens do padrão MCF utilizado na construção das curvas analíticas no estudo de linearidade, em que se utilizou a balança analítica Mettler Toledo XPR2U/A, com resolução de 0,1 µg, disponibilizada pela indústria farmacêutica localizada na região metropolitana de Belo Horizonte. Sua utilização deveu-se à necessidade de reduzir os desvios observados em ensaios preliminares durante a construção das curvas analíticas no teste de linearidade após pesagens na primeira balança analítica.

3.4 Adequabilidade do sistema

Os estudos de adequabilidade do sistema foram realizados analisando-se os resultados obtidos para as triplicatas das soluções padrão de MCF após as corridas cromatográficas executadas nos ensaios dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez (incluindo os ensaios de alteração de parâmetros analíticos e de estabilidade de solução). Para ter sido considerado adequado, o ensaio deveria atender aos seguintes critérios:

- a) desvio padrão relativo (DPR%) da concentração de MCF menor ou igual a 2%;

- b) número de pratos teóricos referente ao pico de MCF maior ou igual a 15.000;
- c) assimetria (*fator de calda*) do pico cromatográfico referente ao analito MCF menor ou igual a 2.

Neste estudo, utilizou-se o **critério II** apresentado no subitem 2.4a, que diz que a concentração de qualquer produto presente em outro fabricado em seguida não deve ser superior a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como o valor obtido pelos cálculos realizados pela indústria parceira foi superior a $67 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizou-se o limite de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. O cálculo para obtenção desse valor se baseou no guia de Validação de Limpeza para Farmoquímicas, em que são descritas formas de determinar o limite de concentração de um resíduo do produto em outro fabricado em seguida. Para tanto, são levados em consideração a área e o volume do equipamento, o tamanho mínimo do lote subsequente, a mínima dose diária do contaminante, dentre outros parâmetros [3]. Todavia, os valores desses e dos demais parâmetros não foram repassados pela empresa.

3.5 Validação analítica

3.5.1 Seletividade

O preparo das soluções padrão estoque, padrão leitura, padrão controle e amostra (massa média de 468,2 mg) foi realizado conforme descrito nos subitens de 3.2.3 a 3.2.6¹⁰. As soluções placebo, placebo fortificado com padrão e diluente também foram analisadas.

A solução placebo foi preparada pesando-se 42,8 mg de placebo, posteriormente transferidos para um béquer de 50 mL. Ao béquer foram adicionados 10 mL de solução diluente. A solução foi levada ao ultrassom por 30 minutos até que houvesse a dissolução do sólido. Ela foi transferida para um balão de volumétrico de 25,00 mL e seu volume completado com solução diluente. Por fim, foram realizados os mesmos procedimentos descritos em 3.2.6 para deposição da solução sobre a placa de inox e sua posterior análise.

A solução placebo fortificado foi preparada pesando-se 41,2 mg de placebo e 4,0 mg de padrão MCF, tendo sido seguidas, posteriormente, as etapas descritas para o preparo da solução placebo.

Para a análise da solução diluente, efetuou-se a deposição de $625 \mu\text{L}$ sobre uma placa de aço inox de 25 cm^2 . Esta, por sua vez, foi exposta ao ar por aproximadamente 24 horas, a fim de

¹⁰A fim de avaliar a eficácia da recuperação por meio de *swabs*, procedeu-se com o preparo da solução amostra conforme descrito no subitem 3.2.6, mas utilizando-se um (01) *swab*, em um primeiro momento, e dois (02) *swabs*, em um segundo momento, de forma a comparar numericamente os resultados das recuperações.

promover a evaporação dos solventes. As demais etapas foram realizadas conforme descrito no subitem 3.2.6.

Todas as análises foram feitas em triplicata e a seletividade foi avaliada observando-se a presença ou ausência de possíveis interferentes ou contaminantes nos cromatogramas obtidos, bem como avaliando-se alguns parâmetros, como a recuperação (em % e em $\mu\text{g mL}^{-1}$), a área sob o pico cromatográfico e o DPR% das recuperações¹¹.

3.5.2 Linearidade

Para o estudo de linearidade, foram preparadas, seguindo os procedimentos descritos no subitem 3.2.3, três soluções padrão estoque, uma para cada curva analítica, quais sejam: Curva A, Curva B e Curva C. As massas de MCF aferidas¹² (já corrigidas pelo fator 0,998) para o preparo das soluções padrão estoque foram: (a) 10,026 mg para a Curva A, (b) 10,036 mg para a Curva B e (c) 10,042 mg para a Curva C.

De cada solução padrão estoque, foram pipetados cinco volumes diferentes para o preparo das três curvas analíticas, tendo sido utilizados balões volumétricos de 50 mL para as diluições. Na Tabela 2, são apresentados os volumes de pipetagem, em mL, utilizados para cada concentração/nível da curva analítica e as respectivas concentrações teóricas, em % e em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 2. Esquema de diluição para o preparo das curvas analíticas.

Pipetagem / mL	Concentração / %	Concentração / $\mu\text{g mL}^{-1}$
2,50	50	5,0
3,75	75	7,5
5,00	100	10,0
6,25	125	12,5
7,50	150	15,0

As soluções foram preparadas em diferentes ordens de concentração a fim de evitar comportamento ou tendência funcional. Na Tabela 3 (pág. 33), são apresentadas as ordens de concentrações, de cima para baixo, adotadas no preparo de cada curva analítica.

¹¹ Os cálculos de percentual de recuperação (%Recuperação) e de DPR% serão apresentados no subitem 3.5.4 (Equações 4 e 5).

¹² Para tanto, utilizou-se a balança analítica Mettler Toledo XPR2U/A, com resolução de 0,1 μg , conforme citado no subitem 3.3.

Tabela 3. Ordens de concentração adotadas no preparo das curvas analíticas.

	Curva		
	A	B	C
Concentração / $\mu\text{g mL}^{-1}$	5,00	15,00	10,00
	7,50	12,50	5,00
	10,00	10,00	12,50
	12,50	7,50	7,50
	15,00	5,00	15,00

As soluções foram transferidas para os *vials* utilizando-se filtros para seringa de membrana de PVDF 0,22 μm . A ordem das análises cromatográficas foi projetada visando favorecer a aleatoriedade do processo, de modo que cada solução foi analisada em triplicata, totalizando quarenta e cinco corridas cromatográficas, seguindo uma sequência randômica criada no *software* Minitab[®].

3.5.2.1 Testes estatísticos

Com o intuito de avaliar os resultados obtidos com as análises, foram aplicados diferentes testes estatísticos, cada qual com uma finalidade. Abaixo, serão descritos os testes empregados e quais os critérios de avaliação utilizados. Em todos os casos, utilizou-se um nível de significância de 5% [4].

3.5.2.1.1 Método dos *mínimos múltiplos quadrados*

Para a construção das curvas analíticas, optou-se pelo **método dos mínimos múltiplos quadrados**. Este método foi escolhido por fornecer resultados com variância mínima, partindo-se de determinadas suposições estatísticas. Ele permite obter uma relação matemática entre uma resposta medida y (*e.g.* a área sob um pico cromatográfico) e a concentração de um dado padrão analítico x (*e.g.* a concentração do analito de interesse) [24,25]. Essa relação, denominada modelo de regressão, pode ser representada conforme a Equação 1

$$y = b + mx \quad (1)$$

em que b representa o intercepto com o eixo y e m a inclinação da curva (ou coeficiente angular) obtida [26]. A inclinação da curva e o intercepto com o eixo y foram avaliados seguindo os seguintes critérios (Quadro 3, pág. 34):

Quadro 3. Critérios de avaliação estatística da inclinação e do intercepto da curva analítica.

ANOVA	H ₀ : Coeficiente angular igual a zero	$p \geq 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₁ : Coeficiente angular diferente de zero	$p < 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₀ : Intercepto igual a zero	$p \geq 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₁ : Intercepto diferente de zero	$p < 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H ₀)

Ademais, trata-se de um método que pode ser aplicado de modos diferentes dependendo do comportamento das variâncias: caso elas sejam constantes, opta-se pelo método dos **mínimos quadrados ordinários**; caso não sejam constantes, opta-se pelo método dos **mínimos quadrados ponderados**, no qual há a aplicação de um fator de ponderação [27].

Construído o modelo de regressão, obtém-se o **coeficiente de correlação de Pearson (R)** entre duas variáveis, que é uma medida do grau de associação entre elas e do grau de proximidade dos dados a uma reta. Esse coeficiente pode variar de -1 a $+1$, sendo os extremos considerados correlações perfeitas (negativa ou positiva) [24,25]. Para este estudo, adotou-se como critério de aceitação um valor de R superior a 0,990 [4].

O **coeficiente de determinação (R²)**, por sua vez, explica o quanto, em termos percentuais, o modelo linear foi capaz de explicar a variação da resposta a partir dos dados, sendo uma medida estatística do quão próximos os dados estão da linha de regressão ajustada [24].

Calculou-se ainda o **coeficiente de determinação ajustado (R²_{ajustado})**, que é uma medida de qualidade de ajuste utilizada em regressão múltipla a fim de determinar o grau de intensidade ou eficácia das variáveis independentes na explicação da variável dependente. Esse coeficiente é importante, pois o R² tende a aumentar à medida que novas variáveis são adicionadas ao modelo, tornando-se necessário corrigir essa superestimação. O valor obtido para R²_{ajustado} é sempre menor ou igual ao do obtido para R² [28].

3.5.2.1.2 Teste de Cochran

O teste de Cochran permite avaliar o desvio bilateral das variâncias com um nível de significância de 5%, indicando se há ou não homogeneidade entre elas. Para tanto, avalia-se a razão C entre a maior variância, $s_{máx}^2$, e o somatório de todas as variâncias obtidas, $\sum_{i=1}^k s_i^2$, de 1 a k níveis, conforme representado na Equação 2 [29].

$$C = \frac{s_{máx}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} \quad (2)$$

Esse teste possui os critérios abaixo elencados (Quadro 4):

Quadro 4. Critérios para avaliação da homecedasticidade por do teste de *Cochran*.

Avaliação da Homocedasticidade (Teste de <i>Cochran</i>)	H ₀ : Não existe diferença significativa entre as variâncias (homocedástico)	Se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{Crítico}}$	Aceita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₁ : Existe diferença significativa entre as variâncias (heterocedástico)	Se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{Crítico}}$	Rejeita-se a hipótese nula (H ₀)

Portanto, para que as variâncias sejam consideradas homogêneas, espera-se que $C_{\text{calculado}} < C_{\text{Crítico}}$, resultado que atesta a homocedasticidade. Neste estudo, utilizou-se o $C_{\text{Crítico}}$ igual a 0,3346, referente a 15 níveis com 3 replicatas cada.

3.5.2.1.3 Teste de *Bartlett*

Em continuidade à análise de homocedasticidade dos resíduos gerados pela linearidade, utilizou-se o teste de *Bartlett*, que permite averiguar se k amostras apresentam variâncias estatisticamente iguais [30,31]. O teste apresenta os seguintes critérios (Quadro 5):

Quadro 5. Avaliação da homocedasticidade por meio do teste de *Bartlett*.

Avaliação da Homocedasticidade (Teste de <i>Bartlett</i>)	H ₀ : As variâncias são iguais	$p > 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₁ : As variâncias são diferentes	$p \leq 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H ₀)

O teste de *Bartlett* é o mais comum para averiguar igualdade de variâncias, haja vista possuir maior precisão e alto poder para a probabilidade de erro do tipo I, que ocorre quando se rejeita a hipótese nula mesmo ela sendo verdadeira [31]. Importante atentar-se ao fato de a hipótese de homogeneidade ser importante fator em análises de variâncias, uma vez que uma interpretação equivocada pode gerar heterogeneidade do erro experimental e ocasionar erros, como o anteriormente citado [32].

3.5.2.1.4 Teste de *Grubbs* (*outlier*)

A fim de avaliar a presença de *outliers*, considerados valores extremos em observações amostrais, realizou-se o teste de *Grubbs*, que possui os critérios a seguir elencados (Quadro 6, pág. 36) [33]:

Quadro 6. Critérios para avaliação de *outliers* por meio do teste de *Grubbs*.

Teste de <i>outliers</i> (Teste de <i>Grubbs</i>)	H ₀ : Todos os valores de dados são provenientes da mesma população	$p \geq 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₁ : O menor ou maior valor dos dados é um <i>outlier</i>	$p < 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H ₀)

A estatística G do teste de *Grubbs* é apresentada na Equação 3 [33].

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (3)$$

em que x_i representa o valor máximo ou mínimo de um conjunto amostral, \bar{x} representa o valor médio e s representa o desvio padrão. Se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}}$, o valor será considerado *outlier* [34]. O $G_{\text{crítico}}$ utilizado nas condições estudadas foi de 2,55.

3.5.2.1.5 Teste de *Anderson–Darling* (normalidade de resíduos)

Os resíduos gerados pela linearidade foram analisados quanto à normalidade pelo teste de *Anderson–Darling*, que permite averiguar, com certa sensibilidade, se um conjunto de dados apresenta uma distribuição normal [35]. No Quadro 7, são apresentados os critérios utilizados no teste.

Quadro 7. Critérios para avaliação de normalidade de resíduos pelo método de *Anderson–Darling*.

Normalidade dos resíduos (<i>Anderson- Darling</i>)	H ₀ : Os dados seguem uma distribuição normal	$p \geq 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H ₀)
	H ₁ : Os dados não seguem uma distribuição normal	$p < 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H ₀)

3.5.2.1.6 Teste de *Durbin–Watson*

Os resíduos gerados pela linearidade foram verificados por meio do teste de *Durbin–Watson* a fim de atestar se os erros eram independentes entre si, pois a ausência de correlação entre eles é um dos pressupostos a ser atendido no modelo de regressão [36]. Para tanto, foram considerados os seguintes critérios (**Quadro 8**):

Quadro 8. Critérios avaliados no método de *Durbin–Watson*.

Independência dos erros (Teste de <i>Durbin- Watson</i>)	Se $d > d_U$	Não existe correlação
	Se $d < d_L$	Existe uma correlação positiva
	Se $d_L < d < d_U$	Resultado inconclusivo

No Quadro 8, o termo d_U representa o limite superior do teste, enquanto o termo d_L representa o limite inferior, considerando n dados e k variáveis explicativas, de tal modo que, se d estiver fora do intervalo, $d_L < d < d_U$, se torna possível verificar a existência ou não de uma correlação [37]. Os valores de referência utilizados para d_L e d_U nas condições estudadas foram de 1,475 e 1,566, respectivamente, com $n=45$ e $k=1$.

3.5.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados por meio das Equações 4 e 5 [4], respectivamente, em que s é o desvio padrão do intercepto com o eixo y referente às três curvas analíticas (Curva A, Curva B e Curva C) e m é o valor médio das inclinações dessas curvas.

$$LD = \frac{3,3 \cdot s}{m} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{m} \quad (5)$$

3.5.4 Precisão

A precisão foi determinada baseando-se na repetibilidade e na precisão intermediária, esta realizada por um segundo analista. Em ambos os casos, procedeu-se com o preparo de seis soluções amostra, seguindo os passos descritos no subitem 3.2.6. Cada solução foi analisada em triplicata ($n = 3$).

Esse parâmetro foi avaliado por meio do DPR% [4], que, conforme norma internacional para as condições estabelecidas neste trabalho, não deveria exceder 7,3%. Ademais, para a repetibilidade e a precisão intermediária, estabeleceu-se um intervalo de recuperação de 80–110%, conforme preceitua a AOAC, do inglês *The Association of Official Analytical Chemists* [23]. Nas Equações 6 e 7, são apresentados os cálculos utilizados para determinação do DPR% e da recuperação, respectivamente.

$$DPR\% = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (6)$$

em que s representa o desvio padrão e \bar{X} a média, ambos referentes às recuperações.

$$\%Recuperação = \frac{c_o}{c_T} \cdot 100 \quad (7)$$

em que C_O representa a concentração média observada e C_T a concentração teórica/esperada.

Além disso, as variâncias e as médias de cada análise foram avaliadas por meio dos testes F (*Snedecor*) e T (*Student*) [24], a fim de verificar se eram estatisticamente semelhantes entre si. O teste F foi utilizado para avaliar se as variâncias entre a repetibilidade e a precisão intermediária eram iguais, e o teste T foi utilizado para avaliar se suas médias eram iguais, conforme critérios descritos no Quadro 9.

Quadro 9. Critérios avaliados nos testes F (*Snedecor*) e T (*Student*) para análise de variâncias e médias.

Teste F (<i>Snedecor</i>)	$H_0: \sigma_1 / \sigma_2 = 1$	$p \geq 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H_0): as variâncias são iguais
	$H_1: \sigma_1 / \sigma_2 \neq 1$	$p < 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H_0): as variâncias são diferentes
Teste T (<i>Student</i>)	$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$	$p \geq 0,05$	Aceita-se a hipótese nula (H_0): as médias são iguais
	$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$	$p < 0,05$	Rejeita-se a hipótese nula (H_0): as médias são diferentes

A estatística do teste T pode ser calculada de duas formas a depender do resultado obtido no teste F : se as variâncias forem iguais, realiza-se um cálculo; se as variâncias forem diferentes, realiza-se outro. Contudo, os critérios anteriormente apresentados para o teste T não são alterados. Com isso, torna-se possível determinar se as médias de recuperações, ainda que realizadas por diferentes analistas, são estatisticamente similares [24].

3.5.5 Exatidão

Para o estudo de exatidão, foram utilizados três níveis de concentração: 50%, 100% e 150%. Para cada nível avaliado, preparou-se uma solução, cada qual analisada em triplicata ($n = 3$).

O preparo das soluções ocorreu da seguinte forma: realizou-se a pesagem de 10,0 mg de padrão de MCF e 18,2 mg de placebo, posteriormente transferidos para um béquer de 50 mL. Ao béquer foram adicionados aproximadamente 5 mL de diluente. A solução foi levada ao ultrassom por 30 minutos até que houvesse a dissolução de parte do sólido. Por fim, ela foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10,00 mL e seu volume completado com solução diluente. Um volume determinado, específico para o nível de concentração, de cada solução foi adicionado a uma placa de aço inox de 25 cm², e, a partir desse ponto, foram seguidos os passos de secagem e transferência do sólido para tubos do tipo Falcon, conforme descrito no subitem 3.2.6. Na Tabela 4 (pág. 39), são apresentados os volumes aplicados em placa de aço inox para cada nível e as respectivas concentrações teóricas de MCF.

Tabela 4. Preparações de placebo fortificado com padrão de MCF.

Nível / %	Volume aplicado em placa / mL	Concentração de maleato de clorfeniramina / $\mu\text{g mL}^{-1}$
50	0,050	5,00
100	0,100	10,00
150	0,150	15,00

A exatidão foi avaliada por meio do percentual de recuperação do analito, que foi calculado de acordo com a Equação 7. Para atestar esse parâmetro, estabeleceu-se um intervalo de recuperação de 80–110%, conforme preceitua a AOAC [23]. Por se tratar de um método de recuperação por *swab*, há uma variabilidade intrínseca, pois ele depende da execução da técnica pelo analista [3,4].

3.5.6 Robustez

Para o estudo de robustez, foram preparadas as soluções padrão estoque (vide subitem 3.2.3), padrão controle (vide subitem 3.2.5) e amostra (vide subitem 3.2.6). A primeira foi analisada em triplicata e as demais em duplicata¹³.

Na Tabela 5, são apresentados os parâmetros analíticos que foram alterados no estudo de robustez. Os critérios de avaliação da robustez foram o DPR% das recuperações, que não poderia exceder 2%, e o percentual de recuperação utilizado para avaliação da exatidão [23].

Tabela 5. Alterações dos parâmetros analíticos para o estudo de robustez.

(continua)

Parâmetro Analítico	Condição Controle	Condição Alterada
Tempo de extração ^a	30 min	20 min
		40 min
Coluna cromatográfica	Coluna Zorbax CN SB (250 × 4,6 mm, 5 μm) – USSF036638	Coluna Hyperclone ODS C ₁₈ 120A (150 × 4,6 mm, 5 μm) – H20-126788
Temperatura	30 °C	25 °C
		35 °C

¹³ As análises foram realizadas em duplicata devido ao fato de o estudo de robustez ter sido planejado para permitir análises contínuas no cromatógrafo, e, como se tratava de um estudo longo, optou-se por reduzir o número de injeções a fim de viabilizar o teste, de modo que não fosse necessário interromper o funcionamento do equipamento para efetuar a troca de fase móvel, cuja quantidade em frasco não seria suficiente para realizar todas as análises necessárias caso se aumentasse o número de leituras. Ademais, até esse momento do estudo, não haviam sido identificadas variações entre as injeções, ou seja, os DPR% referentes às injeções estavam abaixo do valor preconizado para a adequabilidade do método.

(conclusão)

Parâmetro Analítico	Condição Controle	Condição Alterada
Fluxo da fase móvel	1,8 mL min ⁻¹	1,7 mL min ⁻¹
		1,9 mL min ⁻¹
pH da fase móvel	2,0	1,8
		2,2
Alteração do filtro	PVDF 0,22 µm	PTFE 0,22 µm
Alteração de solvente da fase móvel	Metanol	Acetonitrila

^a O tempo de extração se refere ao período em que a solução amostra permaneceu exposta no ultrassom, conforme procedimento descrito no subitem 3.2.6.

3.5.7 Estabilidade de solução

Para o estudo de estabilidade de solução, foram preparadas as soluções padrão estoque (vide subitem 3.2.3), padrão controle (vide subitem 3.2.5) e amostra (vide subitem 3.2.6). As duas primeiras foram analisadas em triplicata e a solução amostra em duplicata¹⁴.

Após o preparo, todas as soluções foram analisadas e os resultados obtidos considerados os valores de referência (tempo zero). Posteriormente, elas foram armazenadas sob refrigeração, aproximadamente 4 °C, durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. Em cada intervalo, realizaram-se análises das soluções, cujos resultados foram comparados com os do tempo zero a fim de avaliar o DPR%, que não poderia exceder a 2%.

¹⁴ Idem à nota 14 na página anterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para proceder com as análises dos parâmetros de validação, fez-se necessário realizar estudos de adequabilidade do sistema antes de cada sequência de corridas cromatográficas, conforme descrito no subitem 3.4.

4.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Os resultados médios obtidos para a adequabilidade do sistema cromatográfico a partir das injeções de soluções padrão são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos parâmetros de Adequabilidade do Sistema Cromatográfico.

Estudo	Parâmetro		
	Pratos teóricos (≥15.000)	Assimetria (≤2,000)	DPR% (≤2,000%)
Seletividade	26.371	1,306	0,318
Linearidade ^a	23.307	1,175	0,119
Precisão (repetibilidade e intermediária)	26.371	1,306	0,318
Exatidão	26.107	1,234	0,510
Robustez – Alteração dos Parâmetros Analíticos			
Condição controle	29.671	1,174	0,302
Temperatura – Coluna 25 °C	28.465	1,174	0,106
Temperatura – Coluna 35 °C	30.592	1,160	0,349
Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	31.575	1,171	0,681
Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	28.257	1,165	0,131
Alteração de coluna	11.539	1,712	10,995
Alteração de pH (1,8)	30.186	1,100	0,587
Alteração de pH (2,2)	22.975	1,312	0,173
Alteração de solvente (acetonitrila)	45.440	1,169	0,328
Robustez – Estabilidade de solução			
Condição controle	22.517	1,237	0,349
24 h	24.152	1,248	0,309
48 h	24.229	1,249	0,329
72 h	26.669	1,214	0,221

^a Utilizou-se o ponto de 10 µg mL⁻¹ da curva B para análise da adequabilidade no estudo de linearidade.

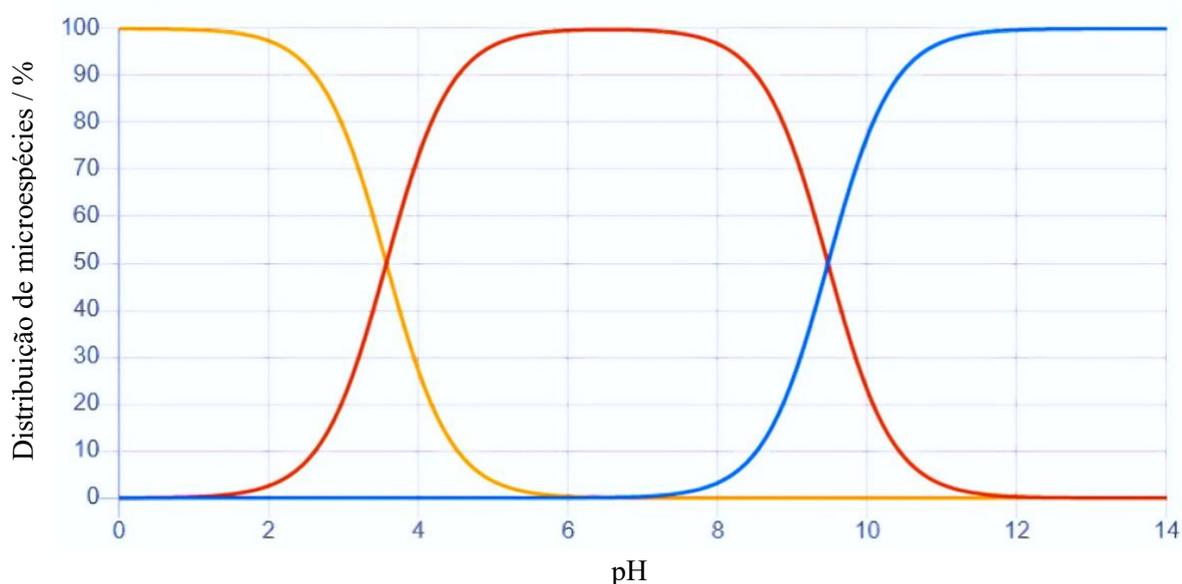
Analisando-se a Tabela 6, observa-se que os critérios de aceitação para os parâmetros definidos foram cumpridos, haja vista os valores de pratos teóricos terem sido superiores a 15.000, os de assimetria inferiores a 2 e os de DPR% inferiores a 2%. Apenas para o ensaio de alteração de coluna, em que se optou pela utilização de uma coluna cromatográfica do tipo Hyperclone ODS

solvente e a coluna cromatográfica utilizados, que apresentam relevância próxima entre si [8,19,38].

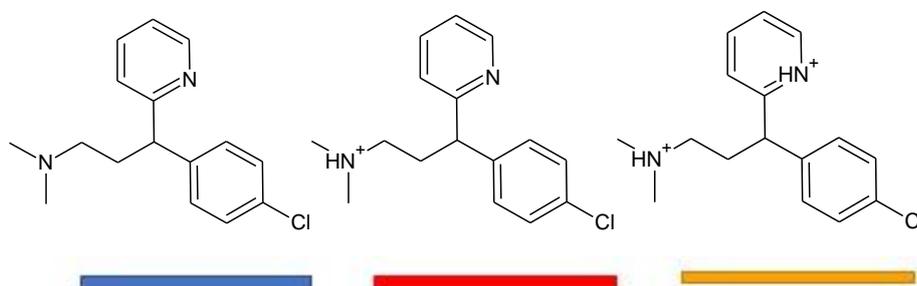
Na Figura 8, são apresentadas a curva de distribuição de microespécies de clorfeniramina em função do pH e as estruturas químicas existentes em cada faixa, destacando-se em amarelo a estrutura protonada predominante em pH 2,0. Conforme citado anteriormente, nessa condição, a molécula de clorfeniramina apresenta carga 2+, o que favorece uma maior interação e conseguinte retenção na coluna cromatográfica do tipo Zorbax CN SB.

Figura 8. (a) Gráfico de distribuição de microespécies da molécula de clorfeniramina em função do pH e (b) suas respectivas estruturas químicas.

(a)



(b)



Fonte: Gráficos e estruturas moleculares disponibilizados pelo colaborador da indústria farmacêutica localizada em Betim, que os obteve via site <https://chemicalize.com/>.

Conforme citado, o método proposto buscou otimizar outro já existente e aplicado na indústria farmacêutica localizada na cidade de Betim, no qual se utiliza o solvente acetonitrila

como fase orgânica. Portanto, buscou-se com este estudo substituir a acetonitrila por metanol devido, principalmente, à baixa disponibilidade daquele solvente no mercado aliada a seu elevado custo e sua maior toxicidade. Na época da realização dos estudos experimentais (segundo semestre de 2021 – período da pandemia de Covid-19), a aquisição de acetonitrila foi dificultada devido à baixa na produção global. Desse modo, era de suma importância desenvolver um método validado que utilizasse um solvente de fácil obtenção, como o metanol. Ademais, a molécula de metanol apresenta características que facilitam sua escolha, como corte na região do ultravioleta de 205 nm, próximo aos 190 nm da molécula de acetonitrila [39], e sua polaridade, que é relativamente próxima à da molécula de acetonitrila [8].

4.2 Seletividade

Os resultados das áreas das soluções amostra – recuperação com um *swab* e com dois *swabs* –, placebo, placebo fortificado com padrão e diluente são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados avaliados no estudo de seletividade.

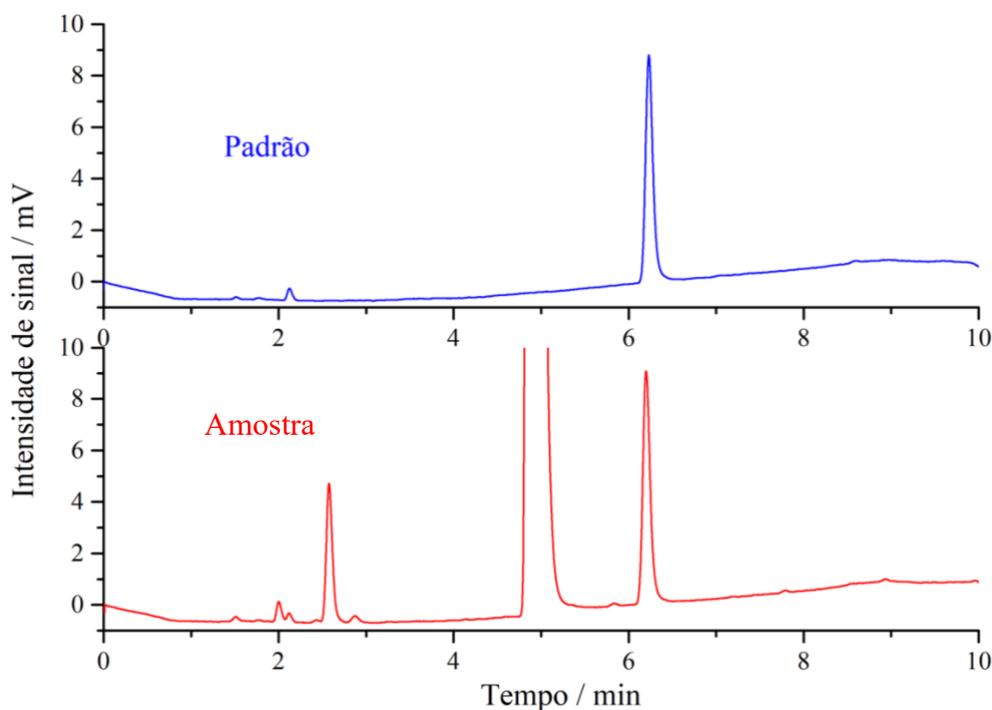
Solução	Replicata	Concentração ^a / µg mL ⁻¹	Área	Recuperação / %	Recuperação / µg mL ⁻¹	Recuperação média / %	Recuperação média / µg mL ⁻¹	DPR%
Amostra com um <i>swab</i>	1	10,00	45580	84,85	8,47	85,86	8,49	0,25
	2	10,00	45681	84,84	8,48			
	3	10,00	45805	85,07	8,51			
Amostra com dois <i>swabs</i>	1	10,00	54642	101,49	10,15	101,11	10,11	0,33
	2	10,00	54380	101,00	10,10			
	3	10,00	54295	100,84	10,08			
Diluente	1	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,00	0,00	0,00	0,00			
	3	10,00	0,00	0,00	0,00			
Placebo	1	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	10,00	0,00	0,00	0,00			
	3	10,00	0,00	0,00	0,00			
Placebo contaminado	1	10,00	52029	96,77	9,68	96,54	9,65	0,22
	2	10,00	51874	96,49	9,65			
	3	10,00	51803	96,35	9,64			

^a Trata-se da **concentração teórica** do ativo MCF avaliada neste trabalho, que, para fins de análise, seria obtida em todos os cromatogramas, incluindo nas soluções diluente e placebo.

Pelos resultados apresentados na Tabela 7, infere-se que a recuperação realizada com dois *swabs* foi mais eficiente que a realizada com apenas um. Isso pode estar relacionado ao fato de os resquícios de fármaco que permanecem após a utilização do primeiro *swab* serem recuperados e incorporados à solução contida no tubo de tipo Falcon, uma vez que o primeiro *swab* pode ter sido saturado com o sólido oriundo da solução amostra, dificultando a recuperação integral do analito em um primeiro momento.

As soluções diluente e placebo não apresentaram picos que pudessem interferir na quantificação do ativo MCF, fato constatado após análise visual dos cromatogramas, que foram obtidos por meio de integração automática no *software* LabSolutions SC, em comprimento de onda de 271 nm. Na Figura 9, são apresentados os cromatogramas obtidos para as soluções padrão e amostra, recuperação com dois *swabs*, nos quais os picos de MCF aparecem em torno de 6,20 minutos. Pelo aspecto apresentado, observa-se que, em conformidade com os resultados apresentados na Tabela 6 (pág. 41), os picos referentes ao fármaco apresentam considerável simetria.

Figura 9. Em azul, está representado o cromatograma da solução padrão e, em vermelho, está representado o cromatograma da solução amostra. Observa-se que o pico de interesse aparece em torno de 6,20 minutos.



Ressalte-se, todavia, que a constatação de coeluição, em se tratando de cromatografia líquida, é realizada por meio de um detector do tipo DAD, do inglês *Diode Array Detector*, que permite a construção de um gráfico tridimensional que relaciona a intensidade do sinal, o tempo

de retenção e os espectros de absorção molecular associados a cada pico cromatográfico. Dessa forma, torna-se possível confirmar se há a presença de interferentes em determinado pico, que, no *software* LabSolutions SC, é identificada quando o parâmetro *Similarity*, que diz respeito à similaridade do espectro do analito estudado em relação a um espectro de referência, é inferior ao *Threshold*, parâmetro que define o valor teórico mínimo de uma dada distribuição [40]. Entretanto, o equipamento utilizado não dispunha desse detector, impossibilitando essa avaliação.

Portanto, após avaliação dos cromatogramas da Figura 9 e dos dados presentes na Tabela 7, infere-se que o método proposto foi seletivo, não tendo sido possível, contudo, precisar acerca da pureza do pico do ativo MCF.

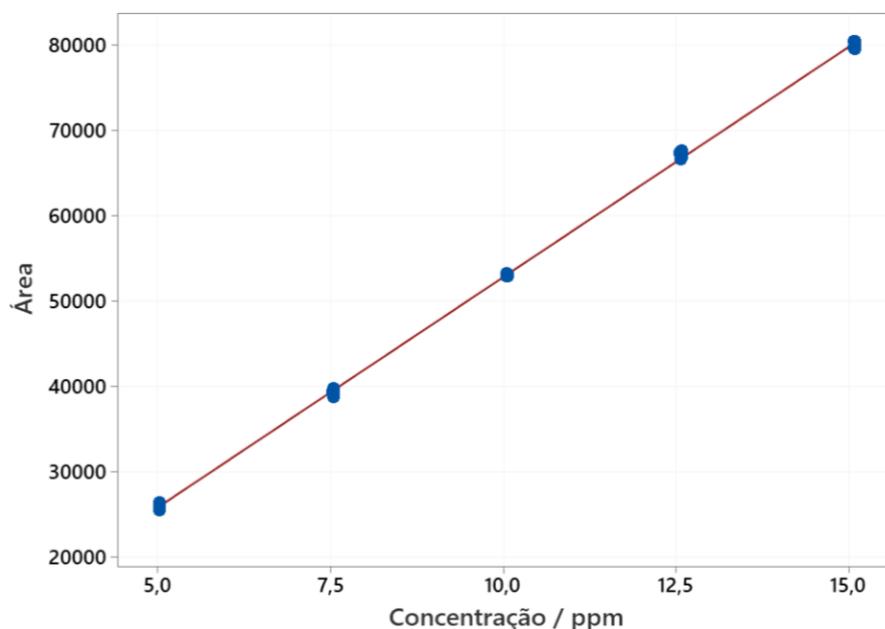
4.3 Linearidade

Os dados obtidos a partir das corridas cromatográficas foram lançados no *software* Minitab® a fim de estimar a equação pelo método dos **mínimos múltiplos quadrados**. Na Figura 10, é apresentada a reta obtida após o estudo de linearidade. Ao realizar uma inspeção visual no gráfico da figura, infere-se que a curva é apropriada para o modelo linear, uma vez que os pontos dispostos no gráfico possuem relação linear aparente. A seguir, é descrita a equação da reta estimada para o modelo:

$$A = -1081 + 5390 \cdot C \quad (6)$$

em que A é a área sob o pico cromatográfico e C é a concentração teórica de MCF.

Figura 10. Gráfico de linha ajustado para o modelo linear referente ao fármaco MCF.



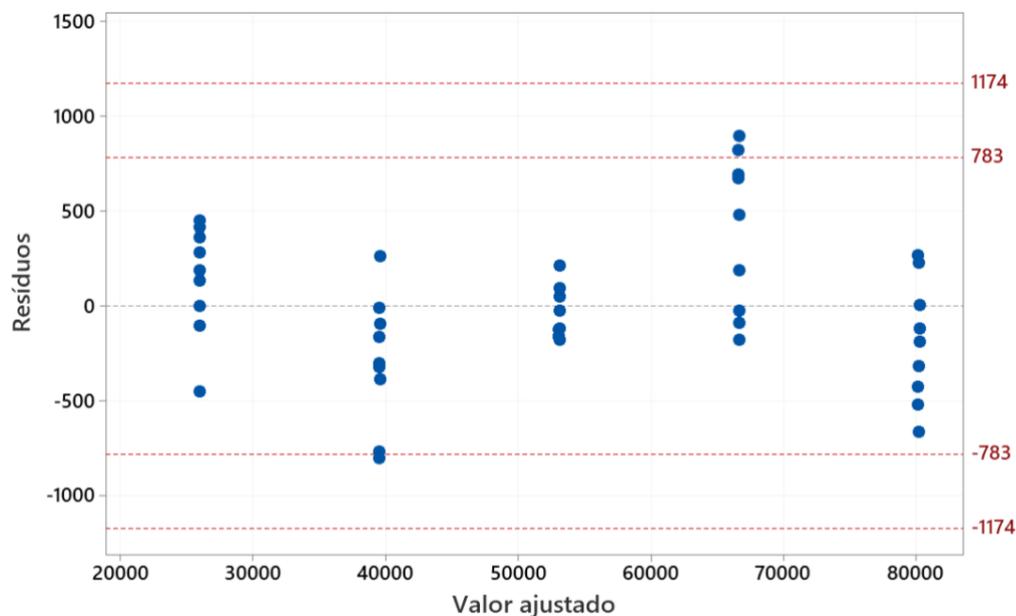
Buscou-se, por meio da aleatorização das sequências de preparo e análise das soluções, reduzir, ao máximo, possíveis erros sistemáticos, permanecendo apenas os erros intrínsecos ao sistema utilizado, conhecidos como erros aleatórios [26]. Os erros aleatórios e seus possíveis efeitos sobre o modelo podem ser quantificados por meio de análises estatísticas [41]. Todavia, para saber se os dados obtidos apresentaram erros majoritariamente aleatórios, realizou-se a avaliação da homocedasticidade do modelo, conforme descrito a seguir.

4.3.1 Avaliação da homocedasticidade

a) Teste de Cochran

A homocedasticidade dos dados foi avaliada, inicialmente, por meio de inspeção visual do gráfico apresentado na Figura 11. Os valores -783 , -1174 , 783 e 1174 foram definidos multiplicando-se o desvio padrão s ($391,4$), referente às áreas utilizadas na regressão linear, pelos fatores ± 2 e ± 3 , que representam as quantidades de desvios padrões utilizados. São considerados anômalos os valores que ultrapassem os limites inferior (-1174) e/ou superior (1174), que correspondem a três desvios padrões.

Figura 11. Gráfico de valor ajustado em relação aos resíduos.



Observa-se que a dispersão dos resíduos, estes distribuídos aleatoriamente, em torno da média apresenta um aspecto homecedástico para a distribuição. A ausência de curvatura ou de formação de cones no gráfico indica a adequabilidade do modelo, pois, em havendo esses fatores, observar-se-ia uma tendência na dispersão dos dados, o que poderia indicar, no caso de formação

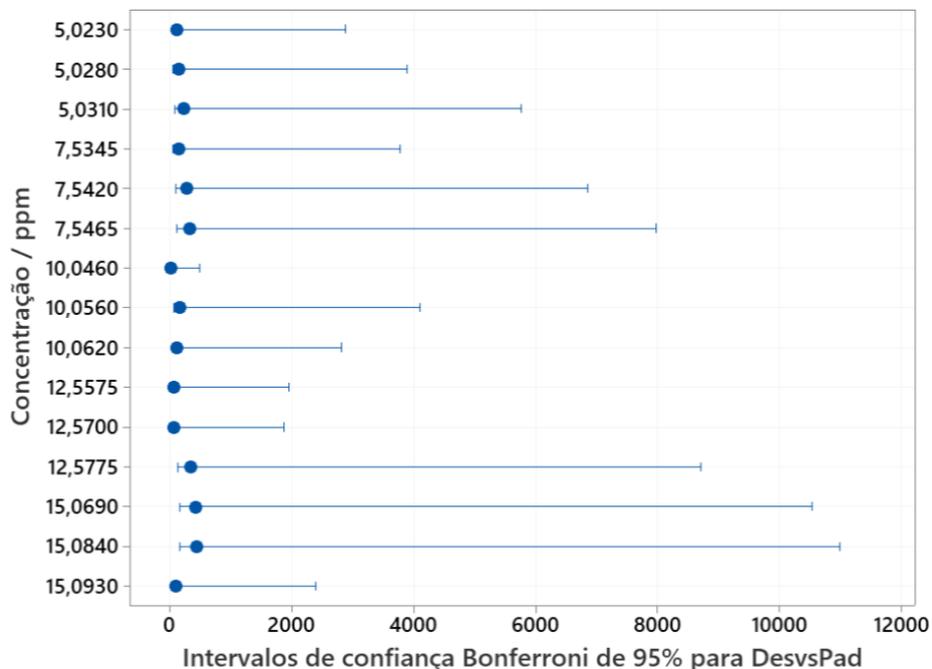
de cones, heterocedasticidade na distribuição dos resíduos ou que o modelo, caso houvesse a formação de curva, seria quadrático.

Posteriormente, para sequência da avaliação de homocedasticidade, foram analisados os parâmetros do teste de *Cochran*. Para 15 níveis, uma vez que havia três curvas analíticas, cada qual com 5 níveis de concentração, e 3 replicatas para cada nível, totalizando 45 dados, o $C_{\text{crítico}}$ é igual a 0,3346. O $C_{\text{calculado}}$ foi de 0,2291. Diante deste resultado, em que $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$, aceita-se a hipótese nula, visto que não há diferença significativa entre as variâncias nos níveis testados. Portanto, conclui-se que, após realização do teste de *Cochran*, a dispersão das variâncias apresentou aspecto homocedástico, corroborando com a interpretação feita do gráfico da Figura 11.

b) Teste de Bartlett

Na Figura 12, é apresentado um gráfico representativo da igualdade de variâncias obtida no teste de *Bartlett*. Analisando-se o gráfico, observa-se que os intervalos de comparações se sobrepõem, indicando que as diferenças entre os grupos apresentados não são estatisticamente significantes, o que é atestado pelo p -valor obtido, 0,087. Com isso, a hipótese nula deve ser aceita, o que robustece a conclusão obtida no teste de *Cochran*.

Figura 12. Teste de *Bartlett* para igualdade de variâncias.



Destarte, levando-se em consideração os resultados obtidos pelos testes de *Cochran* e *Bartlett*, em que houve, em ambos os casos, aceitação das hipóteses nulas, conclui-se que o modelo estudado apresentou aspecto homocedástico quanto à dispersão de resíduos.

4.3.2 Teste de Grubbs (outlier)

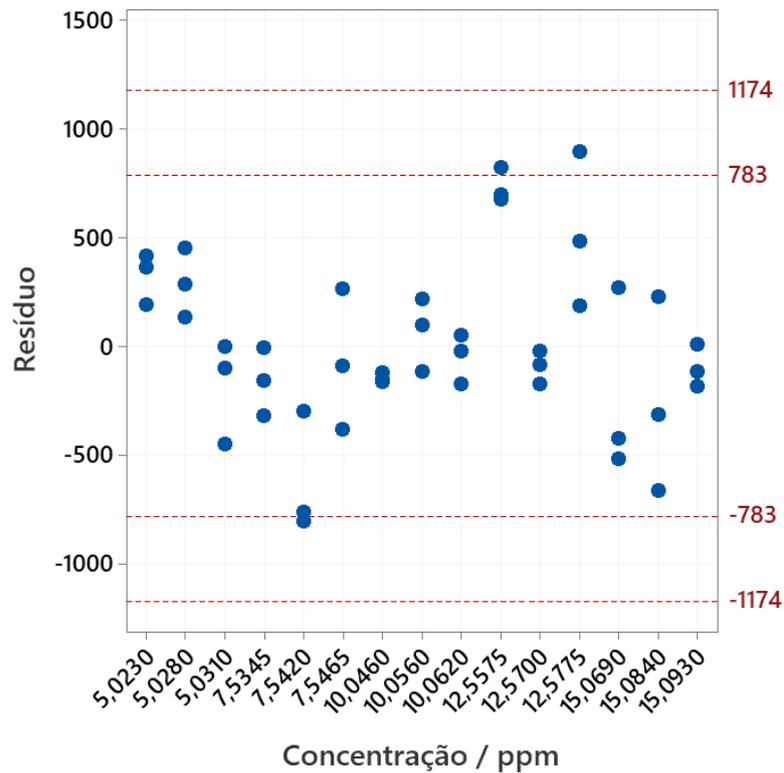
Na Tabela 8, são apresentados os valores $G_{\text{calculados}}$ e o p -valor obtidos para cada nível de concentração avaliado no teste. Por meio dos dados apresentados, observa-se que todos os p -valores obtidos foram superiores a 0,05, indicando aceitação da hipótese nula. Portanto, conclui-se que não há evidências suficientes para atestar a presença de *outliers* no conjunto amostral, sugerindo, com isso, que todos os dados são provenientes da mesma população. Ademais, todos os $G_{\text{calculados}}$ foram inferiores ao $G_{\text{crítico}}$, que vale 2,55, reforçando a interpretação apresentada.

Tabela 8. $G_{\text{calculado}}$ e p -valor para cada nível de concentração.

Concentração / $\mu\text{g mL}^{-1}$	$G_{\text{calculado}}$	p -valor
5,02	1,13	0,43
5,03	1,02	0,92
5,03	1,13	0,42
7,53	1,01	0,98
7,54	1,15	0,13
7,55	1,03	0,89
10,05	1,14	0,30
10,06	1,08	0,69
10,06	1,10	0,62
12,56	1,15	0,24
12,57	1,06	0,79
12,58	1,05	0,81
15,07	1,15	0,21
15,08	1,06	0,76
15,09	1,09	0,66

Na Figura 13 (pág. 51), é apresentada a dispersão dos resíduos em função das concentrações, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ou ppm).

Figura 13. Gráfico para teste de *outliers*.



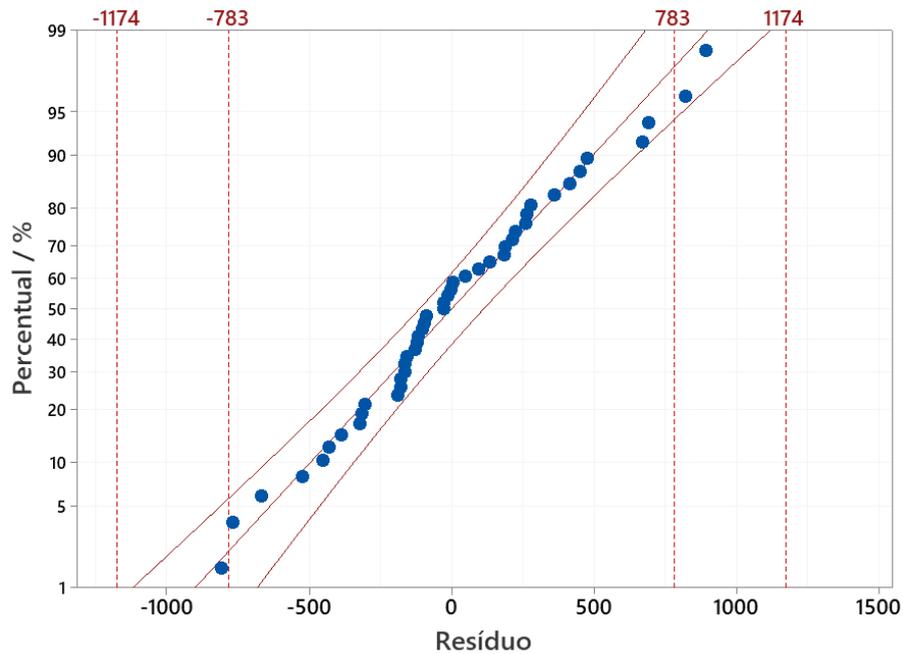
Por meio do gráfico, observa-se que nenhum resíduo ultrapassou os limites inferior e superior (respectivamente -1174 e 1174) do intervalo de confiança, indicando ausência de *outliers*.

4.3.3 Teste de Anderson–Darling (normalidade de resíduos)

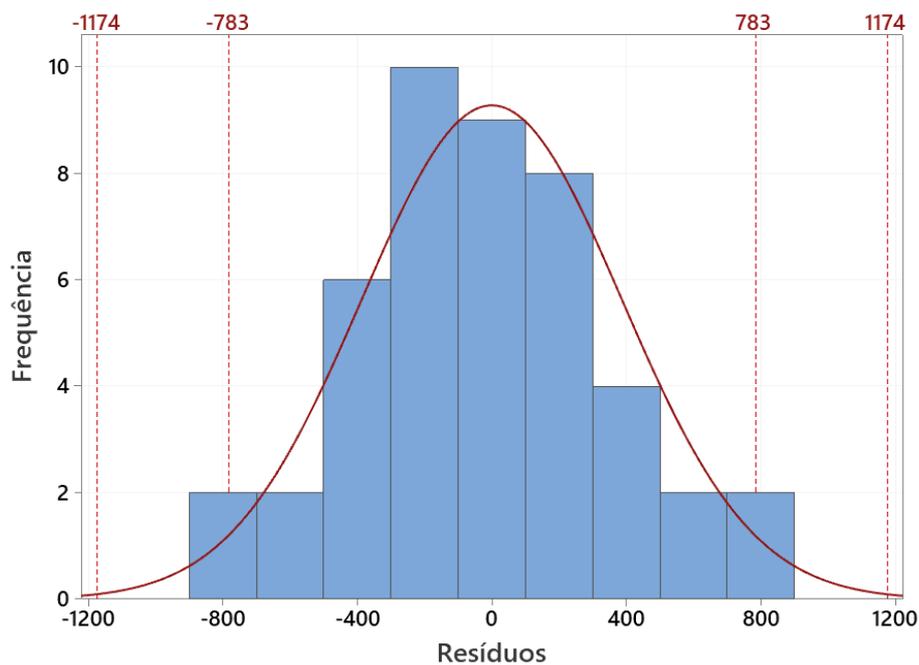
O p -valor obtido pelo método de *Anderson–Darling* foi de 0,50, indicando a aceitação da hipótese nula, e, por conseguinte, atestando que se trata de uma distribuição normal de resíduos. O gráfico de probabilidade de resíduos (Figura 14a, pág. 52) e o histograma de resíduos (Figura 14b, pág. 52) também indicam uma distribuição normal, corroborando com o resultado observado.

Figura 14. Em (a) é apresentado o gráfico de normalidade dos resíduos e em (b) um histograma que indica sua distribuição normal.

(a)



(b)



A estatística de *Anderson–Darling* foi calculada, no *software* Minitab[®], definindo-se a distância ao quadrado ponderada entre a linha ajustada do gráfico de probabilidade¹⁵ e a função de etapa não-paramétrica. O cálculo é mais fortemente ponderado nas caudas da distribuição [42]. Na Figura 14a, observa-se que os resíduos estão dispersos dentro dos limites indicados pelas linhas

¹⁵ Baseando-se, todavia, na distribuição escolhida e usando o método de estimativas de mínimos quadrados [42].

contínuas vermelhas, demonstrando que a distribuição normal fornece um bom ajuste para o modelo em questão.

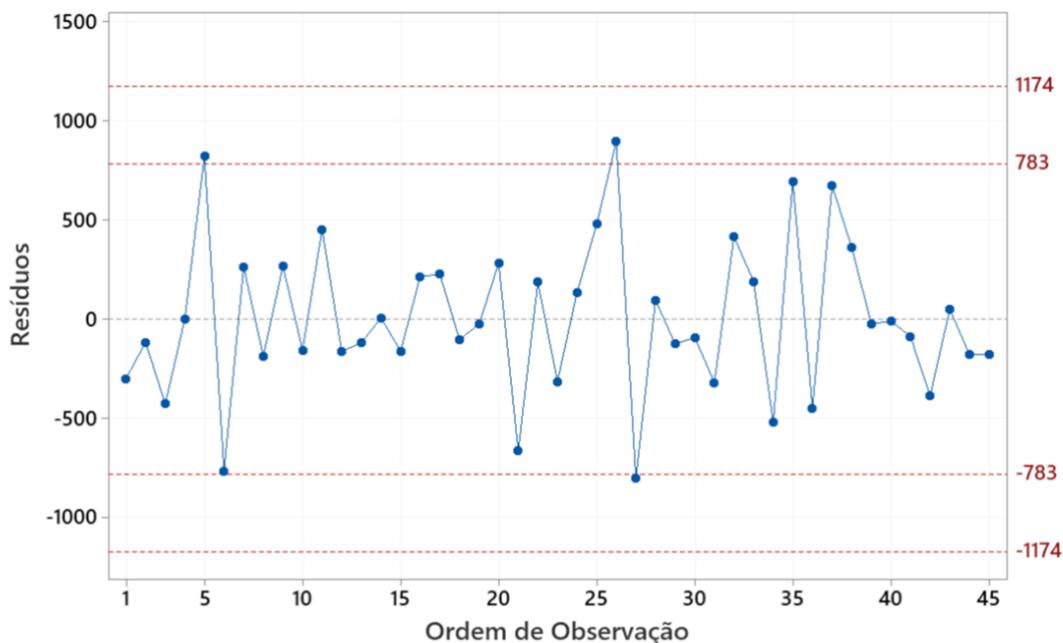
Em continuidade à análise, buscou-se verificar o comportamento de normalidade avaliando-se o histograma da Figura 14b. De acordo com o **Teorema Central do Limite**, a distribuição da soma de muitas variáveis independentes entre si, e de mesma distribuição, tende à normalidade (padrão de *gaussiana*) à medida que o número de variáveis aumenta [43]. Essa tendência é observada no gráfico da Figura 14b, que apresenta aspecto de distribuição normal centrada na origem, na qual cerca de 95% das observações encontram-se no intervalo de dois desvios padrões da média (-783 e 783), estando fora deste intervalo, portanto, cerca de 5% das observações.

4.3.4 Teste de Durbin–Watson

O valor d obtido foi de $2,762$, ou seja, $d > d_U$ (o valor d_U de referência é igual a $1,566$). Conclui-se, portanto, que não existe correlação entre os resíduos, o que significa dizer que os erros referentes a uma observação não influenciam erros associados a outra.

Na Figura 15, observa-se, graficamente, a distribuição desses resíduos e como os pontos não possuem um comportamento que se repete, evidenciando a ausência de tendências e, por consequência, a independência dos resíduos.

Figura 15. Gráfico de dispersão de resíduos em função da ordem de observação.



Ressalte-se a importância de verificar se há correlação entre os erros, pois, em havendo, a regressão pelo método dos **mínimos múltiplos quadrados** pode subestimar o erro padrão dos coeficientes, gerando interpretações errôneas de seus preditores, fazendo com estes sejam considerados significativos quando não o são [44]. Como não houve essa correlação, procedeu-se com a aplicação do método, a seguir descrito, partindo-se da premissa de não correlação entre erros.

4.3.5 ANOVA – Mínimos Múltiplos Quadrados

A fim de verificar se o modelo era significativo, os dados gerados pelas corridas cromatográficas do padrão de MCF para a construção da curva analítica foram submetidos ao método dos mínimos múltiplos quadrados, conforme descrito no subitem 3.5.2.1.1. Consoante explanado no teste de *Cochran* (subitem 4.3.1a), as variâncias apresentaram comportamento homocedástico, indicando que são constantes. Com isso, o método dos mínimos quadrados ordinários mostrou-se adequado para ser aplicado neste trabalho, tendo sido utilizado na construção do modelo. Ademais, os erros demonstraram não possuir correlação entre si (subitem 4.3.4), o que reduz a probabilidade de uma má interpretação dos preditores obtidos após aplicação do método.

Na Tabela 9, são apresentados os resultados estatísticos obtidos para o modelo de regressão.

Tabela 9. Resultados estatísticos da linearidade pelo método mínimos múltiplos quadrados.

Estatísticas de regressão	
R	0,9998
R²	0,9996
R²_{ajustado}	0,9996
Erro padrão	391,4
Observações	45
Inclinação	5389,5
Intercepto	-1081,0

Pelos resultados apresentados, observa-se que o modelo é linear, visto que o coeficiente de correlação R foi superior a 0,990, conforme especificação da RDC 166/17. O coeficiente de determinação R² indica o quão bem a linha de regressão se ajustou aos dados, medindo o quanto da variação da resposta (A) foi explicada pela variável concentração (C). Portanto, quanto mais próximo de 1,0000, melhor a linha terá se ajustado aos dados. Neste trabalho, o R² obtido foi de

0,9996, o mesmo valor observado para R^2_{ajustado} , indicando que o modelo foi capaz de explicar 99,96% da variabilidade dos dados de resposta ao redor de sua média.

O p -valor calculado para o coeficiente angular foi de 0,00, indicando a rejeição da hipótese nula. Com isso, ele foi considerado diferente de zero. Já o p -valor calculado para o intercepto foi de 0,00, indicando, novamente, a rejeição da hipótese nula, ou seja, assim como o coeficiente angular, o intercepto é diferente de zero. Com isso, torna-se necessário determinar seu impacto, visto que ele é estatisticamente significativo [45], na resposta realizando a divisão do valor encontrado pelo valor médio do ponto central da curva analítica ($10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após a realização desse cálculo, chegou-se a um percentual absoluto de $-2,04\%$. Para uma faixa de concentração de 80–120%, pode-se utilizar uma extrapolação máxima para o intercepto de 5,5% [46], tornando o percentual obtido aceitável para os limites estudados neste trabalho. Com isso, o percentual absoluto de $-2,04\%$ foi considerado estatisticamente significativo, mas não apresentou relevância prática para o modelo [45,46].

4.3.6 Conclusões sobre os resultados obtidos no teste de linearidade

O modelo de regressão gerado no estudo do padrão de MCF apresentou respostas diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma relação linear na faixa estabelecida do valor especificado (50–150%). As três curvas preparadas independentemente tiveram seus resíduos dispersos em distribuição normal sem que houvesse *outliers* ou tendência funcional. A homocedasticidade foi atestada pelos testes de *Cochran* e *Bartlett*. O coeficiente angular demonstrou ser diferente de zero e o desvio observado para o intercepto não apresentou relevância prática para o modelo. Diante dos resultados apresentados, a linearidade gerada pela curva do padrão de MCF atende a todos os requisitos descritos na RDC 166/17.

4.4 Limites de detecção e quantificação

Os resultados obtidos a partir das três curvas analíticas e utilizados para avaliar os parâmetros limites de detecção e quantificação são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros concentração e área das curvas analíticas utilizados para determinação dos limites de detecção e quantificação.

Padrão	Concentração / $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Curva A)	Área A	Concentração / $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Curva B)	Área B	Concentração / $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Curva C)	Área C
Maleato de clorfeniramina	5,02	26180	5,03	26152	5,03	26032
	5,02	26353	5,03	26469	5,03	25931
	5,02	26406	5,03	26299	5,03	25583
	7,53	39206	7,54	38801	7,55	39498
	7,53	39516	7,54	39265	7,55	39855
	7,53	39364	7,54	38762	7,55	39204
	10,05	52937	10,06	52999	10,06	53124
	10,05	52899	10,06	53211	10,06	53197
	10,05	52906	10,06	53330	10,06	52971
	12,56	67271	12,57	66639	12,58	67600
	12,56	67292	12,57	66577	12,58	67185
	12,56	67419	12,57	66487	12,58	66892
	15,07	79612	15,08	80441	15,09	80143
	15,07	80400	15,08	79900	15,09	80076
	15,07	79706	15,08	79549	15,09	80270

Na Tabela 11, são apresentados os parâmetros intercepto e inclinação e seus respectivos valores para cada curva analítica, bem como a média e o desvio padrão associados a eles.

Tabela 11. Valores de intercepto e inclinação para os parâmetros limites de detecção e quantificação.

	Intercepto	Inclinação
Curva A	-896,4	5381,3
Curva B	-983,2	5367,5
Curva C	-1363,4	5419,8
Média	-1081,0	5389,5
Desvio padrão	248,4	27,1

Os limites de detecção e quantificação para o analito MCF foram iguais a $0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,46 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes estão abaixo da concentração limite estudada, $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando que o método foi capaz de detectar e quantificar de forma satisfatória baixas concentrações do composto.

Por mais que não tenham sido encontrados estudos, na literatura, que tenham utilizado metodologia similar à deste trabalho, serão apresentadas algumas abordagens a fim de demonstrar como têm sido avaliados alguns parâmetros nos estudos de validação do fármaco MCF quando presente em composições farmacêuticas. Em estudo realizado por Nabi *et al* [14], os autores valeram-se de uma metodologia diferente para avaliar simultaneamente os fármacos paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina, utilizando, para tanto, uma coluna cromatográfica Princenton C₁₈ ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) e como fase móvel (pH 2,5) uma solução tampão fosfato e acetonitrila (95:5) em fluxo isocrático. Como resultado, obtiveram limites de detecção e quantificação iguais a $0,031 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,093 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A faixa utilizada para construção da curva analítica foi de $16,25\text{--}390 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em outro estudo, este realizado por Nezhadali *et al* [19], os autores valeram-se de uma abordagem diferente da anterior, utilizando – a fim de estudar simultaneamente os fármacos guaifenesina, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina – uma fase móvel (pH 5,5) composta por tampão fosfato e metanol (85:15) e uma coluna cromatográfica FENIL ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). Como resultado, obtiveram limites de detecção e quantificação iguais a $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A faixa utilizada para construção da curva analítica foi de $7,1\text{--}12,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Um estudo mais antigo, realizado por Senyuva e Özden [47], traz outra metodologia para análise simultânea dos fármacos paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina, utilizando como fase móvel (pH 6,22) uma solução tampão fosfato e acetonitrila (78:22) e coluna cromatográfica $\mu\text{Bondapak CN RP}$ ($150 \times 3,9 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$). Como resultado,

obtiveram limites de detecção e quantificação iguais a $0,028 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,184 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A faixa utilizada para construção da curva analítica foi de $0,3\text{--}10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os estudos apresentaram em comum a utilização de algum tipo de solução tampão, que, conforme discutido no subitem 4.1, pode ser prejudicial para a vida útil da coluna analítica e para todo sistema cromatográfico [48]. Todavia, é comum encontrar trabalhos na literatura que busquem o ajuste de pH por meio de soluções tampão e que apresentem bons resultados em termos de detecção e quantificação, dentre outros parâmetros, conforme visto nos três estudos apresentados, ainda que tenham utilizado diferentes metodologias [14,19,47].

Neste trabalho, contudo, mostrou-se possível aplicar um ajuste de pH sem a utilização de um sistema tamponado e obter limites de detecção e quantificação satisfatórios. A não utilização de soluções tampão dentro do contexto industrial pode reduzir custos no processo, que englobam, dentre inúmeros fatores, seu preparo, pois inclui a compra dos ácidos, sais e solventes, além de vidrarias, e a manutenção de equipamentos, incluindo cromatógrafos e colunas cromatográficas, que podem ser danificados devido à formação de sais [48].

4.5 Precisão

Na Tabela 12, são apresentados os resultados obtidos para o parâmetro precisão repetibilidade.

Tabela 12. Resultados obtidos para o parâmetro precisão repetibilidade.

Amostra	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação / %	Média da Recuperação / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média da Recuperação / %	DPR%
1	1	10,00	52252	9,70	97,00	9,69	96,83	0,224
	2	10,00	52028	9,66	96,59			
	3	10,00	52197	9,69	96,90			
2	1	10,00	52311	9,72	97,11	9,70	96,92	0,283
	2	10,00	52036	9,66	96,60			
	3	10,00	52268	9,71	97,03			
3	1	10,00	51676	9,60	95,94	9,59	95,89	0,192
	2	10,00	51738	9,61	96,05			
	3	10,00	51544	9,57	95,69			
4	1	10,00	53002	9,84	98,40	9,88	98,81	0,361
	2	10,00	53308	9,90	98,97			
	3	10,00	53357	9,91	99,06			
5	1	10,00	53271	9,89	98,90	9,88	98,76	0,641
	2	10,00	52825	9,81	98,07			
	3	10,00	53495	9,94	99,31			
6	1	10,00	53490	9,93	99,30	9,91	99,03	0,497
	2	10,00	53506	9,94	99,33			
	3	10,00	53039	9,85	98,47			

Já na Tabela 13, são apresentados os resultados obtidos para o parâmetro precisão intermediária.

Tabela 13. Resultados obtidos para o parâmetro precisão intermediária.

Amostra	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação / %	Média da Recuperação / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Média da Recuperação / %	DPR%
1	1	10,00	50818	9,44	94,42	9,36	93,56	1,005
	2	10,00	50422	9,37	93,69			
	3	10,00	49813	9,26	92,56			
2	1	10,00	50975	9,47	94,71	9,44	94,40	0,493
	2	10,00	50517	9,39	93,86			
	3	10,00	50921	9,46	94,61			
3	1	10,00	50952	9,47	94,67	9,43	94,34	0,362
	2	10,00	50585	9,40	93,99			
	3	10,00	50784	9,44	94,36			
4	1	10,00	55284	10,27	102,72	10,27	102,74	0,795
	2	10,00	55735	10,36	103,56			
	3	10,00	54856	10,19	101,93			
5	1	10,00	54252	10,08	100,80	10,04	100,40	0,608
	2	10,00	53659	9,97	99,70			
	3	10,00	54201	10,07	100,71			
6	1	10,00	51857	9,64	96,35	9,60	95,98	0,399
	2	10,00	51666	9,60	96,00			
	3	10,00	51445	9,56	95,59			

Neste estudo, foram obtidos 1,32% e 3,70% de DPR% para a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Em trabalhos recentes, nos quais os autores utilizaram diferentes abordagens com o intuito de validar métodos para determinação simultânea de MCF e outros fármacos, mas se valendo de fases móveis tamponadas, foram observados valores de DPR% que estavam de acordo com os mesmos critérios da AOAC abordados neste trabalho. Como exemplo¹⁶, Aldewachi e Omar [49] utilizaram cinco amostras para determinação do DPR% e obtiveram valores para a repetibilidade e a precisão intermediária de 1,50% e 2,14%, respectivamente. Por sua vez, Bachute *et al* [18] obtiveram, para os mesmos parâmetros e utilizando seis amostras, 0,11% e 0,12%.

Abaixo, na Tabela 14, são apresentados os resultados obtidos na avaliação do DPR% entre a precisão repetibilidade e a precisão intermediária.

Tabela 14. Resultados obtidos na avaliação do DPR% entre a precisão repetibilidade e a precisão intermediária.

Parâmetro	
Média de recuperação / %	97,30
Desvio padrão / %	2,685
DPR%	2,759

Analisando-se os resultados apresentados, o DPR% entre a repetibilidade e a precisão intermediária de MCF, 2,8%, cumpriu o critério de aceitação estabelecido, pois $DPR\% \leq 7,3\%$. Ademais, a média de recuperação obtida também se encontrou dentro da faixa preconizada [23].

Mais uma vez, mostrou-se ser possível atender às especificações de normas na validação da metodologia analítica proposta cujo pH precisa ser controlado, sem, contudo, dispor de soluções tamponadas.

O *p*-valor obtido para o teste *F* foi de 0,00, indicando que as variâncias entre a repetibilidade e a precisão intermediária foram iguais. A diferença observada entre elas pode estar relacionada às formas de execução do processo de recuperação do analito aplicadas pelos analistas, visto que o emprego de força sobre a haste do *swab* pode interferir diretamente na quantidade de fármaco recuperado.

Com base no resultado anterior, realizou-se o teste *T* para variâncias diferentes, cujo *p*-valor foi de 0,38, indicando que as médias obtidas para a repetibilidade e a precisão intermediária foram iguais, ou seja, as médias das recuperações realizadas pelos dois analistas

¹⁶ Ressalte-se que, assim como tratado no subitem 4.4, o objetivo de apresentar esses estudos não envolve uma comparação direta entre os valores dos parâmetros analíticos, haja vista tratar-se de metodologias distintas, mas envolve o desenvolvimento da ideia apresentada neste trabalho, que foi propor um método analítico validado capaz de gerar bons resultados para a indústria parceira e minimizar riscos de operação pela utilização de soluções tamponadas.

foram consideradas estatisticamente iguais, embora as variâncias tenham sido diferentes. Dessa forma, com os resultados ora apresentados, conclui-se que o método foi preciso.

4.6 Exatidão

Na Tabela 15, são apresentados os resultados obtidos para o estudo de exatidão do método.

Tabela 15. Resultados para o parâmetro exatidão para o fármaco MCF.

(continua)

Nível / %	Curva	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação no Nível / %	Recuperação / %	Recuperação Média / %	DPR%
50	1	1	5,09	23073	4,21	41,34	82,68	91,48	0,47
		2	5,09	23312	4,25	41,77	83,53		
		3	5,09	23081	4,21	41,35	82,70		
	2	1	5,04	24983	4,60	45,65	91,30		
		2	5,04	24741	4,56	45,21	90,42		
		3	5,04	24451	4,50	44,68	89,36		
	3	1	5,14	28579	5,16	50,21	100,43		
		2	5,14	28853	5,21	50,69	101,39		
		3	5,14	28879	5,22	50,74	101,48		
100	1	1	10,18	45092	8,22	80,79	80,79	94,24	1,10
		2	10,18	45326	8,27	81,21	81,21		
		3	10,18	44964	8,20	80,56	80,56		
	2	1	10,08	54998	10,13	100,50	100,50		
		2	10,08	54584	10,05	99,74	99,74		
		3	10,08	54893	10,11	100,30	100,30		
	3	1	10,28	57693	10,42	101,37	101,37		
		2	10,28	57998	10,47	101,90	101,90		
		3	10,28	57944	10,47	101,81	101,81		

(conclusão)

Nível / %	Curva	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação no Nível / %	Recuperação / %	Recuperação Média / %	DPR%
150	1	1	15,27	63096	11,51	113,04	75,36	93,81	2,28
		2	15,27	63381	11,56	113,55	75,70		
		3	15,27	63540	11,59	113,84	75,89		
	2	1	15,12	82320	15,16	150,42	100,28		
		2	15,12	82085	15,12	149,99	99,99		
		3	15,12	82225	15,14	150,25	100,16		
	3	1	15,42	90302	16,31	158,66	105,77		
		2	15,42	90163	16,28	158,42	105,61		
		3	15,42	90069	16,27	158,25	105,50		

Analisando-se os resultados apresentados, infere-se que o método para detecção e quantificação de MCF em amostras residuais do medicamento antigripal estudado na validação de limpeza é exato na faixa de concentração verificada, visto que as recuperações apresentaram resultados dentro da especificação do método, 80%–110%, e atenderam aos requisitos de recuperação especificados na AOAC e aos critérios de aceitação estabelecidos na RDC 166/17 [4,23].

Em alguns estudos, os autores utilizam outra forma para determinar a exatidão do método. No trabalho citado no subitem 4.5, Aldewachi e Omar [49] avaliaram esse parâmetro por meio do DPR%, utilizando o mesmo critério para determinar a repetibilidade e a precisão intermediária. Em seu trabalho, eles obtiveram, com cinco replicatas para cada nível ($n=5$), um intervalo de 3,02–3,48%. Neste trabalho, conforme apresentado na Tabela 15, o DPR% variou de 0,47–2,28%, estando abaixo de 7,3%, limite estabelecido em norma para as condições estudadas [23].

Sabendo-se que os intervalos de recuperação e de DPR% obtidos estão dentro dos limites estabelecidos, conclui-se que o método foi exato nas condições estudadas.

4.7 Robustez

4.7.1 Alteração de parâmetros analíticos

Na Tabela 16, são apresentados os resultados obtidos no estudo de robustez.

Tabela 16. Resultados obtidos para os parâmetros avaliados no estudo de robustez.

(continua)

Parâmetro analítico	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação / %	Recuperação Média / %	DPR%	Recuperação em relação à amostra controle / %																																																																																
Condição controle	1	10,00	57917	10,72	107,20	107,35	0,194	-																																																																																
	2	10,00	58076	10,75	107,49				Tempo de extração 20 min	1	10,00	59868	11,08	110,81	110,53	0,360	102,96	2	10,00	59564	11,02	110,25	Tempo de extração 40 min	1	10,00	60061	11,12	111,17	110,95	0,280	103,36	2	10,00	59824	11,07	110,73	Temperatura – Coluna 25 °C	1	10,00	58252	10,73	107,29	107,70	0,544	100,33	2	10,00	58702	10,81	108,12	Temperatura – Coluna 35 °C	1	10,00	58407	10,76	107,57	107,73	0,210	100,36	2	10,00	58581	10,79	107,89	Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	1	10,00	62096	11,44	114,37	113,88	0,607	106,09	2	10,00	61565	11,34	113,39	Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13	2
Tempo de extração 20 min	1	10,00	59868	11,08	110,81	110,53	0,360	102,96																																																																																
	2	10,00	59564	11,02	110,25				Tempo de extração 40 min	1	10,00	60061	11,12	111,17	110,95	0,280	103,36	2	10,00	59824	11,07	110,73	Temperatura – Coluna 25 °C	1	10,00	58252	10,73	107,29	107,70	0,544	100,33	2	10,00	58702	10,81	108,12	Temperatura – Coluna 35 °C	1	10,00	58407	10,76	107,57	107,73	0,210	100,36	2	10,00	58581	10,79	107,89	Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	1	10,00	62096	11,44	114,37	113,88	0,607	106,09	2	10,00	61565	11,34	113,39	Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13	2	10,00	55325	10,19	101,90										
Tempo de extração 40 min	1	10,00	60061	11,12	111,17	110,95	0,280	103,36																																																																																
	2	10,00	59824	11,07	110,73				Temperatura – Coluna 25 °C	1	10,00	58252	10,73	107,29	107,70	0,544	100,33	2	10,00	58702	10,81	108,12	Temperatura – Coluna 35 °C	1	10,00	58407	10,76	107,57	107,73	0,210	100,36	2	10,00	58581	10,79	107,89	Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	1	10,00	62096	11,44	114,37	113,88	0,607	106,09	2	10,00	61565	11,34	113,39	Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13	2	10,00	55325	10,19	101,90																								
Temperatura – Coluna 25 °C	1	10,00	58252	10,73	107,29	107,70	0,544	100,33																																																																																
	2	10,00	58702	10,81	108,12				Temperatura – Coluna 35 °C	1	10,00	58407	10,76	107,57	107,73	0,210	100,36	2	10,00	58581	10,79	107,89	Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	1	10,00	62096	11,44	114,37	113,88	0,607	106,09	2	10,00	61565	11,34	113,39	Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13	2	10,00	55325	10,19	101,90																																						
Temperatura – Coluna 35 °C	1	10,00	58407	10,76	107,57	107,73	0,210	100,36																																																																																
	2	10,00	58581	10,79	107,89				Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	1	10,00	62096	11,44	114,37	113,88	0,607	106,09	2	10,00	61565	11,34	113,39	Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13	2	10,00	55325	10,19	101,90																																																				
Alteração do Fluxo – 1,7 mL min ⁻¹	1	10,00	62096	11,44	114,37	113,88	0,607	106,09																																																																																
	2	10,00	61565	11,34	113,39				Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13	2	10,00	55325	10,19	101,90																																																																		
Alteração do Fluxo – 1,9 mL min ⁻¹	1	10,00	55568	10,23	102,35	102,12	0,310	95,13																																																																																
	2	10,00	55325	10,19	101,90																																																																																			

(conclusão)

Parâmetro analítico	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação / %	Recuperação Média / %	DPR%	Recuperação em relação à amostra controle / %																																																				
Alteração de coluna	1	10,00	4804	0,88	8,85	8,81	0,621	8,21																																																				
	2	10,00	4762	0,88	8,77				Troca de filtro	1	10,00	61483	11,32	113,24	113,35	0,139	105,59	2	10,00	61604	11,35	113,36	Alteração de pH (1,8)	1	10,00	58811	10,83	108,32	107,95	0,487	100,56	2	10,00	58407	10,76	107,57	Alteração de pH (2,2)	1	10,00	52933	9,75	97,49	97,71	0,319	91,02	2	10,00	53172	9,79	97,93	Alteração de solvente (acetonitrila)	1	10,00	57606	10,61	106,10	106,15	0,064	98,88	2
Troca de filtro	1	10,00	61483	11,32	113,24	113,35	0,139	105,59																																																				
	2	10,00	61604	11,35	113,36				Alteração de pH (1,8)	1	10,00	58811	10,83	108,32	107,95	0,487	100,56	2	10,00	58407	10,76	107,57	Alteração de pH (2,2)	1	10,00	52933	9,75	97,49	97,71	0,319	91,02	2	10,00	53172	9,79	97,93	Alteração de solvente (acetonitrila)	1	10,00	57606	10,61	106,10	106,15	0,064	98,88	2	10,00	57658	10,62	106,19										
Alteração de pH (1,8)	1	10,00	58811	10,83	108,32	107,95	0,487	100,56																																																				
	2	10,00	58407	10,76	107,57				Alteração de pH (2,2)	1	10,00	52933	9,75	97,49	97,71	0,319	91,02	2	10,00	53172	9,79	97,93	Alteração de solvente (acetonitrila)	1	10,00	57606	10,61	106,10	106,15	0,064	98,88	2	10,00	57658	10,62	106,19																								
Alteração de pH (2,2)	1	10,00	52933	9,75	97,49	97,71	0,319	91,02																																																				
	2	10,00	53172	9,79	97,93				Alteração de solvente (acetonitrila)	1	10,00	57606	10,61	106,10	106,15	0,064	98,88	2	10,00	57658	10,62	106,19																																						
Alteração de solvente (acetonitrila)	1	10,00	57606	10,61	106,10	106,15	0,064	98,88																																																				
	2	10,00	57658	10,62	106,19																																																							

Analisando-se a Tabela 16, observa-se que o parâmetro alteração de coluna foi o único que apresentou resultado destoante, com recuperação em relação à amostra controle igual a 8,21%, encontrando-se fora da faixa de aceitação de 80–110%. Os demais parâmetros apresentaram recuperações dentro da faixa de aceitação e em todos os casos o DPR% foi inferior a 2%, indicando que, para essas alterações, o método se mostrou robusto.

Na Tabela 17, são apresentados os tempos de retenção médios e os erros relativos associados a cada parâmetro de robustez. Os tempos de retenção médios variaram quando comparados ao da amostra controle, conforme se observa na Tabela 17. Todavia, como fora descrito no subitem 4.1, os ensaios de robustez atenderam aos parâmetros de adequabilidade estabelecidos, ressaltando-se o parâmetro alteração de coluna, que apresentou DPR% superior a 2%, e assim, ainda que os tempos de retenção tenham sofrido variações, os ensaios foram considerados válidos.

Tabela 17. Tempos de retenção e erros relativos das amostras analisadas no estudo de robustez.

Parâmetro analítico	Tempo de retenção médio / min	Erro relativo / %
Condição controle	6,391	–
Tempo de extração – 20 min	6,390	–0,01
Tempo de extração – 40 min	6,390	–0,01
Temperatura – Coluna 25 °C	6,074	–4,96
Temperatura – Coluna 35 °C	6,190	–3,14
Alteração do Fluxo – 1,7 mL min⁻¹	6,117	–4,30
Alteração do Fluxo – 1,9 mL min⁻¹	6,186	–3,21
Alteração de coluna	6,266	–1,96
Troca de filtro	6,394	0,05
Alteração de pH (1,8)	6,383	–0,13
Alteração de pH (2,2)	6,330	–0,96
Alteração de solvente (acetone)	6,113	–4,36

O maior erro relativo foi observado ao se alterar a temperatura do forno em que ficava a coluna cromatográfica para 25 °C. Os menores erros observados ocorreram nos ensaios de tempo de extração – em ambos os ensaios – e de troca de filtro. Por mais que tenha havido essas variações, algumas mais significativas que outras, foi possível identificar e quantificar o ativo MCF em praticamente todos os ensaios, excetuando-se no ensaio de troca de coluna.

Por fim, conclui-se que o método se mostrou robusto frente às variações propostas neste trabalho, com uma única exceção, a troca de coluna.

4.7.2 Estabilidade de solução

Na Tabela 18, são apresentados os resultados obtidos no estudo de estabilidade de solução (amostra), em que constam a condição controle e os três intervalos de tempo avaliados: 24 h, 48 h e 72 horas.

Tabela 18. Resultados obtidos para o parâmetro estabilidade de solução em três períodos.

Parâmetro analítico	Replicata	Concentração Aplicada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Área	Concentração Recuperada / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação / %	Recuperação Média / %	DPR%	Varição em relação à amostra controle / %
Condição controle	1	10,00	57647	11,21	112,14	111,25	1,143	-
	2	10,00	56723	11,03	110,35			
24 h	1	10,00	60016	11,53	115,31	114,98	0,402	3,36
	2	10,00	59676	11,47	114,65			
48 h	1	10,00	60455	11,61	116,15	115,26	1,087	3,61
	2	10,00	59533	11,44	114,38			
72 h	1	10,00	60748	11,67	116,71	116,84	0,158	5,03
	2	10,00	60884	11,70	116,97			

Observa-se, pelos percentuais de variação em relação à amostra controle, que o método não se mostrou robusto a partir de 24 horas e sob refrigeração de aproximadamente 4 °C, haja vista que a variação excedeu 2%. Isso pode estar relacionado a alguns fatores, dentre eles a volatilidade dos solventes utilizados na solução diluente, uma vez que a recuperação média, à medida que as análises eram feitas, cresceu consideravelmente, passando de 111,25% da condição controle a 114,98% em apenas 24 horas. Na análise de 72 horas, foi observada uma recuperação de 116,84%, correspondendo a 5,03% de variação em relação à amostra controle.

Como comparativo, Bachute *et al* [18] observaram que as soluções padrão e amostra dos compostos analisados foram estáveis após o período de 24 horas. No estudo, os autores utilizaram uma solução diluente composta por metanol e água, na proporção de 50:50 (v/v). Para o preparo da solução amostra, foram utilizados 20 comprimidos do medicamento Helpex[®] Anticold, de modo que cada cápsula continha 2 mg de maleato de clorfeniramina. Assim como no presente trabalho, os autores utilizaram um intervalo de 30 minutos de solubilização dos compostos em ultrassom, mas não especificaram no estudo em que condições a solução foi armazenada para verificação da estabilidade.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo proposto para detecção e quantificação de MCF em amostras de um medicamento antigripal em cápsula na validação de limpeza demonstraram que o método analítico foi linear, preciso, exato, seletivo, relativamente rápido e robusto.

O método foi: **linear**, pois os coeficientes de correlação e determinação foram iguais a 0,9998 e 0,9996, respectivamente; **preciso**, pois o DPR% entre a repetibilidade e a precisão intermediária foi igual a 2,8%, menor que os 7,3% estabelecidos em norma; **exato**, pois as médias de recuperações ficaram entre 91,48% e 94,24%; **seletivo**, pois não foram percebidos, com os recursos disponíveis, quaisquer indícios de coeluição nos cromatogramas obtidos e os resultados estatísticos corroboraram com essa interpretação, embora não tenha sido realizada a avaliação de pureza do sinal do pico cromatográfico devido à indisponibilidade do detector DAD; **robusto**, pois, após alguns parâmetros terem sido alterados, não houve significativas mudanças, exceto para a troca de coluna, em que se observou uma recuperação média de 8,81%, e para o ensaio de estabilidade de solução, em que se observou uma variação de 3,36% em relação à amostra controle após 24 horas, indicando possível evaporação de solventes. Os limites de detecção e quantificação, para uma faixa de trabalho de 5,00–15,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram iguais a 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade do modelo, pois os valores são significativamente inferiores a 10,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, limite máximo definido neste estudo para a presença de MCF como contaminante. Ademais, o método mostrou-se relativamente rápido, visto que cada análise cromatográfica teve duração de 10 minutos.

Diante dos resultados obtidos no estudo, da realização dos cálculos estatísticos e do atendimento às especificações da RDC 166/17, o método pode ser considerado validado e a sua implementação em análise de rotina pode ocorrer sem grandes restrições, haja vista tratar-se de um método capaz de atender às exigências da ANVISA e demais normas no que diz respeito à validação de limpeza, ressalvados os parâmetros troca de coluna cromatográfica e estabilidade de solução, que apresentaram resultados destoantes, indicando que a coluna Coluna Hyperclone ODS C₁₈ 120A (150 × 4,6 mm, 5 μm) não foi adequada para o presente estudo e que a solução amostra não deve ficar armazenada por período igual ou superior a 24 horas.

Com isso, conclui-se que o método desenvolvido pode ser aplicado para avaliar a qualidade de limpeza dos equipamentos e utensílios após a produção do medicamento antigripal estudado, ressaltando-se a não necessidade de utilizar solução tampão para a fase móvel, e a versatilidade de utilizar um solvente de baixo custo, menos tóxico e de maior acessibilidade, como é o caso do metanol quando comparado à acetonitrila.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Power, *What's Cross Contamination in Pharmaceutical Industry*, <https://www.gmpsop.com/whats-cross-contamination-in-pharmaceutical-industry/#>.
- [2] G1 PB, *MP-Procon Orienta a Suspensão Da Venda de Mais de 40 Remédios Na PB*, <https://g1.globo.com/pb/paraiba/noticia/2016/01/mp-procon-orienta-suspensao-da-venda-de-mais-de-40-remedios-na-pb.html>.
- [3] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Validação de Limpeza Para Farmoquímicas*.
- [4] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017* (Brasil, 2017).
- [5] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *RESOLUÇÃO RDC Nº 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010* (2010).
- [6] M. F. Vitha, *Chromatography: Principles and Instrumentation* (John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2017).
- [7] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7th ed. (Cengage Learning , Boston, 2016).
- [8] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. (John Wiley & Sons, Inc. , New Jersey, 2010).
- [9] S. Túlio, A. Cassini, P. Wagner, P. Antunes, and R. Keller, *VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO LIVRE DE ACETONITRILA PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA*, 2013.
- [10] *Bula Eletrônica Resfedryl®*, <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?numeroRegistro=117170010>.
- [11] A. Ali, U. Farooq, M. Ahmed, M. M. Athar, M. Salman, S. Arif, K. Nadeem, and H. Naz, *Stability-Indicating RP-HPLC Assay for Simultaneous Determination of Chlorpheniramine Maleate and Prednisolone in Veterinary Injection*, *Acta Chromatogr* **32**, 122 (2020).
- [12] H. Aldewachi and T. A. Omar, *Development of HPLC Method for Simultaneous Determination of Ibuprofen and Chlorpheniramine Maleate*, *Sci Pharm* **90**, (2022).
- [13] Z. Khan, S. Masood, N. Shafi, R. Azmat, S. Khurshid, and S. Begum, *Interaction Studies of Chlorpheniramine Maleate in Mono and Dihydric Alcohols by Density, Viscosity, and HPLC Methods*, *Indonesian Journal of Chemistry* **22**, 1218 (2022).
- [14] A. Nabi, M. S. Tehrani, S. Farrokhzadeh, and N. Sadeghi, *Separation and Simultaneous Determination of Paracetamol, Phenylephrine Hydrochloride and Chlorpheniramine*

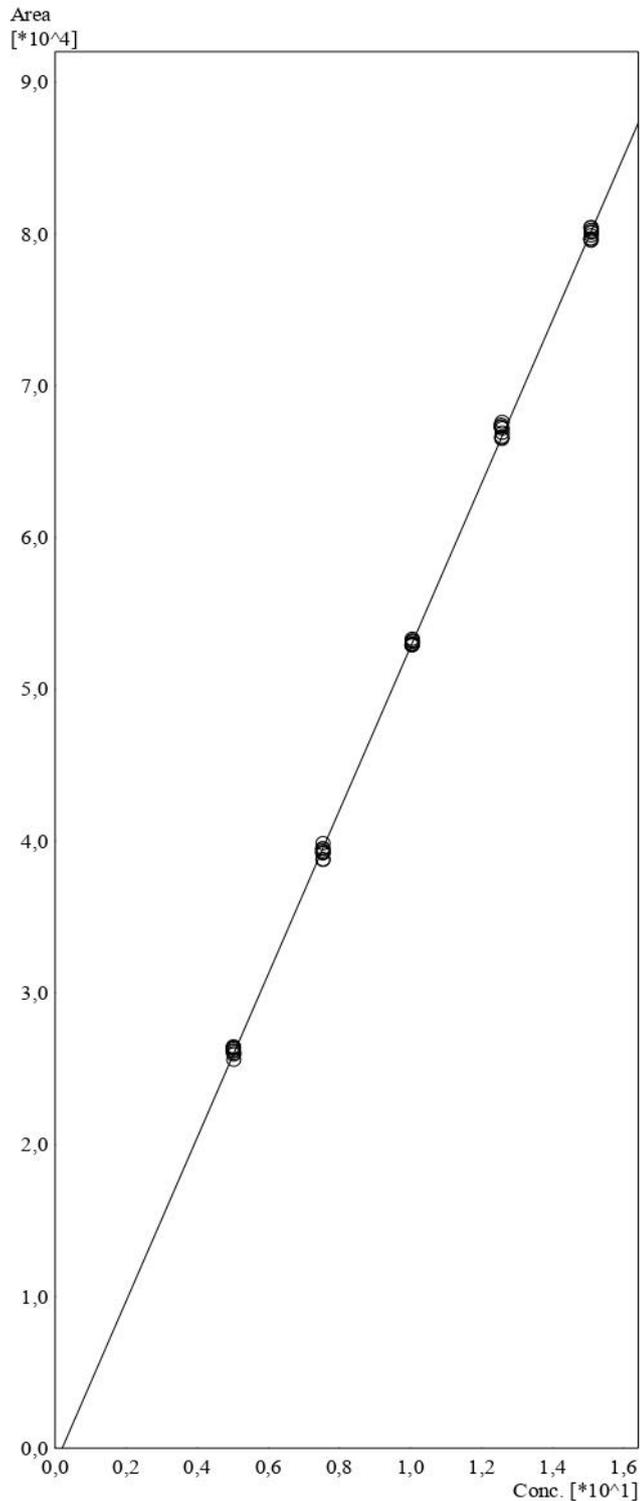
- Maleate in a Commercial Tablet by a Rapid Isocratic HPLC Method*, Journal of Human, Health and Halal Metrics 8 (2020).
- [15] H. Mizuguchi, Y. Miyamoto, T. Terao, H. Yoshida, W. Kuroda, Y. Kitamura, N. Takeda, and H. Fukui, *Signaling Pathway of Histamine H1 Receptor-Mediated Histamine H1 Receptor Gene Upregulation Induced by Histamine in u-373 Mg Cells*, Curr Issues Mol Biol **43**, 1243 (2021).
- [16] *Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition SB-CN Column*, <https://www.agilent.com/Library/datasheets/Public/820210-005.pdf>.
- [17] I. M. Palabiyik and F. Onur, *The Simultaneous Determination of Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol, Chlorpheniramine Maleate and Dextromethorphan Hydrobromide in Pharmaceutical Preparations*, Chromatographia **66**, (2007).
- [18] M. T. Bachute, S. V. Shanbhag, and S. L. Turwale, *Simultaneous Determination of Four Active Pharmaceuticals in Tablet Dosage Form by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research **18**, 2161 (2019).
- [19] A. Nezhadali, M. R. Shapouri, M. Amoli-Diva, A. H. Hooshangi, and F. Khodayari, *Method Development for Simultaneous Determination of Active Ingredients in Cough and Cold Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography*, Heliyon **5**, (2019).
- [20] Health Products and Food Branch, *Health Products and Food Branch Inspectorate: Guidance Document; Cleaning Validation Guidelines*.
- [21] ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS COMMITTEE (APIC), *Guidance on Aspects of Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredient Plants*.
- [22] M. Belter, A. Sajnóg, and D. Barańkiewicz, *Over a Century of Detection and Quantification Capabilities in Analytical Chemistry - Historical Overview and Trends*, Talanta **129**, 606 (2014).
- [23] AOAC INTERNATIONAL, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F*.
- [24] D. R. Anderson, D. J. Sweeney, and T. A. Williams, *Essentials of Statistics for Business and Economics, Revised*, 6th ed. (Cengage Learning, 2011).
- [25] P. A. Morettin and W. D. O. Bussab, *Estatística Básica*, 9th ed. (Saraiva, São Paulo, 2017).
- [26] D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed. (Cengage Learning, 2013).
- [27] G. A. Milliken and D. E. Johnson, *Analysis of Messy Data: Designed Experiments*, 2nd ed., Vol. 1 (Chapman and Hall/CRC, 2009).

- [28] J. Miles, *R Squared, Adjusted R Squared*, Wiley StatsRef: Statistics Reference Online (2014).
- [29] W. G. Cochran, *The Distribution of the Largest of a Set of Estimated Variances as a Fraction of Their Total*, Ann Eugen 47 (1947).
- [30] G. W. Snedecor and W. G. Cochran, *Statistical Methods*, 8th ed. (Iowa State University Press, 1989).
- [31] B. Odoi, S. Twumasi-Ankrah, S. Samita, and S. Al-Hassan, *The Efficiency of Bartlett's Test Using Different Forms of Residuals for Testing Homogeneity of Variance in Single and Factorial Experiments-A Simulation Study*, Sci Afr 17, (2022).
- [32] W. J. Conover, M. E. Johnson, and M. M. Johnson, *A Comparative Study of Tests for Homogeneity of Variances, with Applications to the Outer Continental Shelf Bidding Data*, TECHNOMETRICS 23, (n.d.).
- [33] M. Urvoy and F. Atrousseau, *Application of Grubbs' Test for Outliers to the Detection of Watermarks*, IH and MMSec 2014 - Proceedings of the 2014 ACM Information Hiding and Multimedia Security Workshop 49 (2014).
- [34] D. Brynn and H. J. J. Gooding, *Data Analysis for Chemistry: An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists* (Oxford University Press, Inc., New York, 2006).
- [35] M. Saculinggan and E. A. Balase, *Empirical Power Comparison of Goodness of Fit Tests for Normality in the Presence of Outliers*, J Phys Conf Ser 435, (2013).
- [36] P. Kabaila, D. Farchione, S. Alhelli, and N. Bragg, *The Effect of a Durbin-Watson Pretest on Confidence Intervals in Regression*, Stat Neerl 75, 4 (2021).
- [37] J. Durbin and G. S. Watson, *Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression, II*, Biometrika 38, 159 (1951).
- [38] J. E. O'gara, B. A. Alden, C. A. Gendreau, P. C. Iraneta, and T. H. Walter, *Dependence of Cyano Bonded Phase Hydrolytic Stability on Ligand Structure and Solution PH*, J Chromatogr A 893, 245 (2000).
- [39] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, and J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 5nd ed. (Cengage Learning, Bellingham, 2013).
- [40] Shimadzu, *LabSolutions Data Acquisition & Processing Theory Guide*.
- [41] J. H. Vuolo, *Fundamentos Da Teoria de Erros*, 2 ed. (Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1996).
- [42] Minitab®, *A Estatística de Anderson-Darling - Minitab*, <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/20/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/the-anderson-darling->

ANEXO A – Relatório de linearidade obtido pelo *software* LabSolutions SC

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : Clorfeniramina
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=5389,53*x-1080,88$
 Rr1=0,9998007 Rr2=0,9996014 RSS=6,587371e+006
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc.(Ratio)	Area
1	7,542	39265,26
2	10,056	52999,30
3	15,069	79706,11
4	5,031	26032,24
5	12,5575	67419,21
6	7,542	38800,70
7	7,5465	39854,53
8	15,093	80076,12
9	15,069	80400,18
10	10,046	52905,58
11	5,028	26469,44
12	10,046	52899,17
13	15,093	80142,57
14	15,093	80269,53
15	7,5345	39364,24
16	10,056	53330,10
17	15,084	80440,95
18	5,031	25930,53
19	12,57	66639,24
20	5,028	26298,79
21	15,084	79549,47
22	12,5775	66891,89
23	15,084	79899,53
24	5,028	26151,68
25	12,5775	67184,55
26	12,5775	67599,91
27	7,542	38762,30
28	10,056	53211,45
29	10,046	52936,86
30	7,5465	39498,16
31	7,5345	39206,11
32	5,023	26405,71
33	5,023	26180,00
34	15,069	79612,17
35	12,5575	67291,75
36	5,031	25582,66
37	12,5575	67271,33
38	5,023	26352,67
39	10,062	53123,94
40	7,5345	39515,55
41	12,57	66577,46
42	7,5465	39204,12
43	10,062	53196,87
44	10,062	52971,03
45	12,57	66487,15

ANEXO B – Tabela do teste de Durbin-Watson com 5% de significância

Durbin-Watson Statistic: 5 Per Cent Significance Points of dL and dU

n	k'=1		k'=2		k'=3		k'=4		k'=5		k'=6		k'=7		k'=8		k'=9		k'=10	
	dL	dU																		
6	0.610	1.400	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
7	0.700	1.356	0.467	1.896	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	0.763	1.332	0.559	1.777	0.367	2.287	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
9	0.824	1.320	0.629	1.699	0.455	2.128	0.296	2.588	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
10	0.879	1.320	0.697	1.641	0.525	2.016	0.376	2.414	0.243	2.822	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
11	0.927	1.324	0.758	1.604	0.595	1.928	0.444	2.283	0.315	2.645	0.203	3.004	----	----	----	----	----	----	----	----
12	0.971	1.331	0.812	1.579	0.658	1.864	0.512	2.177	0.380	2.506	0.268	2.832	0.171	3.149	----	----	----	----	----	----
13	1.010	1.340	0.861	1.562	0.715	1.816	0.574	2.094	0.444	2.390	0.328	2.692	0.230	2.985	0.147	3.266	----	----	----	----
14	1.045	1.350	0.905	1.551	0.767	1.779	0.632	2.030	0.505	2.296	0.389	2.572	0.286	2.848	0.200	3.111	0.127	3.360	----	----
15	1.077	1.361	0.946	1.543	0.814	1.750	0.685	1.977	0.562	2.220	0.447	2.471	0.343	2.727	0.251	2.979	0.175	3.216	0.111	3.438
16	1.106	1.371	0.982	1.539	0.857	1.728	0.734	1.935	0.615	2.157	0.502	2.388	0.398	2.624	0.304	2.860	0.222	3.090	0.155	3.304
17	1.133	1.381	1.015	1.536	0.897	1.710	0.779	1.900	0.664	2.104	0.554	2.318	0.451	2.537	0.356	2.757	0.272	2.975	0.198	3.184
18	1.158	1.391	1.046	1.535	0.933	1.696	0.820	1.872	0.710	2.060	0.603	2.258	0.502	2.461	0.407	2.668	0.321	2.873	0.244	3.073
19	1.180	1.401	1.074	1.536	0.967	1.685	0.859	1.848	0.752	2.023	0.649	2.206	0.549	2.396	0.456	2.589	0.369	2.783	0.290	2.974
20	1.201	1.411	1.100	1.537	0.998	1.676	0.894	1.828	0.792	1.991	0.691	2.162	0.595	2.339	0.502	2.521	0.416	2.704	0.336	2.885
21	1.221	1.420	1.125	1.538	1.026	1.669	0.927	1.812	0.829	1.964	0.731	2.124	0.637	2.290	0.546	2.461	0.461	2.633	0.380	2.806
22	1.239	1.429	1.147	1.541	1.053	1.664	0.958	1.797	0.863	1.940	0.769	2.090	0.677	2.246	0.588	2.407	0.504	2.571	0.424	2.735
23	1.257	1.437	1.168	1.543	1.078	1.660	0.986	1.785	0.895	1.920	0.804	2.061	0.715	2.208	0.628	2.360	0.545	2.514	0.465	2.670
24	1.273	1.446	1.188	1.546	1.101	1.656	1.013	1.775	0.925	1.902	0.837	2.035	0.750	2.174	0.666	2.318	0.584	2.464	0.506	2.613
25	1.288	1.454	1.206	1.550	1.123	1.654	1.038	1.767	0.953	1.886	0.868	2.013	0.784	2.144	0.702	2.280	0.621	2.419	0.544	2.560
26	1.302	1.461	1.224	1.553	1.143	1.652	1.062	1.759	0.979	1.873	0.897	1.992	0.816	2.117	0.735	2.246	0.657	2.379	0.581	2.513
27	1.316	1.469	1.240	1.556	1.162	1.651	1.084	1.753	1.004	1.861	0.925	1.974	0.845	2.093	0.767	2.216	0.691	2.342	0.616	2.470
28	1.328	1.476	1.255	1.560	1.181	1.650	1.104	1.747	1.028	1.850	0.951	1.959	0.874	2.071	0.798	2.188	0.723	2.309	0.649	2.431
29	1.341	1.483	1.270	1.563	1.198	1.650	1.124	1.743	1.050	1.841	0.975	1.944	0.900	2.052	0.826	2.164	0.753	2.278	0.681	2.396
30	1.352	1.489	1.284	1.567	1.214	1.650	1.143	1.739	1.071	1.833	0.998	1.931	0.926	2.034	0.854	2.141	0.782	2.251	0.712	2.363
31	1.363	1.496	1.297	1.570	1.229	1.650	1.160	1.735	1.090	1.825	1.020	1.920	0.950	2.018	0.879	2.120	0.810	2.226	0.741	2.333
32	1.373	1.502	1.309	1.574	1.244	1.650	1.177	1.732	1.109	1.819	1.041	1.909	0.972	2.004	0.904	2.102	0.836	2.203	0.769	2.306
33	1.383	1.508	1.321	1.577	1.258	1.651	1.193	1.730	1.127	1.813	1.061	1.900	0.994	1.991	0.927	2.085	0.861	2.181	0.796	2.281
34	1.393	1.514	1.333	1.580	1.271	1.652	1.208	1.728	1.144	1.808	1.079	1.891	1.015	1.978	0.950	2.069	0.885	2.162	0.821	2.257
35	1.402	1.519	1.343	1.584	1.283	1.653	1.222	1.726	1.160	1.803	1.097	1.884	1.034	1.967	0.971	2.054	0.908	2.144	0.845	2.236
36	1.411	1.525	1.354	1.587	1.295	1.654	1.236	1.724	1.175	1.799	1.114	1.876	1.053	1.957	0.991	2.041	0.930	2.127	0.868	2.216
37	1.419	1.530	1.364	1.590	1.307	1.655	1.249	1.723	1.190	1.795	1.131	1.870	1.071	1.948	1.011	2.029	0.951	2.112	0.891	2.197
38	1.427	1.535	1.373	1.594	1.318	1.656	1.261	1.722	1.204	1.792	1.146	1.864	1.088	1.939	1.029	2.017	0.970	2.098	0.912	2.180
39	1.435	1.540	1.382	1.597	1.328	1.658	1.273	1.722	1.218	1.789	1.161	1.859	1.104	1.932	1.047	2.007	0.990	2.085	0.932	2.164
40	1.442	1.544	1.391	1.600	1.338	1.659	1.285	1.721	1.230	1.786	1.175	1.854	1.120	1.924	1.064	1.997	1.008	2.072	0.952	2.149
45	1.475	1.566	1.430	1.615	1.383	1.666	1.336	1.720	1.287	1.776	1.238	1.835	1.189	1.895	1.139	1.958	1.089	2.022	1.038	2.088
50	1.503	1.585	1.462	1.628	1.421	1.674	1.378	1.721	1.335	1.771	1.291	1.822	1.246	1.875	1.201	1.930	1.156	1.986	1.110	2.044
55	1.528	1.601	1.490	1.641	1.452	1.681	1.414	1.724	1.374	1.768	1.334	1.814	1.294	1.861	1.253	1.909	1.212	1.959	1.170	2.010
60	1.549	1.616	1.514	1.652	1.480	1.689	1.444	1.727	1.408	1.767	1.372	1.808	1.335	1.850	1.298	1.894	1.260	1.939	1.222	1.984
65	1.567	1.629	1.536	1.662	1.503	1.696	1.471	1.731	1.438	1.767	1.404	1.805	1.370	1.843	1.336	1.882	1.301	1.923	1.266	1.964
70	1.583	1.641	1.554	1.672	1.525	1.703	1.494	1.735	1.464	1.768	1.433	1.802	1.401	1.838	1.369	1.874	1.337	1.910	1.305	1.948
75	1.598	1.652	1.571	1.680	1.543	1.709	1.515	1.739	1.487	1.770	1.458	1.801	1.428	1.834	1.399	1.867	1.369	1.901	1.339	1.935
80	1.611	1.662	1.586	1.688	1.560	1.715	1.534	1.743	1.507	1.772	1.480	1.801	1.453	1.831	1.425	1.861	1.397	1.893	1.369	1.925
85	1.624	1.671	1.600	1.696	1.575	1.721	1.550	1.747	1.525	1.774	1.500	1.801	1.474	1.829	1.448	1.857	1.422	1.886	1.396	1.916
90	1.635	1.679	1.612	1.703	1.589	1.726	1.566	1.751	1.542	1.776	1.518	1.801	1.494	1.827	1.469	1.854	1.445	1.881	1.420	1.909
95	1.645	1.687	1.623	1.709	1.602	1.732	1.579	1.755	1.557	1.778	1.535	1.802	1.512	1.827	1.489	1.852	1.465	1.877	1.442	1.903
100	1.654	1.694	1.634	1.715	1.613	1.736	1.592	1.758	1.571	1.780	1.550	1.803	1.528	1.826	1.506	1.850	1.484	1.874	1.462	1.898
150	1.720	1.747	1.706	1.760	1.693	1.774	1.679	1.788	1.665	1.802	1.651	1.817	1.637	1.832	1.622	1.846	1.608	1.862	1.593	1.877
200	1.758	1.779	1.748	1.789	1.738	1.799	1.728	1.809	1.718	1.820	1.707	1.831	1.697	1.841	1.686	1.852	1.675	1.863	1.665	1.874

*k' is the number of regressors excluding the intercept

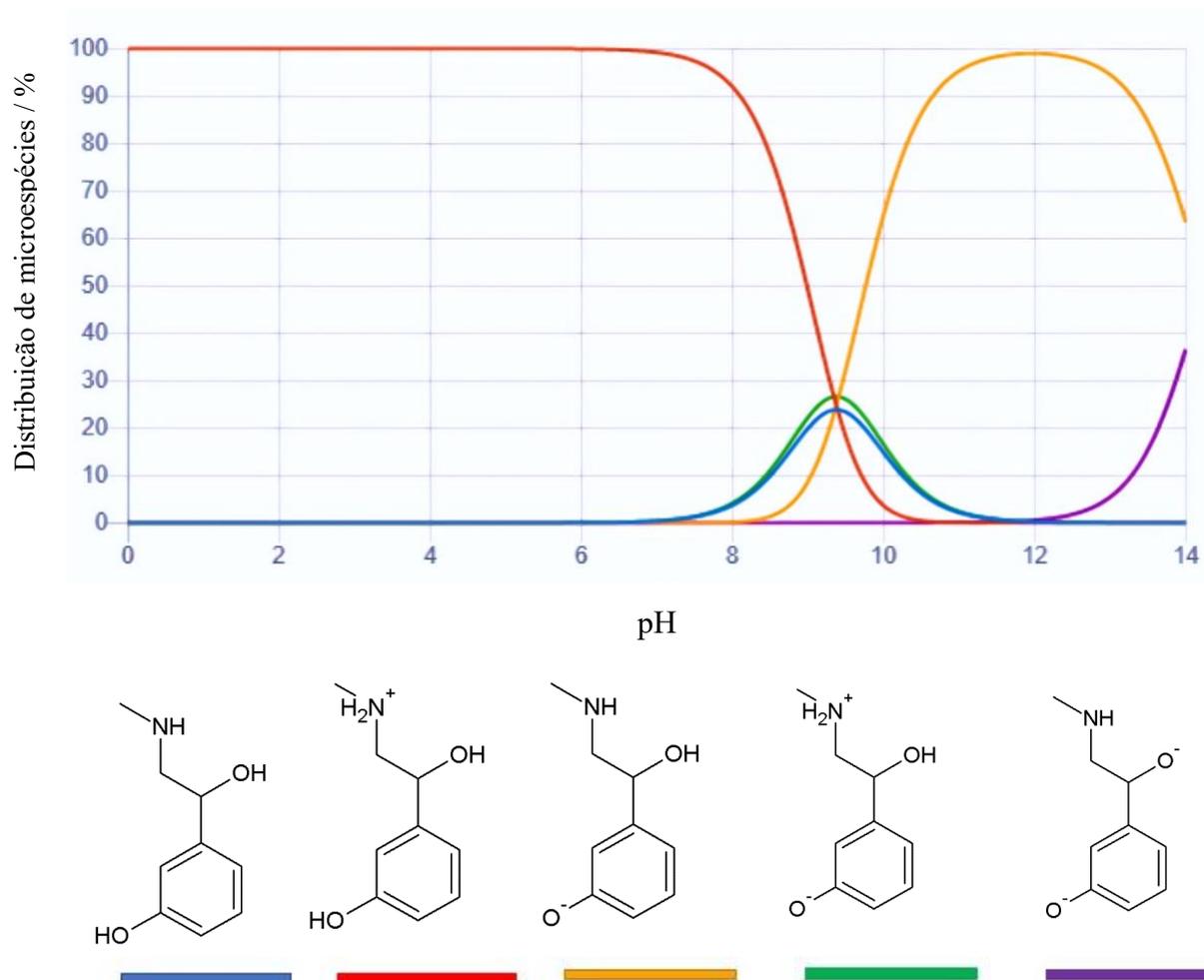
Fonte: https://www3.nd.edu/~wevans1/econ30331/Durbin_Watson_tables.pdf. Acesso em 07, de maio de 2023.

ANEXO C – Tabela do teste de Cochran com 5% de significância

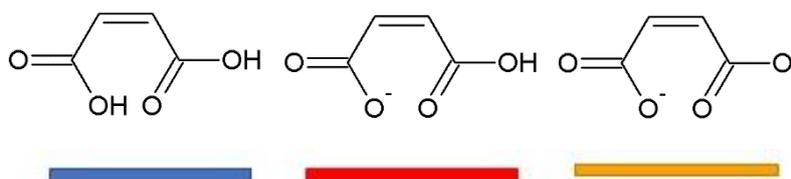
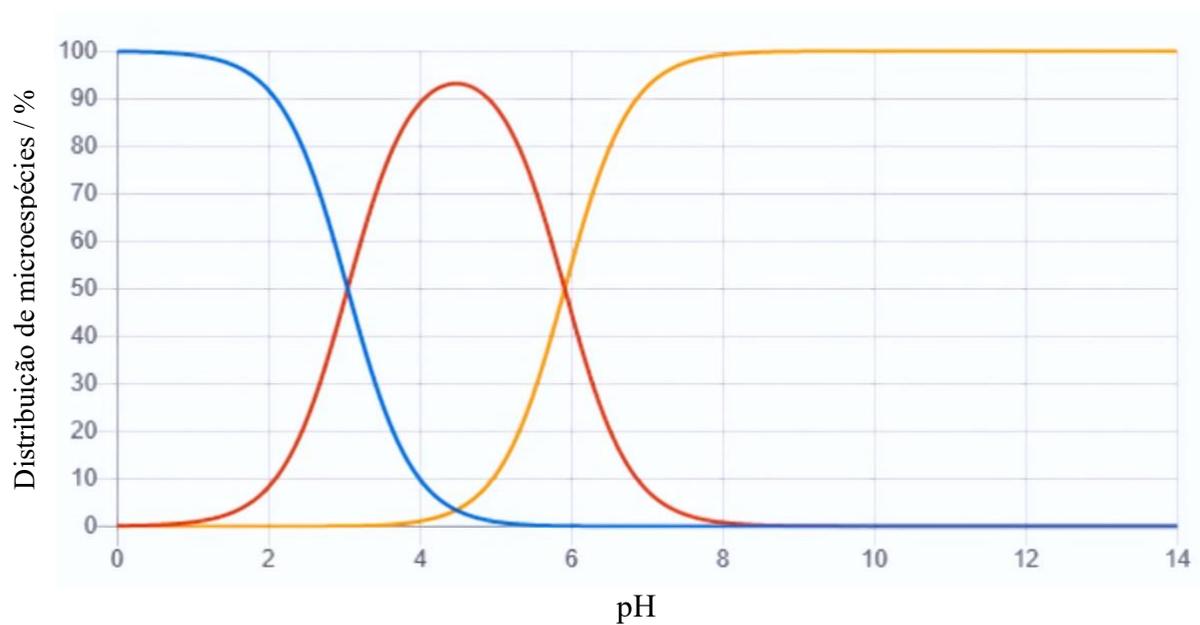
k	v_x													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	∞
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.7880	0.7341	0.6602	0.5813	0.5000
3	0.9669	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.6025	0.5466	0.4748	0.4031	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.4884	0.4366	0.3720	0.3093	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.4118	0.3645	0.3066	0.2513	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.3568	0.3135	0.2612	0.2119	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.3154	0.2756	0.2278	0.1833	0.1429
8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.2829	0.2462	0.2022	0.1616	0.1250
9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.2568	0.2226	0.1820	0.1446	0.1111
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.2353	0.2032	0.1655	0.1308	0.1000
12	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.2020	0.1737	0.1403	0.1100	0.0833
15	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.1671	0.1429	0.1144	0.0889	0.0667
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.1303	0.1108	0.0879	0.0675	0.0500
24	0.3434	0.2354	0.1907	0.1656	0.1493	0.1374	0.1286	0.1216	0.1160	0.1113	0.0942	0.0743	0.0567	0.0417
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0921	0.0771	0.0604	0.0457	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0713	0.0595	0.0462	0.0347	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0583	0.0552	0.0520	0.0497	0.0411	0.0316	0.0234	0.0167
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0266	0.0218	0.0165	0.0120	0.0083
∞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: <http://www.watpon.in.th/table/cochran.pdf>. Acesso em 07 de maio de 2023.

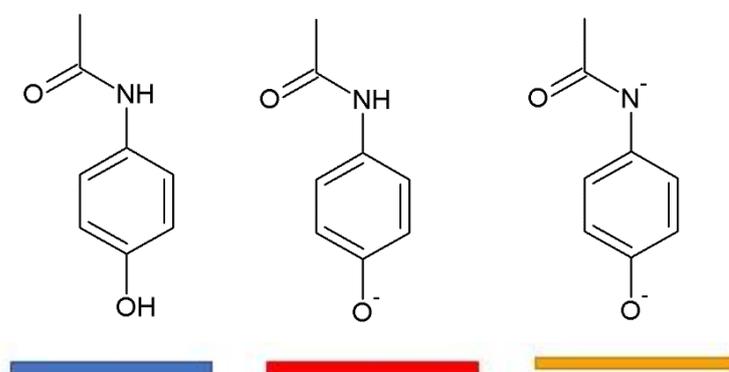
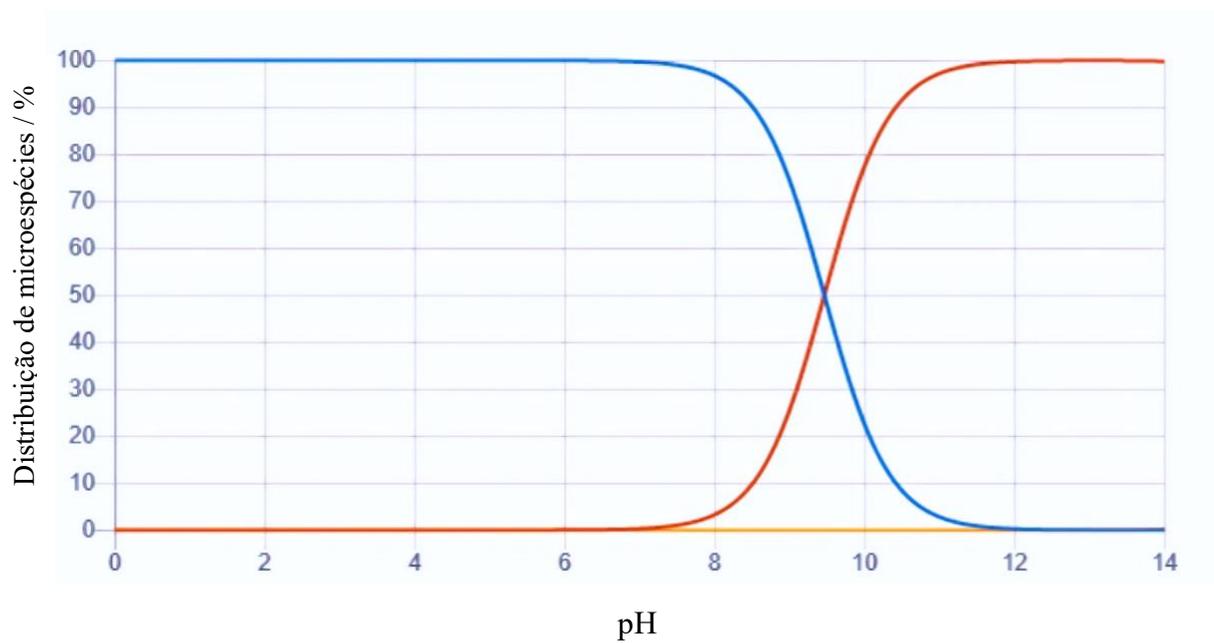
ANEXO D – Gráfico de distribuição de *microespécies* de fenilefrina em função do pH



Fonte: Gráfico disponibilizado por colaborador; site: <https://chemicalize.com/>.

ANEXO E – Gráfico de distribuição de *microespécies* de maleato em função do pH

Fonte: Gráfico disponibilizado por colaborador; site: <https://chemicalize.com/>

ANEXO F – Gráfico de distribuição de *microespécies* de paracetamol em função do pH

Fonte: Gráfico disponibilizado por colaborador; site: <https://chemicalize.com/>.