

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM NOVO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS

DEVELOPMENT OF A NEW ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF ACETYLSALICYLIC ACID AND SALICYLIC ACID INTO TABLETS BY A REVERSED PHASE CHROMATOGRAPHY

RESUMO

O ácido acetilsalicílico (AAS) é um fármaco utilizado como analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sendo amplamente comercializado e consumido no Brasil e no mundo. Como precursor de sua síntese utiliza-se o ácido salicílico (AS) que também é produzido através de sua degradação. O objetivo deste trabalho foi a validação de um novo método por cromatografia em fase líquida para determinar os teores tanto do ácido acetilsalicílico quanto do salicílico em comprimidos. Os parâmetros da adequação do sistema cromatográfico para o AAS (fator de alargamento = 1,20; fator de retenção = 1,61; número de pratos = 2485 e desvio padrão relativo = 0,3%) e para o AS (fator de alargamento = 1,26; fator de retenção = 2,72; número de pratos = 4177 e desvio padrão relativo = 0,2%) foram satisfatórios e a resolução foi de 5,06. A seletividade foi verificada por comparações dos espectros de absorção no ultravioleta (UV) antes, durante e depois do tempo de retenção das substâncias com os espectros obtidos a partir das substâncias puras (padrões). A faixa linear de trabalho para o AAS foi de 0,21 a 0,39 mg/mL e a do AS foi de 6,3 a 11,7 µg/mL. Foi verificado para o AAS e para o AS que a regressão obtida nas curvas analíticas foi significativa e não apresentou desvio da linearidade, que os resíduos seguem a normal, são independentes e seguem comportamento homoscedástico, os coeficientes de correlação (r) das curvas analíticas do AAS e do AS foram de 0,9995 e 0,9988, respectivamente. A sensibilidade foi de 1,88 mAbs/(µg/mL) para o AAS e de 1,84 mAbs/(µg/mL) para o AS. Os limites de detecção e quantificação para o AS foram 0,23 e 0,69 µg/mL respectivamente. Não foi verificada a presença do efeito matriz pelas comparações das inclinações e interseções das três curvas de adição padrão com a curva analítica para o AAS e para o AS. A recuperação média em cada uma das três curvas de adição padrão foi de 99,9%, 96,4% e 100,1% para o AAS e de 100,3%, 100,1% e 101,2% para o AS. A repetitividade expressa pelo desvio padrão relativo de repetitividade (DPRr) na análise do AAS do produto A executada pelos analistas 1, 2 e 3 foram de 2,5%, 1,2% e 1,2%, respectivamente, e na análise do AS foi de 2,9%, 2,2% e 2,0% respectivamente. A precisão intermediária expressa pelo desvio padrão de reprodutibilidade (DPRR) entre três analistas em dias e equipamentos diferentes para o AAS foi de 1,7%, 1,4% e 1,6% nas análises dos produtos A, B e C, respectivamente, e para o AS foi de 2,4%, 7,5% e 8,0% nas análises dos produtos A, B e C, respectivamente. O método mostrou-se ser robusto, em relação a pequenas alterações no pH da fase móvel (2,3 e 2,6), composição da fase móvel (30 e 20% de orgânico), temperatura da coluna (30 e 25°C), vazão da fase móvel (1,0 e 1,2 mL/minuto),

José Luiz Neves de Aguiar
Katia Christina Leandro
Shirley de Mello Pereira Abrantes
André Luis Mazzei Albert

Departamento de Química,
Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, Fundação
Oswaldo Cruz

Correspondências:

José Luiz Neves de Aguiar
jose.aguiar@incqs.fiocruz.br

diferente fabricante de coluna (Waters e Merck) e tempo de extração no ultrassom (5 e 10 minutos). O método foi aplicado na determinação do teor de AAS e de AS em dez lotes de um medicamento industrial.

Palavras-chave: Validação, cromatografia líquida de alta eficiência, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico

ABSTRACT

The acetylsalicylic acid (AAS) is a drug used as an analgesic, anti-inflammatory, antipyretic. It is widely marketed and consumed in Brazil and the world. As precursor of its synthesis, is used in the salicylic acid (AS), which is also produced by its degradation. The methodology of official American Pharmacopoeia (USP) requires the determination of these drugs by high performance liquid chromatography (HPLC) with detection by ultraviolet, but this method does not have good sensitivity and resolution. The objective of this work, seeking a better match of the chromatographic system in relation to the methodology official, was the development and optimization of a new method of liquid phase chromatography to determine the levels of both the AAS as of salicylic in tablets. The parameters of the adequacy of the chromatographic system for the AAS and the AS were satisfactory. The selectivity was verified by a comparison of the absorption spectra of the ultraviolet (UV) before, during and after the time of retention of the substance. The linear range of work for the AAS was 0.21 to 0.39 mg/mL and for AS was 6.3 to 11.7 µg/ml. The correlation coefficients (*r*) analytical curves of the AAS and AS were 0.9995 and 0.9988 respectively and the limits of detection and quantification for the AS were 0.23 and 0.69 µg/ml.

Keywords: High performance liquid chromatography, acetylsalicylic acid, salicylic acid

INTRODUÇÃO

O ácido acetilsalicílico (AAS), também conhecido como aspirina, tem como precursor e também como produto de degradação o ácido salicílico (AS). O ácido acetilsalicílico é um fármaco utilizado como analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sendo amplamente comercializado e consumido no Brasil e no mundo (AKRE *et al.*, 2001).

A avaliação experimental do método preconizado pela Farmacopeia Americana (USP 31, 2008) para dosar simultaneamente o AAS e o AS, mostrou que os parâmetros referentes à adequação do sistema (principalmente resolução e fator de cauda) não produziam os efeitos desejados à realização de uma análise confiável. Este sistema cromatográfico apresentou uma sensibilidade muito baixa, o que não é desejável em qualquer método analítico quantitativo, havendo a necessidade de desenvolver um novo método por cromatografia líquida de alta eficiência para dosagem do AAS e do AS em comprimidos, que apresentasse dados referentes à adequação do sistema (principalmente resolução e fator de cauda) e uma maior sensibilidade do que o método preconizado (AGUIAR *et al.*, 2009).

O método desenvolvido foi então validado segundo as diretrizes da ANVISA (ANVISA, 2003); da AOAC (AOAC, 2002); do EURACHEM (EURACHEM, 1998); do ICH (ICH, 1996); do

INMETRO (INMETRO, 2007) e da US-FDA (US-FDA, 2000). Para assegurar a confiabilidade dos resultados analíticos foram avaliados os seguintes parâmetros de mérito: estabilidade, seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, efeito matrix, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão, precisão e robustez.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Todas as soluções foram feitas utilizando água ultrapura do sistema Milli-Q (Milipore). Todos os reagentes utilizados foram da Merck (Alemanha), acetonitrila grau CLAE e ácido trifluoroacético grau analítico. Os padrões utilizados foram ácido acetilsalicílico (Substância Química de Referência da Farmacopeia Brasileira) com pureza de 100,0% e ácido salicílico (Padrão da Farmacopeia Americana) com pureza de 99,4%. Medicamentos de ácido acetilsalicílico de quatro fabricantes diferentes foram analisados. Um lote de comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg (Fabricante A), um lote de comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg (Fabricante B) e um lote de comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg (Fabricante C) e dez lotes de comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg (Fabricante D).

Equipamentos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados o cromatógrafo de fase líquida da Shimadzu, modelo SPD-M10A com detector fotométrico na região do ultravioleta-visível do tipo de arranjo de diodos, e dois cromatógrafos de fase líquida (modelo 2487) da Waters com detector fotométrico na região do ultravioleta-visível. As colunas usadas foram a Novapack de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18, 4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.) da Waters e a Lichrospher de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18, 5 μ m, 125 x 4 mm d.i.) da Merck.

Condições analíticas

O desenvolvimento, a otimização, a seletividade, a determinação dos parâmetros de adequação do sistema e a cinética de degradação do ácido acetilsalicílico foram estudados conforme trabalho anterior (AGUIAR *et al.*, 2009).

As condições analíticas foram: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.) (Novapack, Waters); fase móvel e diluente composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido trifluoracético, 0,05% (30:70); vazão de 1,0 mL/min; detecção em 230 nm; temperatura de 30°C; volume de injeção de 5 μ L e concentração dos padrões de 505 μ g/mL de ácido acetilsalicílico e 511 μ g/mL de ácido salicílico.

Avaliação dos parâmetros de mérito

Adequação do Sistema

Para avaliar a qualidade da separação foram feitas injeções de 5 μ L, em separado, da solução padrão de ácido acetilsalicílico e da solução padrão de ácido salicílico, após determinar o tempo de retenção referente a cada substância, uma solução contendo os dois analitos foi injetada.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação dos espectros de absorção molecular no ultravioleta dos picos do AAS e do AS obtidos em sete níveis de concentração da curva de adição padrão, antes, durante e depois do tempo de retenção característico da substância com os espectros dos picos das respectivas substâncias puras (padrão) (AGUIAR *et al.*, 2009).

Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho foi definida conforme o estabelecido no Guia de Validação de Métodos Analíticos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

Linearidade

A avaliação da linearidade da resposta analítica para os analitos foi feita a partir da determinação da faixa de concentração de interesse, considerando a aplicação do método. As amostras foram preparadas para que as concentrações esperadas estivessem próximas do centro da faixa linear de trabalho. Em seguida, preparou-se uma curva analítica com soluções-padrão em sete níveis de concentração, com tripli-

catas independentemente para cada nível e as soluções foram analisadas aleatoriamente. O método utilizado para análise de dados foi o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). O ajuste da equação de calibração pelo MMQO se baseou em várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo proposto. Verificou-se se os resíduos foram variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida, se os resíduos foram variáveis normalmente distribuídas (teste de Ryan-Joiner), se os resíduos apresentavam comportamento homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X (teste de Brown-Forsythe) e se o resíduo de uma observação não foi correlacionado com o resíduo em outra observação, se foram independentes (teste de Durbin-Watson) e se a relação entre X_i e Y_i era linear (teste lack-of-fit) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o ácido salicílico foram avaliados pela relação sinal/ruído que é aplicável aos métodos instrumentais que apresentam ruído de linha de base (ANVISA, 2003).

Efeito matriz

A avaliação do efeito da matriz para os analitos AAS e AS foi estudada através da comparação de uma curva analítica com três curvas de adição do analito em três matrizes diferentes (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). A segunda etapa da avaliação do efeito da matriz incluiu a análise de dados e os testes de premissas conforme delineamento experimental da linearidade. Após a análise da linearidade, o efeito da matriz foi avaliado pelas comparações das inclinações e interseções determinadas para as três curvas de adição do analito nas três matrizes diferentes com a da curva analítica. O teste preconizado para comparação das inclinações e interseções das curvas foi o teste de t (ARMITAGE & BERRY, 1994).

Exatidão

A exatidão foi avaliada em três curvas analíticas (sete níveis) com adição-padrão em soluções originadas de três fabricantes diferentes cujos teores de AAS e do AS foram previamente determinados. A exatidão foi comprovada pelo o cálculo da recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Precisão

A repetitividade foi determinada pela análise do AAS e AS em dez alíquotas do mesmo "pool" de três diferentes fabricantes. O desvio padrão (s) e o desvio padrão relativo percentual de repetitividade (DPRr) dos teores encontrados foram calculados e comparados com os limites estabelecidos em função da concentração de analito (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). A reprodutibilidade interna foi avaliada através de determinações analíticas dos teores de AAS e AS em dez alíquotas do mesmo "pool" de cada um dos três fabricantes, no mesmo laboratório, utilizando o mesmo método e os mesmos procedi-

TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
PARA SEUS NEGÓCIOS



18ª edição

 **FCE
PHARMA**

EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA
PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

O espaço ideal para a geração de grandes e importantes negócios da indústria farmacêutica.

Uma visão de futuro, inovações em produtos, equipamentos e serviços em um único lugar.

Tecnologia, lançamentos e conteúdo indispensáveis para o setor. Um ponto de encontro de profissionais altamente qualificados.

Venha para o evento mais completo do setor na América Latina.

14 A 16

MAIO DE 2013

das 13h às 20h
Transamerica Expo Center
São Paulo - SP / Brasil

www.fcepharma.com.br

EVENTOS PARALELOS

**FCE COSMETIQUE**
Exposição Internacional de Tecnologia para a Indústria Cosmética

 2º SEMINÁRIO
FCE PHARMA

PARCERIA EXCLUSIVA

**SINDUSFARMA**
Associação Nacional de Indústria de Farmacos

APOIO

**ABIMIP**

**ABIFINA**

**abiquif**

**ANFARLOG**

**ProGenericos**

**Grupemef**

**SAC**

**USSP**

AGÊNCIA OFICIAL

**ZAZ COMM**

ORGANIZAÇÃO

**NÜRNBERG MESSE**

mentos, porém em dias, equipamentos e três analistas diferentes. Para cada lote analisado determinou-se o desvio padrão da reprodutibilidade interna (Si) e o desvio padrão relativo percentual da reprodutibilidade (DPR_r) e estes foram comparados com os limites estabelecidos em função da concentração de analito (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Robustez

Para avaliar a robustez foram feitas injeções em quadruplicatas da solução de adequação do sistema de AAS com o AS, no cromatógrafo líquido com detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos, sob oito combinações de ensaios diferentes (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Para determinar a robustez do método de ensaio, aplicou-se o teste de *Youden*, que permitiu não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações, as quais o método foi submetido, nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2007).

Aplicação do método validado em amostras industrializadas

Dez lotes de um mesmo medicamento (Fabricante D), que continham 100 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido, foram analisadas pelo método validado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo da linearidade foram escolhidas as faixas de 70% (0,21 mg/mL) a 130% (0,39 mg/mL) da concentração teórica do teste (0,30 mg/mL) para o AAS e de 70% (6,3 µg/mL) a 130% (11,7 µg/mL) do limite máximo de AS especificado, que é de 3% em relação a massa de ácido acetilsalicílico (9,0 µg/mL). As linearidades das curvas analíticas do ácido acetilsalicílico na faixa de concentração estudada foram confirmadas conforme mostrado na Tabela 1, as regressões obtidas foram significativas e não apresentaram desvio da linearidade, os resíduos seguiram a normal, eram independentes e apresentaram comportamento homoscedástico. A sensibilidade para o AAS foi de 1,88 mAbs/(µg/mL) e de 1,84 mAbs/(µg/mL) para o AS. Os limites de detecção e quantificação determinados a partir da curva analítica do ácido salicílico foram, respectivamente, 0,23 µg/mL e 0,69 µg/mL.

O efeito matriz foi avaliado pelas comparações das inclinações e interseções calculadas entre as três curvas de adição padrão e as curvas analíticas de AAS e AS respectivamente, conforme as Tabelas 2 e 3, onde os dados apresentados indicaram que não ocorreu efeito da matriz, pois o t calculado foi menor que o t tabelado, quando se comparou, a cada par, a curva analítica com a curva de adição padrão 1, a curva analítica com a curva de adição padrão 2 e a curva analítica com a curva de adição padrão 3.

TABELA 1. Avaliação da linearidade: ANOVA da regressão, teste de desvio da linearidade (falta de ajuste) e avaliação dos resíduos das curvas analíticas do AAS e do AS

Testes estatísticos	Ácido acetilsalicílico	Ácido salicílico
Análise da Regressão (Modelo: $Y = bx + a$)	área = $1227 \cdot 10^4$ (mg/mL) - 48512	área = 12663 (µg/mL) + 1035
Coefficiente de determinação (r)	0,9995	0,9988
Significância da regressão (ANOVA, $p < 0,001$)	$p = 1,16 \cdot 10^{-25}$	$p = 3,85 \cdot 10^{-21}$
Desvio da linearidade (Falta de Ajuste, $p > 0,05$)	$p = 1,14 \cdot 10^{-1}$	$p = 2,02 \cdot 10^{-1}$
Normalidade dos resíduos Rcrit = 0,95 (AAS) Rcrit = 0,94 (AS) (Ryan-Joiner, Req > Rcrit)	Req = 0,99	Req = 0,97
Autocorrelação dos resíduos dL = 1,16 dU = 1,39 (AAS) dL = 1,13 dU = 1,38 (AS) (Durbin-Watson, dcal > dU)	d (calculado) = 2,10	d (calculado) = 2,08
Homogeneidade dos resíduos (Brown-Forsythe, $p > 0,05$)	$p = 4,72 \cdot 10^{-1}$	$p = 8,48 \cdot 10^{-1}$

TABELA 2. Teste t para comparação das curvas de adição padrão de ácido acetilsalicílico com a curva analítica de AAS

Equação da curva analítica (Ca)	$y = 1,42 \cdot 10^5 + 1,11 \cdot 10^7 x$
Equação da curva de adição padrão 1 (Cap 1)	$y = 9,43 \cdot 10^4 + 1,10 \cdot 10^7 x$
Equação da curva de adição padrão 2 (Cap 2)	$y = 1,97 \cdot 10^5 + 1,08 \cdot 10^7 x$
Equação da curva de adição padrão 3 (Cap 3)	$y = 7,68 \cdot 10^4 + 1,13 \cdot 10^7 x$
t calculado entre Ca e Cap 1	0,593
t calculado entre Ca e Cap 2	0,494
t calculado entre Ca e Cap 3	0,391
t tabelado _{10; 0,05}	2,228

TABELA 3. Teste t para comparação das curvas de adição padrão de ácido salicílico com a curva analítica de AS

Equação da curva analítica (Ca)	$y = 1,03 \cdot 10^3 + 1,27 \cdot 10^4 x$
Equação da curva de adição padrão 1 (Cap 1)	$y = -8,51 \cdot 10^3 + 1,25 \cdot 10^4 x$
Equação da curva de adição padrão 2 (Cap 2)	$y = 8,48 \cdot 10^2 + 1,24 \cdot 10^4 x$
Equação da curva de adição padrão 3 (Cap 3)	$y = 5,09 \cdot 10^3 + 1,38 \cdot 10^4 x$
t calculado entre Ca e Cap 1	0,182
t calculado entre Ca e Cap 2	0,296
t calculado entre Ca e Cap 3	0,661
t tabelado _{10; 0,05}	2,228

A recuperação média do analito em cada nível em três curvas de adição padrão para o AAS foi de 99,9%, 96,4% e 100,1% e para o AS foi de 100,3%, 100,1% e 101,2% ficando entre os limites estabelecidos de 90% a 107%, para o nível de concentração de analito do estudo (AOAC, 2002).

A repetitividade do método foi confirmada pelos valores determinados de desvios padrão relativos de repetitividade (DPR_r) encontrados pelos três diferentes analistas. Os resultados encontrados pelos analistas 1, 2 e 3 na análise do AAS do produto do Fabricante A foram de 2,5%, 1,2% e 1,2%, respectivamente, do produto do Fabricante B foram de 1,0%, 2,1% e 0,7%, respectivamente, e do produto do Fabricante C foram de 0,8%, 1,4% e 0,9%, respectivamente. Os resultados encontrados pelos analistas 1, 2 e 3 na análise do AS do produto do Fabricante A foram de 2,9%, 2,2% e 2,0%, respectivamente, do produto do Fabricante B foram de 8,4%, 7,1% e 5,6%, respectivamente, e do produto do Fabricante C foram de 6,2%, 7,3% e 9,9%, respectivamente. Todos os resultados encontrados ficaram abaixo dos limites estabelecidos de DPR_r em função da concentração do analito, que não podem ultrapassar 5,3% para o ácido acetilsalicílico e 10,7% para o ácido salicílico (HORWITZ, 1982).

A precisão intermediária foi confirmada pelos valores dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (DPR_p). Para a análise do AAS os valores encontrados pelos três analistas foram de

1,7% na análise do produto do Fabricante A, 1,4% na análise do produto do Fabricante B e de 1,6% na análise do produto do Fabricante C. Para a análise do AS os valores encontrados pelos três analistas foram de 2,4% na análise do produto do Fabricante A, 7,5% na análise do produto do Fabricante B e de 8,0% na análise do produto do Fabricante C. Todos os resultados encontrados ficaram abaixo dos limites estabelecidos de DPR_r em função da concentração do analito, que não podem ultrapassar 8,0% para o ácido acetilsalicílico e 16,0% para o ácido salicílico (HORWITZ, 1982).

A robustez do método foi avaliada de acordo com os parâmetros de adequação do sistema (repetitividade das áreas [DPR], pratos teóricos [PT], fator de cauda [FC], retenção [Ret] e resolução [Res]). Os efeitos foram calculados (E1 a E7) e avaliados com a finalidade de revelar aqueles efeitos mais significantes nos resultados dos parâmetros da adequação do sistema para as duas substâncias.

As Tabelas 4 e 5 mostram, respectivamente, os efeitos determinados para cada variação de fator na determinação do ácido acetilsalicílico e na determinação do ácido salicílico. Foi observado que na resolução dos picos, o efeito da variação da composição da fase móvel foi o mais significativo, sugerindo-se trabalhar com a composição de 30% de orgânico (acetonitrila). No desvio padrão relativo das áreas, o efeito da estabilidade das soluções

TABELA 4. Resultados dos efeitos da robustez na análise do ácido acetilsalicílico

Fatores	Resolução	Fator de cauda	Retenção	Pratos teóricos	Repetitividade das áreas
1. Variação do pH da fase móvel (2,3 e 2,6)	1,14	-0,02	-0,30	-111	0,24
2. Variação da composição da fase móvel (30 e 20)% acetonitrila	-3,25	0,05	-2,59	-2491	0,17
3. Variação da temperatura da coluna (30 e 25)°C	-0,72	0,06	-0,11	-545	0,06
4. Variação do fluxo da fase móvel (1,0 e 1,2) mL/minuto	0,26	0,01	0,81	639	0,07
5. Diferente fabricante de coluna (Waters e Merck)	-0,83	0,07	-0,89	-490	0,01
6. Estabilidade das soluções (1 e 2) dias de preparo	0,22	0,03	-0,03	333	0,30
7. Tempo de extração no ultrassom (5 e 10) minutos de extração	-0,45	0,02	0,37	-49	0,26

TABELA 5. Resultados dos efeitos da robustez na análise do ácido salicílico

Fatores	Resolução	Fator de cauda	Retenção	Pratos teóricos	Repetitividade das áreas
1. Variação do pH da fase móvel (2,3 e 2,6)	1,14	-0,05	-0,01	206	0,24
2. Variação da composição da fase móvel (30 e 20)% acetonitrila	-3,25	0,01	-4,14	-3357	0,08
3. Variação da temperatura da coluna (30 e 25)°C	-0,72	0,07	-0,36	-386	0,19
4. Variação do fluxo da fase móvel (1,0 e 1,2) mL/minuto	0,26	-0,01	0,97	877	0,09
5. Diferente fabricante de coluna (Waters e Merck)	-0,83	-0,09	-1,58	277	0,01
6. Estabilidade das soluções (1 e 2) dias de preparo	0,22	0,02	0,05	130	0,31
7. Tempo de extração no ultrassom (5 e 10) minutos de extração	-0,45	0,01	0,61	-995	0,19

foi o que provocou maiores variações, donde conclui-se que é importante que se trabalhe com soluções preparadas no dia da injeção. No fator de cauda dos picos, não houve efeito capaz de causar variações significativas, todos os valores ficaram próximos do zero. Nos fatores de retenção e número de pratos teóricos, o efeito da variação da composição da fase móvel foi o mais significativo, sugerindo-se trabalhar com a composição de 30% de orgânico (acetoneitrila).

A aplicação do método validado a 10 amostras (10 lotes) do Fabricante D foi avaliada após terem sido determinados, em triplicatas, os teores de ácido acetilsalicílico e salicílico. Os resultados encontrados para o AAS conforme os lotes de 1 a 10 foram, respectivamente de: (95 ± 3)%, (93 ± 2)%, (94 ± 1)%, (95 ± 1)%, (99 ± 2)%, (93 ± 2)%, (94 ± 3)%, (98 ± 2)%, (98 ± 1)% e (103 ± 1)% do valor declarado pelo fabricante (100 mg/comprimido). Os resultados encontrados para o AS (ensaio limite) conforme os lotes de 1 a 10 foram, respectivamente de: 0,69%, 0,61%, 0,91%, 0,81%, 0,87%, 0,78%, 0,74%, 0,72%, 0,70% e 0,65%, não excedendo o limite de restrição de 3,0%.

CONCLUSÕES

O estudo da cinética de degradação do ácido acetilsalicílico demonstrou ser uma boa ferramenta para assegurar uma previsão do aumento do teor de ácido salicílico em função do tempo, previsão necessária principalmente em amostras que apresentem teor de AS próximo ao limite de restrição (3,0%). A seletividade foi verificada por comparações dos espectros de absorção no UV do pico no tempo de retenção característico da substância com as respectivas substâncias puras. A linearidade das curvas analíticas do AAS e do AS na faixa de concentração estudada foi confirmada. Os limites de detecção e quantificação determinados a partir da curva analítica do AS foram, respectivamente, 0,23 µg/mL e 0,69 µg/mL.

A repetitividade e a precisão intermediária do método foram confirmadas pelos valores dos desvios padrão relativos de repetitividade (DPR_r) e pelos valores dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (DPR_R), respectivamente. Através do estudo da robustez foi possível constatar que este método pode ser utilizado para determinar o teor de AAS e de AS sob as oito combinações testadas, dentro dos limites estabelecidos para os parâmetros de adequação do sistema. Também foi possível verificar os efeitos mais significativos, principalmente com respeito aos resultados de resolução. O método estudado produziu resultados adequados para garantir a confiabilidade analítica de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em comprimidos, mostrando-se rápido, simples, seletivo e sensível.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/FIOCRUZ pelo incentivo à realização deste trabalho.
Ao orientador professor Dr. Marcio Labastie (*in memoriam*) pela orientação, ideias e incentivo.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J.L.N.; LEANDRO, K.C.; ABRANTES, S.M.P.; ALBERT, A.L.M. Development of a new analytical method for determination of acetylsalicylic and salicylic acids in tablets by reversed phase liquid chromatography. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 2009, *in press*.

AKRE, K.; EKSTRÖM, A.M.; SIGNORELLO, L.B.; HANSSON, L-E; NYRÉN, O. Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden. *British Journal of Cancer*, v.84, p.965-968, 2001.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, D.O.U. 02/06/2003.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *AOAC Official methods of analysis*. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. *Statistical methods in medical research*. Oxford: Blackwell Science Ltda., 1994. 620 p.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. *J.Am. Stat. Assoc.*, v. 69, p. 364-367, 1974.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*, v. 38, p. 159-178, 1951.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.

ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). *Validation of analytical procedures: methodology*. Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8 p.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. *A procedure to assess linearity by ordinary least squares method*. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais/Faculdade de Farmácia/Departamento de Alimentos, 2005.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 835-855, 2002.

THE UNITED STATES PHARMACOPÉIA. USP 31 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US-FDA; Guidance for Industry, *Analytical Procedures and Method Validation*, 2000.