

**INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE  
EM SAÚDE/FIOCRUZ**

**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA  
QUALIDADE DE PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS  
VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

**LABORATÓRIO OFICIAL NA AVALIAÇÃO CRÍTICA  
DAS MONOGRAFIAS FARMACOPEICAS:  
“SYSTEM SUITABILITY”, RISCO SANITÁRIO E  
DESENVOLVIMENTO DE NOVO MÉTODO ANALÍTICO POR  
CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO  
E DO ÁCIDO SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS**

**JOSÉ LUIZ NEVES DE AGUIAR**

**ORIENTADOR: MSc. ANDRÉ LUÍS MAZZEI ALBERT**

**MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO EM VIGILÂNCIA  
SANITÁRIA**

**RIO DE JANEIRO / RJ: JANEIRO / 2006**

**JOSÉ LUIZ NEVES DE AGUIAR**

**LABORATÓRIO OFICIAL NA AVALIAÇÃO CRÍTICA  
DAS MONOGRAFIAS FARMACOPEICAS:  
“SYSTEM SUITABILITY”, RISCO SANITÁRIO E  
DESENVOLVIMENTO DE NOVO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA  
A LÍQUIDO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO EM  
COMPRIMIDOS**

Monografia de Especialização apresentada ao Curso de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária como requisito parcial para a obtenção do Diploma de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Orientador: MSc. André Luís Mazzei Albert.

Rio de Janeiro, 2006

**JOSÉ LUIZ NEVES DE AGUIAR**

**LABORATÓRIO OFICIAL NA AVALIAÇÃO CRÍTICA  
DAS MONOGRAFIAS FARMACOPEICAS:  
“SYSTEM SUITABILITY”, RISCO SANITÁRIO E  
DESENVOLVIMENTO DE NOVO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA  
A LÍQUIDO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO EM  
COMPRIMIDOS**

Esta Monografia será julgada adequada para a obtenção do grau de Especialista a em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária e aprovada em sua forma final pelo Curso de Mestre em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Local – RJ, 13 de janeiro de 2006.

---

MSc. André Luís Mazzei Albert (Orientador/presidente)  
INCQS/FIOCRUZ

---

Dr. Josino Costa Moreira (segundo membro)  
VPSRA/FIOCRUZ

---

Dra. Kátia Cristina Leandro Antunes (terceiro membro)  
INCQS/FIOCRUZ

---

Wilson Camargo (suplente)  
INCQS/FIOCRUZ

---

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

A282 Aguiar, José Luiz Neves de

Laboratório oficial na avaliação crítica das monografias farmacopeicas :  
‘System suitability’, risco sanitário e desenvolvimentos de novo método  
analítico por cromatografia a líquido do ácido acetilsalicílico e do ácido  
salicílico em comprimidos / José Luiz Neves de Aguiar. – Rio de Janeiro,

2006.

xv, 72 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: André Luís Mazzei Albert.

Monografia (especialização) – Instituto Nacional de Controle da  
Qualidade em Saúde, Especialista em Controle da Qualidade de Produtos,  
Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária, 2005.

1. Risco sanitário. 2. Cromatografia líquida de alta pressão. 3. Ácido  
acetilsalicílico. 4. Ácido salicílico. I. Título.

CDD: 615.3137

---

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por ter me guiado e auxiliado em todos os momentos da minha vida e, principalmente, por me dar forças, perseverança e estímulo.

A Direção do INCQS que desde 2001 tornaram o ensino e a pesquisa uma das prioridades institucionais, possibilitando assim o apoio dado ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao chefe do Laboratório Lenilson Alves Neto, a minha chefe de Setor Mariete Ferreira Lemos e a chefe do Departamento Kátia Miriam Peixoto Menezes agradeço pelo apoio.

Ao meu orientador André Luís Mazzei Albert por ser a minha fonte inspiradora no conhecimento de Química, vinculada a análises de medicamentos.

À amiga Maria Virgínia Carvalheiros por sempre ter me incentivado durante a minha Graduação e agora na Especialização. Agradeço também por ter me mostrado a importância de se ter uma visão crítica sobre perícia analítico-laboratorial de medicamentos.

Ao Grupo de Medicamentos e aos amigos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, onde sou servidor desde 1996.

Em especial a minha esposa Rosângela, pela paciência e compreensão, e aos meus filhos Lucas, Michelly e Alexandre, com muito amor.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que tentam  
melhorar a Saúde e a Educação deste País.

*"Se eu pudesse deixar algum presente a você,  
Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.  
A consciência de aprender tudo que foi ensinado pelo tempo afora.  
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais repetissem.  
A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se  
pudesse, o respeito àquilo que é indispensável.  
Além do pão, o trabalho.  
Além do trabalho, a ação.  
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:  
o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para  
encontrar a saída".*

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

O trabalho aqui apresentado tem como objetivo principal mostrar que na rotina do laboratório, no que concerne ao Controle de Qualidade de medicamentos, não é fato pouco comum a obtenção e resultados de qualidades discutíveis, mesmo seguindo com todo rigor a metodologia descrita em um compêndio tomado como referencial. Foram citados, por exemplo, alguns métodos de análise que utilizam Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), cujos os resultados, por vezes, causam espécie ao analista em termos de “System Suitability”(retenção, número de pratos teóricos, seletividade, resolução e simetria), inviabilizando os resultados finais, não obstante constem na monografia os dados referentes à conformidade e adequação do cromatograma.

Com esta finalidade, foi dado enfoque à Metodologia Farmacopeica do Maleato de Enalapril, a do Ácido Acetilsalicílico e à Metodologia Farmacopeica da Rifampicina e Isoniazida. Foi apresentada alguma situação em que não se obtiveram resultados satisfatórios, mesmo utilizando os materiais e equipamentos validados e seguindo as técnicas analíticas oficiais acima. Depois de feita uma avaliação e comentários de possíveis causas, foram propostas alterações/modificações que, efetivamente, possam trazer vantagens metodológicas e que se reflitam, obviamente, em resultados mais apreciáveis.

Foi desenvolvida uma metodologia por CLAE para dosar o ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico na Aspirina que apresentou dados referentes ao “System Suitability” melhores do que a metodologia por CLAE da Farmacopéia Americana (USP 28) e vantagens metodológicas sobre a metodologia volumétrica da Farmacopéia Brasileira (FB 2002).

Essa temática foi proposta para a discussão da importância do senso crítico que o profissional que trabalha na rotina do laboratório de Controle de Qualidade voltado para Vigilância Sanitária de medicamentos (sendo no INCQS ou nos LACENS), deve possuir ao analisar criticamente algumas metodologias “Farmacopeicas”, quanto ao “System Suitability” e ao Risco Sanitário para a população.

**Palavras-chave:** Risco sanitário, Cromatografia líquida de alta pressão, Ácido acetilsalicílico, Ácido salicílico.

## ABSTRACT

This work has the purpose at showing that in the routine of medicines a quality control laboratory is common obtainment uncertain results, even following rigidity the Pharmacopoeia official methodology.

Some ways of analysis by HPLC were mentioned but theirs System Suitability results weren't good concerning about peak width, symmetry factor our tailing, resolution, plate cont and so on for enalapril maleato, acetylsalicylic acid and rifampin and isoniazid. More over some cement were done and also were proposed changes in order to amend the chromatograms.

A new HPLC methodology for acetylsalicylic and salicylic acid quantification in tables were also developed. These new method has butter System Suitability than USP method and some advantages over Brazilian Pharmacopoeia.

This there has been proposed in order to show the meaning of critical sense that the INCQS or LACEN worker must have toward methodologies concerning about System Suitability and Sanitary Hazard of people.

**Key words:** Sanitary hazard, High pressure liquid chromatography, Acetylsalicylic acid, salicylic acid.



## LISTA DE ABREVIACÕES

ATF - Ácido Trifluoracético

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BP – Farmacopéia Inglesa

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CARBON LOAD - Densidade de Carga

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

CCF - Cromatografia de Camada Fina

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD - Detector com Arranjos de Diodos

DPR - Desvio Padrão Relativo

EP – Farmacopéia Européia

FB – Farmacopéia Brasileira

FDA – Food and Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

INCQS – Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

JP – Farmacopéia Japonesa

LACENS – Laboratórios Centrais de Saúde Pública

OMS – Organização Mundial da Saúde

SQR - Substância Química de Referência

USP – Farmacopéia Americana

UV/VIS – Ultravioleta/Visível

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> limites dos parâmetros para o "System Suitability" _____	18
<b>Tabela 2:</b> principais parâmetros que devem ser avaliados na determinação da "Robustez" na validação _____	19
<b>Tabela 3:</b> classificação dos testes, segundo sua finalidade _____	26
<b>Tabela 4:</b> parâmetros necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade _____	26
<b>Tabela 5:</b> limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos _____	27
<b>Tabela 6:</b> níveis de concentração e área média obtida nas injeções usadas na curva de calibração do ácido acetilsalicílico _____	61
<b>Tabela 7:</b> análise residual obtida usando o programa Statistica 5.0 na obtenção da curva de calibração do ácido acetilsalicílico _____	62
<b>Tabela 8:</b> níveis de concentração e área média obtida nas injeções usadas na curva de calibração do ácido salicílico _____	64
<b>Tabela 9:</b> análise residual obtida usando o programa Statistica 5.0 na obtenção da curva de calibração do ácido salicílico _____	64
<b>Tabela 10:</b> comparação dos resultados encontrados na amostra fiscal de ácido acetilsalicílico no ensaio de teor, usando metodologias diferentes _____	68

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico usando o programa Statística 5.0 \_\_\_\_\_62

**Gráfico 2:** ampliação do gráfico da curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico usando o programa Statística 5.0; obtenção pelo método gráfico do Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) \_\_\_\_\_63

**Gráfico 3:** curva de calibração da SQR USP Ácido Salicílico usando o programa Statística 5.0 \_\_\_\_\_65

**Gráfico 4:** ampliação do gráfico da curva de calibração da SQR USP Ácido Salicílico usando o programa Statística 5.0; obtenção pelo método gráfico do Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) \_\_\_\_\_66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> representação estrutural do maleato de enalapril	09
<b>Figura 2:</b> representação estrutural da rifampicina	10
<b>Figura 3:</b> representação estrutural da isoniazida	11
<b>Figura 4:</b> representações estruturais da salicilina, do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico	12
<b>Figura 5:</b> representação estrutural do ácido acetilsalicílico	13
<b>Figura 6:</b> representação estrutural do ácido salicílico	13
<b>Figura 7:</b> representação esquemática de um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência	14
<b>Figura 8:</b> esquema de separação cromatográfica	15
<b>Figura 9:</b> tipos de cromatografias	17
<b>Figura 10:</b> representação de um cromatograma e os volumes de retenção dos sinais	20
<b>Figura 11:</b> representação de um cromatograma contendo um sinal com cauda	23
<b>Figura 12:</b> cromatograma da SQR USP Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28	30
<b>Figura 13:</b> cromatograma da SQR USP Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 com o primeiro ajuste na polaridade da fase móvel	31
<b>Figura 14:</b> cromatograma da SQR USP Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 com o segundo ajuste na polaridade na fase móvel	31
<b>Figura 15:</b> cromatograma da amostra de Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 com o primeiro ajuste na polaridade da fase móvel	32
<b>Figura 16:</b> cromatograma da amostra de Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel	32
<b>Figura 17:</b> cromatograma da amostra em modo de sobreposição com o cromatograma da SQR Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel	33
<b>Figura 18:</b> espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,01 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16)	33

- Figura 19:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,47 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16)\_\_\_\_\_34
- Figura 20:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 2,75 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16)\_\_\_\_\_34
- Figura 21:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 3,37 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16)\_\_\_\_\_35
- Figura 22:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 4,10 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16)\_\_\_\_\_35
- Figura 23:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,09 minutos no cromatograma obtido da SQR Maleato de Enalapril (figura 14)\_\_\_\_\_36
- Figura 24:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 3,27 minutos no cromatograma obtido da SQR Maleato de Enalapril (figura 14)\_\_\_\_\_36
- Figura 25:** cromatograma do reagente ácido maleico em condições preconizadas na USP 28 com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel \_\_\_\_\_37
- Figura 26:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,09 minutos no cromatograma obtido do reagente ácido maleico (figura 25)\_\_\_\_\_38
- Figura 27:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,31 minutos no cromatograma obtido do reagente ácido maleico (figura 25)\_\_\_\_\_38
- Figura 28:** cromatogramas em modo de sobreposição obtidos conforme o primeiro modo e o segundo modo de solubilização das SQR USP Isoniazida e Rifampicina em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_41
- Figura 29:** cromatograma da amostra obtido conforme o primeiro modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_42
- Figura 30:** cromatograma da amostra obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28\_\_\_\_\_42
- Figura 31:** cromatogramas em superposição da amostra obtido conforme o primeiro e o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_43
- Figura 32:** cromatograma da SQR Isoniazida obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_44
- Figura 33:** cromatograma da SQR Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_44

**Figura 34:** cromatograma da solução contendo a SQR Isoniazida e Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_45

**Figura 35:** cromatograma da amostra de Isoniazida e Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_46

**Figura 36:** cromatograma de uma amostra reteste de Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_47

**Figura 37:** cromatogramas em modo de sobreposição da SQR Rifampicina em escala normal, injeções feita do mesmo frasco em quatro dias consecutivos (0,1,2 e 3 dias) após exposição à luz ambiente, obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_48

**Figura 38:** cromatogramas em modo de sobreposição da SQR Rifampicina em escala ampliada, injeções feita do mesmo frasco em quatro dias consecutivos (0,1,2 e 3 dias) após exposição à luz ambiente, obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_48

**Figura 39:** cromatograma de uma nova preparação da SQR Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_49

**Figura 40:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 10,53 minutos no cromatograma da SQR Rifampicina (figura 39), obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_50

**Figura 41:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 11,36 minutos no cromatograma da SQR Rifampicina (figura 39), obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_50

**Figura 42:** cromatograma de uma nova preparação da amostra Isoniazida e Rifampicina, obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_51

**Figura 43:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 10,72 minutos no cromatograma da amostra de Isoniazida e Rifampicina (figura 42), obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_52

**Figura 44:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 11,46 minutos no cromatograma da amostra de Isoniazida e Rifampicina (figura 42), obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_52

**Figura 45:** cromatograma de uma nova preparação da amostra Isoniazida e Rifampicina, fixando o comprimento de onda em 475 nm, obtido conforme o segundo modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_53

**Figura 46:** cromatograma da SQR Ácido salicílico, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_56

**Figura 47:** cromatograma da SQR Ácido Acetilsalicílico, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_56

**Figura 48:** cromatograma das SQR Ácido salicílico e Ácido acetilsalicílico com os parâmetros do “System Suitability” determinados, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_57

**Figura 49:** cromatograma das SQR Ácido salicílico e Ácido acetilsalicílico utilizando uma outra coluna (de outro fabricante, coluna endcapped) e outro cromatógrafo, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 \_\_\_\_\_58

**Figura 50:** cromatograma da SQR Ácido Acetilsalicílico, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS \_\_\_\_\_59

**Figura 51:** cromatograma da SQR Ácido Salicílico, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS \_\_\_\_\_60

**Figura 52:** cromatograma das SQR Ácido Acetilsalicílico e Ácido salicílico, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS \_\_\_\_\_61

**Figura 53:** cromatogramas da curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico em modo de sobreposição, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS \_\_\_\_\_62

**Figura 54:** cromatogramas da curva de calibração da SQR USP Ácido Salicílico em modo de sobreposição, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS \_\_\_\_\_64

**Figura 55:** cromatograma da amostra fiscal de aspirina, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS \_\_\_\_\_66

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	01
1.2 AS COMPETÊNCIAS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE.....	02
1.3 A FARMACOPÉIA BRASILEIRA.....	03
1.4 PERÍCIA ANALÍTICO-LABORATORIAL DE MEDICAMENTOS.....	04
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	07
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	08
3.1 BREVE HISTÓRICO DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS.....	08
3.2 A CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO .....	14
3.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO .....	25
3.4 PORQUE CALCULAR A INCERTEZA .....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
4.1 O MALEATO DE ENALAPRIL .....	30
4.2 RIFAMPICINA E ISONIAZIDA .....	39
4.3 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO .....	54
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	71



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

O novo salto na concepção sanitária nacional pode ser mais bem percebido através da definição de Vigilância Sanitária da Lei nº. 8.080 de 1990, que regulamenta o SUS. “Entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de serviços de interesse da saúde...”<sup>17</sup>.

No bojo das conquistas sociais advindas da promulgação da nova Constituição Federal, surgiu o Código de Defesa do Consumidor, Lei nº. 8.079, de 1990, que, entre outras determinações, busca a proteção da saúde contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O Código de Defesa do Consumidor externa o entendimento social de serem a qualidade e o risco responsabilidades do fabricante e ou fornecedor<sup>17</sup>.

A ação da Vigilância Sanitária deve ocorrer quando verificada a existência de riscos ou situações prováveis de ocorrências de riscos, de modo que, encontradas as causas, atua-se para evitar a reincidência desses fatores. Assim, o princípio da precaução é, por natureza, o mais típico dos atuais princípios relacionados à Vigilância Sanitária, porque é em função dele que os profissionais atuam. É para a existência (ou probabilidade de existência) de risco que se dirigem as ações dessa Instituição<sup>21</sup>.

No dia 27 de janeiro de 1999 o Congresso Nacional promulgou a lei 9782 que dispôs sobre o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Conforme esta lei, ficou definida que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) teria por finalidade “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras”<sup>14</sup>.

Dentro de toda esta evolução e discussão acerca dos acontecimentos referentes à Vigilância Sanitária, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) acabou por acompanhar todas estas alterações no cenário da Vigilância. Suas atribuições foram ampliadas e suas ações acabaram por se tornar mais efetivas no âmbito da referência nacional e das ações científicas e tecnológicas, relacionadas ao controle de qualidade de produtos de

interesse da saúde. Conforme a legislação vigente no período, o INCQS tornou-se subordinado tecnicamente a Anvisa e, administrativamente, à Fiocruz<sup>14</sup>.

## 1.2 COMPETÊNCIAS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde acumula diversas competências conforme o artigo número 32, do decreto 4725 de 09 de junho de 2003, referentes ao Estatuto da Fiocruz. Dentre as funções previstas realizam-se o controle de qualidade de produtos para o consumo humano, em especial os medicamentos<sup>11</sup>.

O INCQS atua em todo o território nacional atendendo ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Entre os parceiros do INCQS pode-se citar a Anvisa, os Laboratórios Centrais e Centros de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde.

Suas atribuições resumem-se a atividades exclusivas de Estado. Suas missões a serem destacadas são: perícia analítico-laboratorial no contexto legal da Vigilância Sanitária; desenvolvimento e transferência de tecnologia e cooperação técnica com organismos nacionais e internacionais. Desta forma, o INCQS acaba por desempenhar papel de principal órgão nacional para questões tecnológicas e normativas, relativas ao controle de qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços no contexto do SUS. Este conjunto de atribuições torna a atuação do INCQS estratégica para a Vigilância Sanitária e mais ainda para a Anvisa<sup>11</sup>.

O INCQS tem como Missão – “Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária”<sup>11</sup>.

O INCQS tem como Visão – “Ser reconhecido como órgão de alta competência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária”<sup>11</sup>.

### 1.3 A FARMACOPÉIA BRASILEIRA

As farmacopéias são os Códigos Oficiais Farmacêuticos de um determinado país onde se estabelece a qualidade dos medicamentos em uso. Hoje em dia os objetivos das entidades que elaboram as farmacopéias (a Farmacopéia Brasileira é elaborada pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia - CPRFB - que é uma comissão oficial, nomeada pelo Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA) são mais amplos. Estão focadas na formação e aperfeiçoamento de recursos humanos na área de controle de qualidade e apoio à pesquisa, visando aumentar a segurança e eficácia dos fármacos em uso<sup>20</sup>.

No caso brasileiro, a escolha dos medicamentos a serem incluídos no compêndio oficial não é feita por acaso. Em primeiro lugar, são escolhidos os medicamentos que constam da Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME) ou da lista da Organização Mundial de Saúde. São, também, elaboradas em caráter de prioridade, as monografias dos medicamentos a serem selecionados pelos programas especiais de saúde e dos novos produtos de maior interesse terapêuticos<sup>7</sup>.

A Farmacopéia Brasileira elabora textos técnicos, por exemplo: testes ou métodos de análise e monografias para a matéria-prima (ingrediente ativo do medicamento na sua forma básica) e especialidades farmacêuticas (comprimidos, cápsulas, cremes, pomadas, injetáveis, etc.)<sup>7</sup>.

Para elaborar as monografias para a Farmacopéia Brasileira (FB), primeiramente, a subcomissão pertinente é um membro da CPRFB com sua equipe ou um órgão oficial de controle de qualidade no Brasil (cuja referência é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS - na Fundação Oswaldo Cruz e os demais laboratórios centrais dos estados – LACEN) ou uma indústria farmacêutica, que poderão propor a monografia de um fármaco<sup>7</sup>.

Esta não se caracteriza por uma monografia simples e deve ser submetida a uma série de estudos especiais que comprovem o cumprimento de todas as exigências de um estudo químico, perfeitamente validado. Se a monografia for julgada adequada pela CPRFB, ela é remetida para os outros colaboradores da FB, nos três segmentos que a compõem: INCQS e órgãos oficiais de controle de qualidade, indústria farmacêutica e universidades, com o objetivo de certificação, ou seja, verificar se a metodologia funciona e fornece os mesmos resultados em diferentes laboratórios.

Se os resultados forem adequados, a tal monografia é reavaliada pela CPRFB e, sendo aprovada, é colocada em Consulta Pública durante três meses, sob apreciação da comunidade científica. Caso não ocorram manifestações contrárias, que serão analisadas, a monografia é enviada à apreciação e oficialização da Anvisa<sup>07</sup>.

#### 1.4 PERÍCIA ANALÍTICO-LABORATORIAL DE MEDICAMENTOS

Este trabalho tem o foco voltado para perícia analítico-laboratorial de medicamentos, o INCQS, sendo o cabeça da rede compostas dos Laboratórios Centras (LACENS). Possui uma grande demanda de amostras diversificadas de medicamentos provindos de todos os estados. Sendo assim, o INCQS necessita dar respostas consistentes e com certa agilidade para que a Anvisa tome decisões estratégicas, a afim de minimizar o Risco Sanitário para a população.

A indicação de um medicamento é determinada pela sua eficácia, em relação a sua inocuidade, segundo indicada na bula ou em textos de propaganda ou publicidade; e sua conformidade, com as especificações de identidade, aspecto, teor, pureza, entre outras.

Desta forma existem fatores que determinam a aceitação ou rejeição de medicamentos dentro dos critérios de qualidade. Para avaliar se o medicamento atuará do modo previsto, vários ensaios são especificados compreendendo um conjunto de normas selecionadas junto aos métodos de análise correspondente. Estes ensaios ou métodos de análise estão descritos na monografia de cada produto na farmacopéia oficial. Isso porque a farmacopéia corresponde ao código oficial, que estabelece os padrões a que determinada substância deve satisfazer para ser utilizada como medicamento<sup>12</sup>.

Do ponto de vista da definição de Vigilância Sanitária, a Lei nº. 8.080 de 1990 é clara quanto à preocupação que deve ter um Laboratório Oficial de minimizar o Risco Sanitário. Devido a este fato, a afirmação de Korolkovas (1984) do parágrafo anterior é limitada, fazendo-se necessária uma apurada investigação da denúncia e realizações de ensaios, muitas vezes não preconizados para determinado produto da farmacopéia oficial.

É de vital importância que o profissional que trabalhe na atividade analítica deste Instituto possua, além de uma sólida experiência nesta modalidade de análise, um elevado senso crítico investigativo para avaliar metodologias analíticas sendo de fabricantes ou sendo Farmacopeicas. Esses atributos são fundamentais para que o analista não seja um simples reprodutor de metodologias, o que se torna incompatível com a demanda do laboratório de medicamentos do INCQS.

Devido ao fato de que as amostras que chegam ao INCQS para serem analisadas vêm acompanhadas de uma denúncia, a mesma está relacionada a vários fatores, como a falta de efeito, intoxicação, óbito e outros. Faz-se necessário que o analista dê o tom investigativo, com intuito de encontrar a causa desta denúncia para que a Anvisa tome as devidas providências para minimizar o Risco Sanitário da população.

É importante ressaltar que as amostras que chegam ao INCQS através de denúncia não são representativas de um Universo Amostral. São ditas amostras “batizadas”, ou seja, se o laboratório encontrou a causa de uma determinada denúncia em um lote de um produto proveniente da Indústria Farmacêutica esta análise não poderá ser representativa para os lotes anteriores e nem para os lotes posteriores ao lote analisado. Porém, a experiência e o senso crítico necessários quanto ao Risco Sanitário nos impedem de acreditar que, durante a fabricação de vários lotes, a Vigilância conseguiu apreender somente aquele que de fato apresentou desvio de qualidade, ficando, assim, sob suspeita os lotes imediatamente anteriores e posteriores ao analisado.

As metodologias usadas em um Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos de uma Indústria Farmacêutica, geralmente foram desenvolvidas e validadas para um determinado produto, produto este que contém excipientes específicos em sua formulação. Fato semelhante acontece com as Metodologias Farmacopeicas de produto acabado: foram desenvolvidas e validadas por fabricante de determinados medicamentos. Devido a este fato, o profissional que trabalha neste tipo de laboratório não tem dificuldades em executar o controle deste medicamento, pois uma vez fixadas as condições analíticas a sua preocupação será apenas de mantê-las até o final da análise.

Diferentemente, o profissional que trabalha em um Laboratório Oficial de Controle de Qualidade de Medicamentos é obrigado, por Lei, a usar a versão mais atual da Metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira e, na ausência desta, deverá usar as Metodologias mais atualizadas, descritas em outras Farmacopéias para analisar produtos diferentes que contenham o mesmo princípio ativo, porém que apresentem excipientes diferentes e que não necessariamente gerem a mesma resposta quanto ao “System Suitability” na CLAE.

Esta prioridade em se ter em Lei o uso da Farmacopéia Brasileira é questionável quanto à atualização do conhecimento de substâncias relacionadas e produtos de degradação, já mencionados e controlados em outra farmacopéia mais atualizada. Nesta situação, o profissional deverá usar a metodologia oficial que seja capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, provindos da produção como está definido na Lei nº. 8.080 de 1990 que define a Vigilância Sanitária.

As dificuldades se tornam maiores devido ao fato do analista não dispor exatamente das mesmas condições instrumentais nas quais a Metodologia Farmacopeicas foi validada. Como exemplo, podemos citar tamanho e forma da partícula da fase estacionária e percentagem de Recobrimento da Fase Ligada (Densidade de Carbono) que geralmente não são citadas na metodologia Farmacopeicas e que afetam diretamente um cromatograma, em termos de retenção (K), seletividade ( $\alpha$ ), número de pratos teóricos (N) e simetria (às vezes vários parâmetros simultaneamente). Conseqüentemente, compromete a resolução (R), inviabilizando os resultados finais comparados ao que consta na monografia os dados referentes à conformidade e adequação do cromatograma (“System Suitability”).

Outro fato importante é que nas metodologias Farmacopeicas geralmente o analista não encontra um procedimento detalhado para a execução do ensaio. Ele somente encontra as condições finais de análise; por vezes, devido ao fato de o mesmo produto apresentar diferentes dosagens faz-se necessário que o analista ajuste ou até mesmo modifique o modo com que ele dissolve o padrão e a amostra com a finalidade de garantir a total solubilização de ambos.

Morin (2000) alerta para o fato de que, mais vale uma cabeça bem feita que bem cheia. E explica:

*O significado de “uma cabeça bem feita” é óbvio:*

*É uma cabeça onde o saber é acumulado, empilhado, e não dispõe de um princípio de seleção e organização que lhe dê sentido. “Uma cabeça bem feita” significa que, em vez de acumular o saber, é mais importante dispor ao mesmo tempo de:*

*– uma aptidão geral para colocar e tratar problemas;*

*– princípios organizadores que permitam ligar os saberes e lhes dar sentido<sup>13</sup>.*

## 2 OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivo propor, com base em conceitos químicos e físico-químicos, ajustes ao método Farmacopeico, a fim de torná-lo mais adequado em termos de conformidade e adequação do cromatograma (“System Suitability”) e quanto à solubilização do princípio ativo em amostras de diferentes produtos, de diferentes fabricantes. Com esta finalidade foi feita a comparação do ensaio de teor realizado em amostras fiscais de Maleato de Enalapril, Rifampicina com Isoniazida e Ácido acetilsalicílico, utilizando as Metodologias Oficiais, descritas na USP 28 sem efetuar ajustes e com a efetivação dos ajustes necessários.

Foi desenvolvida uma metodologia alternativa por CLAE/UV para dosar o ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico, objetivando compor parte de um projeto para futura validação em uma dissertação de Mestrado. Esta metodologia apresentou dados referentes ao “System Suitability” melhores do que a metodologia por CLAE da Farmacopéia Americana (USP 28) e vantagens metodológicas sobre a metodologia volumétrica da Farmacopéia Brasileira (FB 2002).

Outro objetivo é oferecer um instrumento de trabalho para todos profissionais iniciantes nesta área e principalmente aos LACENS, para que de fato a grande rede de laboratórios oficial funcione. Através deste trabalho e baseado em anos de experiência em bancada, o autor e seu orientador buscam compartilhar aquilo que aprendeu sobre análises de medicamentos voltados para a Vigilância Sanitária.

Através desse estudo, é proposta a discussão da necessidade de se modificar a legislação que trata da prioridade de se usar a Farmacopéia Brasileira, mesmo não estando atualizada em relação a outras Farmacopéias Internacionais, com a finalidade de minimizar o Risco Sanitário, principalmente, quanto à existência de produtos de degradação e impurezas.

### **3 MATERIAS E MÉTODOS**

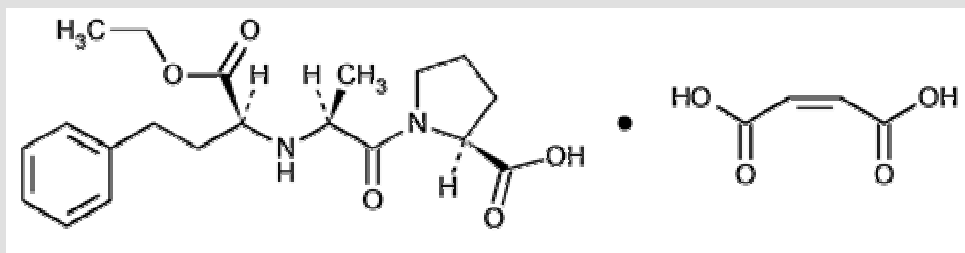
#### **3.1 BREVE HISTÓRICO DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS**

Foi realizado o ensaio de identificação e teor nas amostras fiscais de maleato de enalapril, aspirina e rifampicina com isoniazida que fazem parte da rotina do INCQS, segundo Metodologia Farmacopeica, sem nenhum ajuste e com o devido ajuste.

##### **3.1.1 Maleato de enalapril**

Maleato de Enalapril é um derivado de dois aminoácidos, L-alanina e L-prolina. Após administração oral, Maleato de Enalapril é rapidamente absorvido e, a seguir, hidrolisado a enalaprilato, que é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) altamente específico, de longa ação e não sulfidrílico. Pode ser usado isoladamente como terapia inicial ou associado a outros anti-hipertensivos, particularmente os diuréticos. Maleato de Enalapril inibe a formação de Angiotensina II, um potente vaso constritor (substância que contrai os vasos sanguíneos e aumenta a pressão arterial), que também estimula a secreção de Aldosterona (substância responsável pela retenção de água e sódio no organismo). Portanto, a inibição da ECA resulta em um nível plasmático diminuído de Angiotensina II, e como consequência, leva a uma diminuição da atividade vasopressora e diminuição da secreção da Aldosterona (o que pode resultar em discreto aumento nos níveis séricos do potássio). Através desta ação, o Maleato de Enalapril pode também facilitar o trabalho do coração, tornando-o mais eficiente, o que é importante em casos de insuficiência cardíaca. O início da ação do Maleato de Enalapril é suave e gradativo; inicia-se dentro de uma hora e seus efeitos geralmente continuam por 24 horas. O controle da pressão arterial é, em geral, obtido após alguns dias de tratamento<sup>23</sup>. A figura 1 mostra a representação estrutural do maleato de enalapril.





L-Proline, 1-[N-[1-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-, (S)-, (Z)-2-butenedioate (1:1).  
 1-[N-[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]-L-alanyl]-L-proline 1-ethyl ester, **maleate** (1:1)  
 — [76095-16-4].

**Figura 1:** representação estrutural do maleato de enalapril

### 3.1.2 Rifampicina e isoniazida

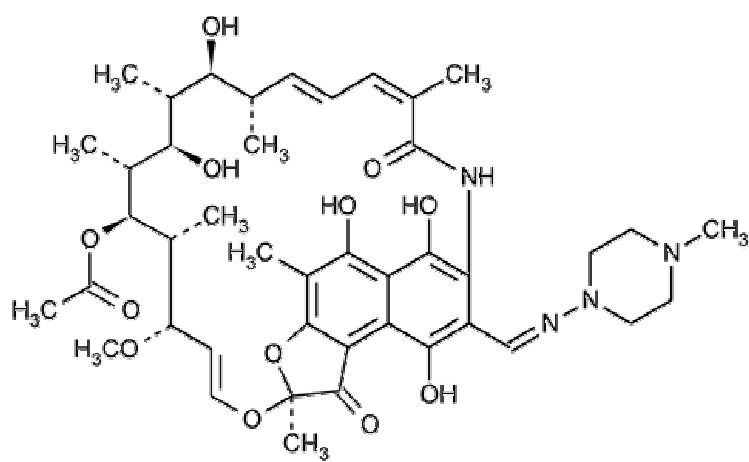
#### 3.1.2.1 Rifampicina

A Rifampicina é um derivado semi-sintético da Rifampicina B e esta é produzida no processo de fermentação do *Streptomyces mediterranei*, com ação em diversas bactérias gram-negativas e gram-positivas<sup>24</sup>.

O principal mecanismo de ação é a inibição da atividade RNA-polimerase DNA-dependente. Embora tenha boa ação antibacteriana, tem sido reservado para o tratamento de hanseníase e tuberculose, em associação com outros antibacterianos, causando rápida resistência, principalmente por mutação na unidade b da RNA-polimerase<sup>24</sup>.

Tem boa absorção no trato gastrointestinal, se reduzindo, no entanto, na presença de alimentos. Apresenta boa distribuição, atingindo inclusive o sistema nervoso. Atravessa a barreira placentária e leite materno. Sua metabolização se faz no fígado, com meia-vida de 3 horas de 600mg administrada, diminuindo um pouco com doses repetidas o que é minimizado porque apresenta ação antibacteriana com níveis mínimos de concentração sanguínea<sup>24</sup>.

A Rifampicina é indicada para o tratamento das diversas formas de tuberculose e hanseníase, causadas por microrganismos sensíveis, mesmo que em associação com outros antibacterianos, na tentativa de diminuir a resistência. É também o fármaco de escolha no tratamento de portadores nasofaríngeos de *Neisseria Meningitides*, de indivíduos que mantiveram contato com portadores de meningite meningocócica ou de crianças pequenas e sem imunização específica, que tiveram contato familiar com meningite pelo Haemophilus B<sup>24</sup>. A figura 2 mostra a representação estrutural da rifampicina.



$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$  — 822.94

Rifamycin, 3-[[4-methyl-1-piperazinyl]imino]methyl]-

5,6,9,17,19,21-Hexahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-8-[N-(4-methyl-1-piperazinyl)formimidoyl]-2,7-(epoxypentadeca[1,11,13]trienimino)naphtho[2,1-*b*]furan-1,11-(2*H*)-dione 21-acetate — [13292-46-1].

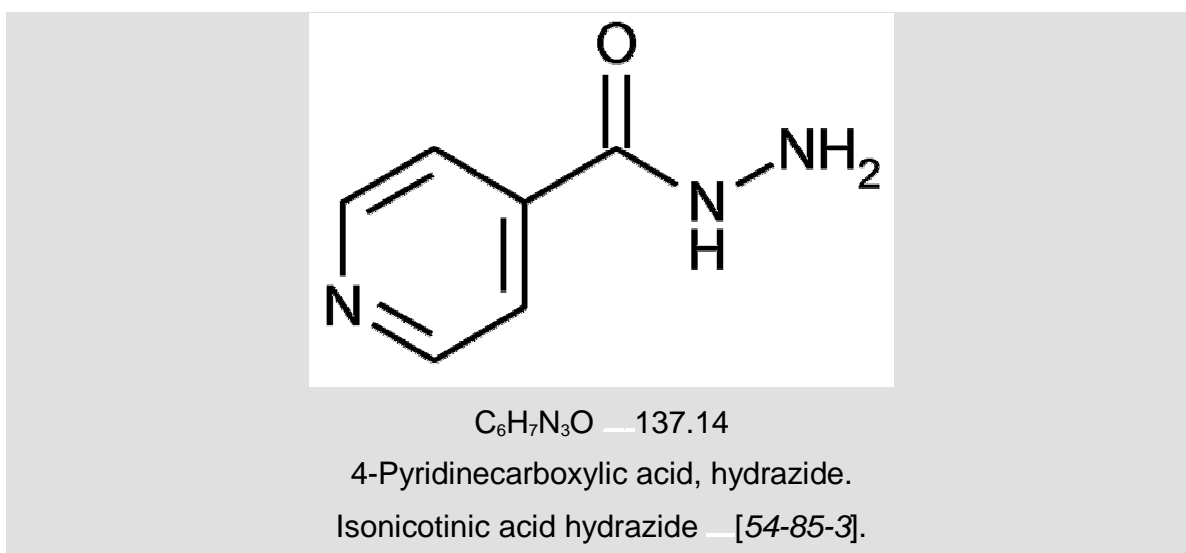
**Figura 2:** representação estrutural da rifampicina

### 3.1.2.2 Isoniazida

A Isoniazida é um derivado sintético do ácido isonicotínico, com ação inibidora da síntese do ácido micólico, componente importante da parede celular da microbactéria. Não atua no entanto em outras bactérias. É considerado um fármaco primário para tratar todas as formas de tuberculose, causadas por bacilos sensíveis a ela<sup>25</sup>.

É bem absorvida pelo aparelho digestivo, mas pode sofrer significativa metabolização por primeira passagem hepática. Distribui-se largamente nos diversos tecidos e fluidos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano, onde forma níveis equivalentes a 20% daqueles presentes no sangue, mas que se elevam na presença de inflamação meníngea, se igualando à concentração sérica<sup>25</sup>.

Atravessa a barreira placentária e é excretada no leite materno. A metabolização é hepática, por acetilação. Há acetiladores rápidos e lentos, sendo estes mais propensos a manifestações de hepatotoxicidade. A meia-vida fica em torno de uma hora nos acetiladores rápidos e de 3 a 5 horas nos lentos, elevando-se ainda mais na presença de hepatopatias. A duração da ação é prolongada, pois os níveis sanguíneos exigidos para agir contra as micobactérias são muito baixos. Permite uso de dose única ou em dias alternados. A Isoniazida é indicada, em associações com outras drogas, em todas as formas de tuberculose causadas por bactérias sensíveis<sup>25</sup>. A figura 3 mostra a representação estrutural da isoniazida.



**Figura 3:** representação estrutural da isoniazida

### 3.1.3 Ácido acetilsalicílico

A aspirina, como é conhecido nas farmácias o ácido acetilsalicílico, completou 100 anos em 1997 e é o medicamento mais conhecido e vendido em todo o mundo. Só nos EUA, são consumidos mais de 30 bilhões de comprimidos de aspirina por ano<sup>26</sup>.

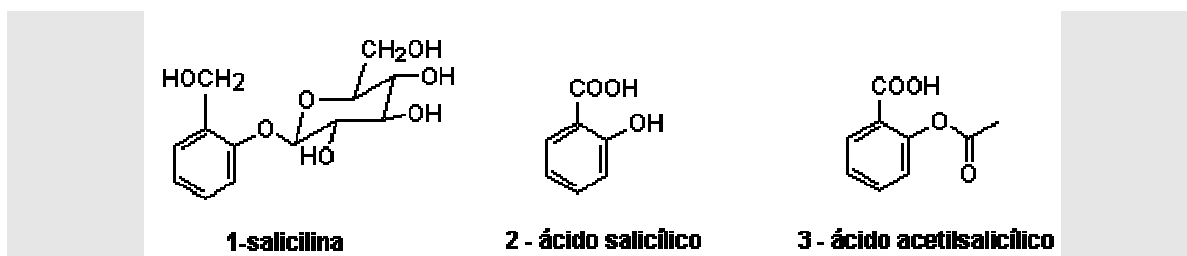
O ácido acetilsalicílico é provavelmente a droga mais associada com plantas, embora ele seja uma substância sintética. Sua síntese, no entanto, foi totalmente feita com base na estrutura química de uma substância natural isolada do salgueiro branco, a *Salix Alba*<sup>26</sup>.

A história deste ácido, muito bem documentada, teve início no século V a.C. com Hipócrates, filósofo e médico grego, considerado o pai da medicina moderna. Hipócrates prescrevia preparações que incluíam cascas e folhas do salgueiro para o tratamento de febres e para aliviar as dores do parto. Assim como Hipócrates, Dioscórides, um dos mais notáveis médicos da Antiguidade, que viveu na Grécia no século I da era cristã e autor da obra "De Matéria Médica", cujo uso se estendeu até o início do Renascimento, receitava emplastos feitos com cascas e folhas do salgueiro para o tratamento de dores reumáticas<sup>26</sup>.

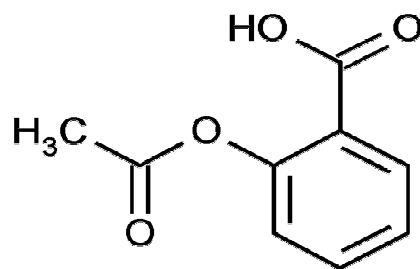
A salicilina, o princípio ativo do salgueiro branco, é encontrada em várias espécies dos gêneros *Salix* e *Populus*<sup>26</sup>.

A substância foi isolada pela primeira vez em 1829 pelo farmacêutico francês H. Leroux. As propriedades anti-reumáticas da salicilina assemelham-se muito às do ácido salicílico, no qual é convertido por oxidação no organismo humano<sup>26</sup>.

A figura 4 mostra somente as representações estruturais da salicilina, do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico. A figura 5 mostra a representação estrutural do ácido acetilsalicílico com a sua fórmula e seu peso molecular, e, a figura 6 mostra a representação estrutural do ácido salicílico com a sua fórmula e seu peso molecular.



**Figura4:** representações estruturais da salicilina, do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico

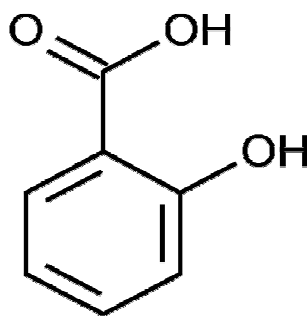


$C_9H_8O_4$  — 180.16

Benzoic acid, 2-(acetyloxy)-.

Salicylic acid acetate — [50-78-2].

**Figura 5:** representação estrutural do ácido acetilsalicílico



$C_7H_6O_3$  — 138.12

Benzoic acid, 2-hydroxy-.

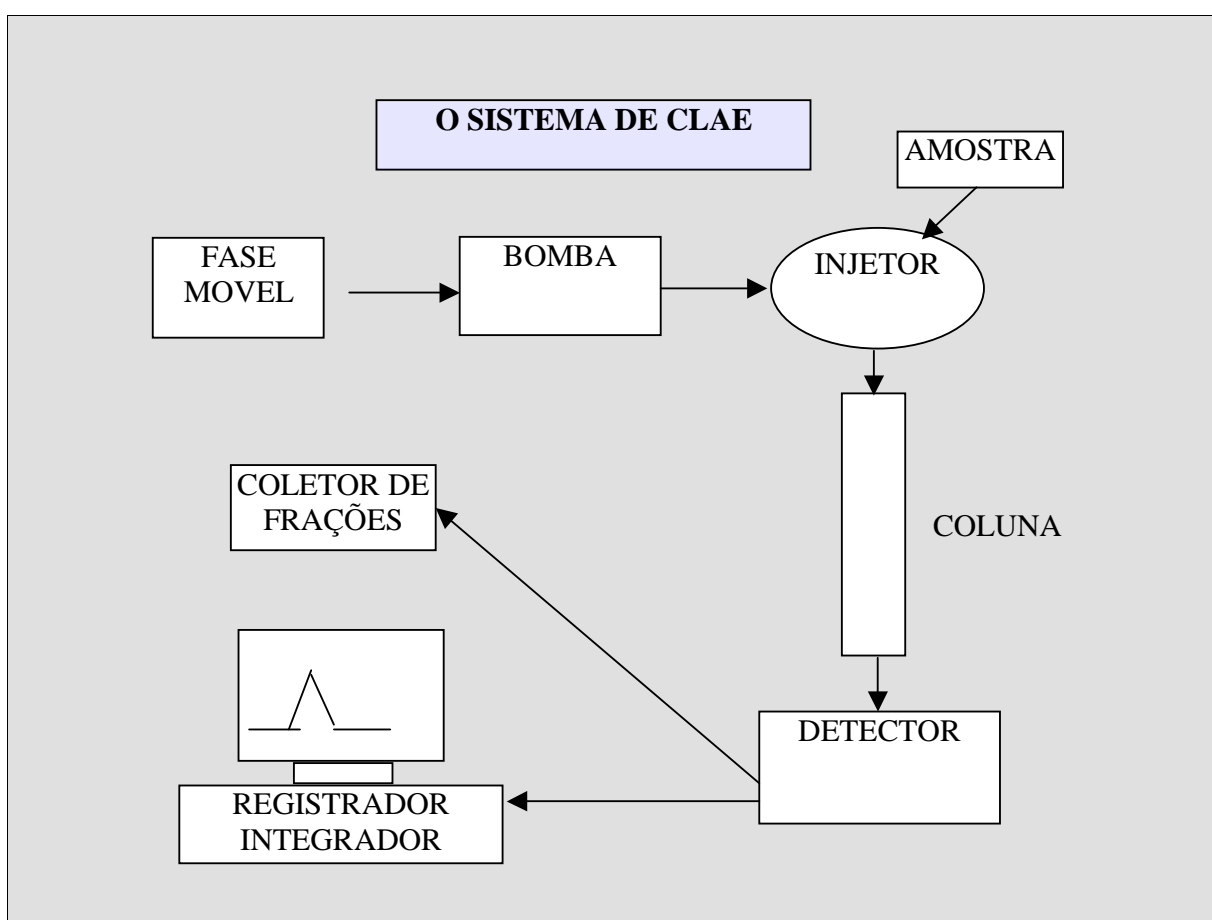
Salicylic acid — [69-72-7].

**Figura 6:** representação estrutural do ácido salicílico

## 3.2 A CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

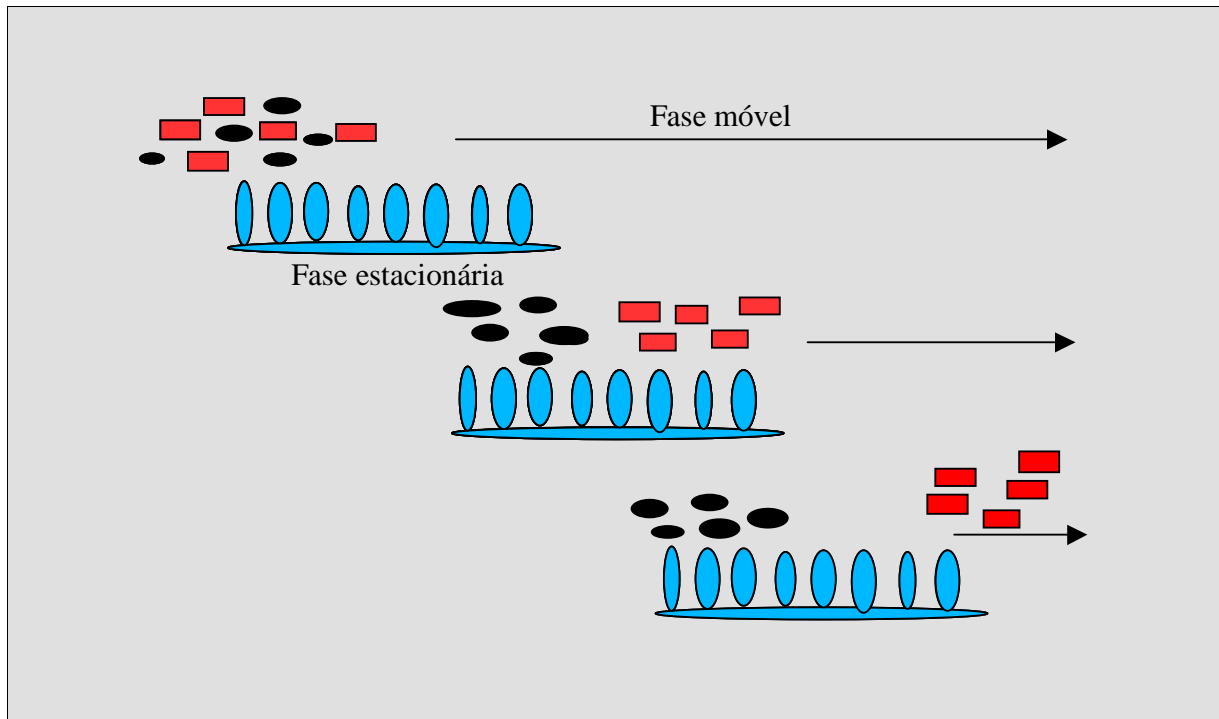
### 3.2.1 Definição

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma metodologia físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases que se encontram em íntimo contato, a fase estacionária (fe) e a fase móvel líquida (fm). Na prática, a fase estacionária é o “suporte” contido no interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente<sup>1</sup>. A figura 7 mostra a representação esquemática de um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência.



**Figura 7:** representação esquemática de um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência<sup>3</sup>

Os componentes da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais, devido ao fato de terem maior ou menor afinidade com a fase móvel. O grau de migração é determinado pela magnitude das interações da fase estacionária e da amostra com a fase móvel<sup>1</sup>. A figura 8 mostra o esquema de separação cromatográfica.



**Figura 8:** esquema de separação cromatográfica<sup>3</sup>

Existem vários tipos de cromatografia. São elas:

Cromatografia de Adsorção ou Líquido-Sólido. A separação entre os analitos presente se dá devido às forças de interação com o adsorvente sólido, que podem ser fortes, como as ligações de hidrogênio, ou fracas como as forças de Van der Waals<sup>1</sup>.

Cromatografia de Partição ou Líquido-Líquido. A separação entre os analitos será em função do coeficiente de partição do analito entre as duas fases líquidas, sendo que uma se encontra imobilizada<sup>1</sup>.

Cromatografia por Exclusão ou Permeação em Gel ou Filtração em Gel. A separação dos analitos se dá em função de seus volumes moleculares solvatados que são “filtrados” ou “peneirados” em colunas que possuem poros precisamente controlados em seu empacotamento<sup>1</sup>.

Cromatografia por Troca Iônica. A separação dos analitos se baseia na troca seletiva dos íons da amostra em sítios aniônicos ou catiônicos da fase estacionária, que consiste,

geralmente, de um material polimérico ou sílica, contendo grupamentos funcionais com carga elétrica<sup>1</sup>.

**Cromatografia por Afinidade.** A separação dos analitos é devido ao fato que a fase estacionária contém reagentes bioquímicos imobilizados, acoplados com ligantes específicos que têm afinidade específica pelo analito de interesse, retendo-o, fato semelhante nas interações antígeno-anticorpo, nas interações do tipo “chave-fechadura”<sup>1</sup>.

**Cromatografia em Fase Normal.** Em princípio este método se baseia em adsorção, e depende da polaridade da fase móvel e da fase estacionária. A fase estacionária polar é composta de sílica ou de sílica ligada a grupamentos polares (por exemplo, NH<sub>2</sub> e CN), e a fase móvel apolar, sem água.

**Cromatografia em Fase Reversa.** Este tipo de cromatografia, junto com a cromatografia em fase normal, são os mais usados em CLAE, aplicados a análises de medicamentos<sup>1</sup>, há três formas para se trabalhar, conforme a estrutura da molécula, são elas:

a) Método clássico; neste tipo de cromatografia a separação se baseia em sucessivas etapas de adsorção-desorção dos analitos entre a fase móvel, que é polar (geralmente água mais solventes orgânicos) e com a fase estacionária, que é apolar formada por sílica covalentemente ligada a compostos hidrofóbicos, por exemplo contendo cadeias n-alquílicas (Si-O-C<sub>8</sub> ou Si-O-C<sub>18</sub>). Esta maneira clássica de trabalho nem sempre dá resultados satisfatórios quanto ao “System Suitability”.

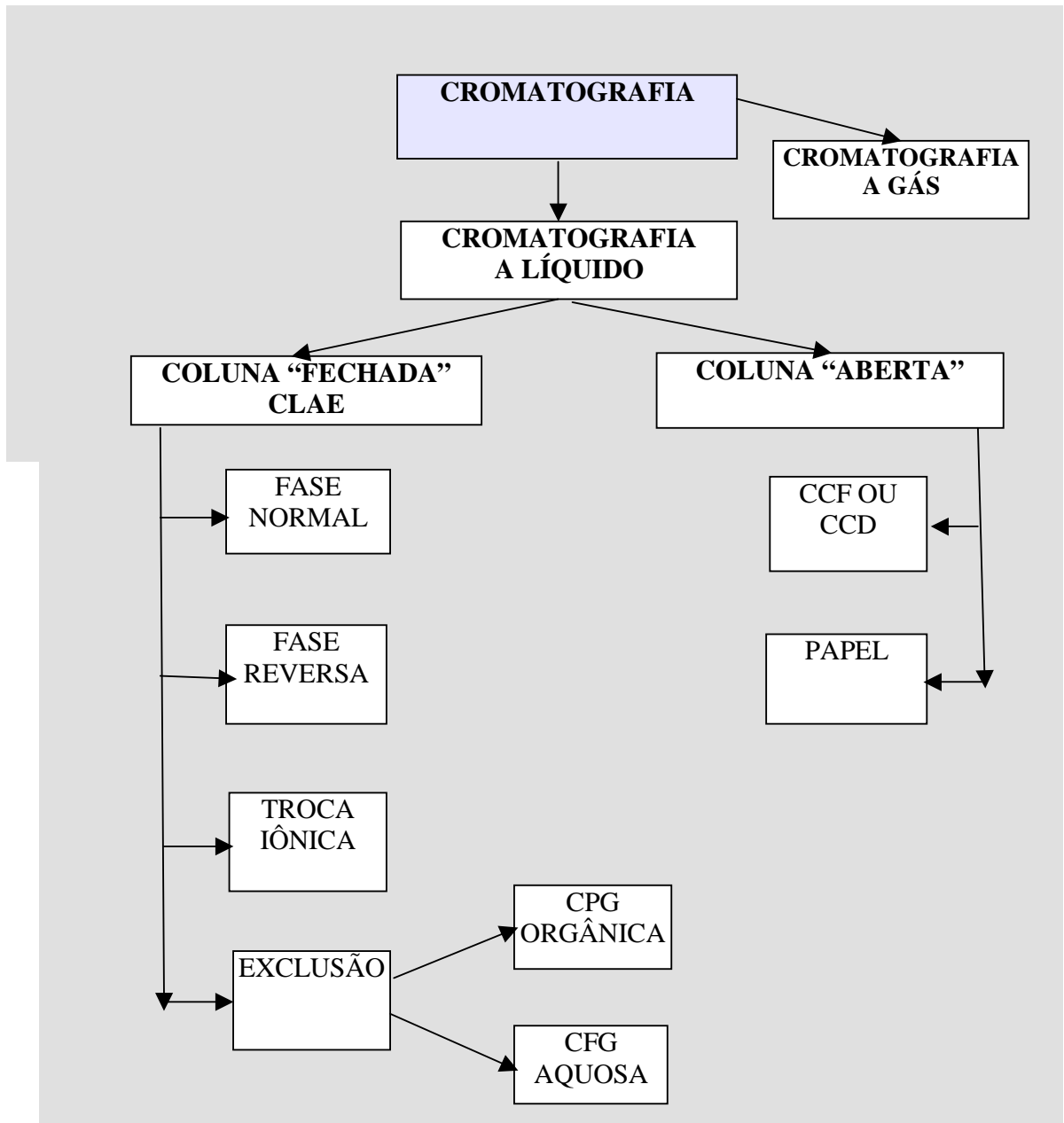
b) Cromatografia por Supressão Iônica; este tipo de cromatografia de fase reversa é aplicado na separação de compostos do tipo ácidos fracos e bases fracas. Esta separação se obtém pela redução de sua ionização em solução através do controle de pH. O objetivo é afastar o pH do pKa ou pKb. Quando os compostos forem ácidos, usa-se ácido acético ou ácido fosfórico para reprimir a ionização abaixando o pH. Quando os compostos forem bases, deverá ser usado hidróxido de amônio, trietilamina (0,1%), dibutilamina ou fosfatos alcalinos (para ajustar o pH entre 7 e 8)<sup>1</sup>.

c) Pareamento Iônico (Derivatização); este tipo de cromatografia em fase reversa se aplica à separação de compostos iônicos de ácidos fortes e bases fortes que estão completamente ionizados na faixa de pH entre 2 e 8; portanto, neste caso, a cromatografia por supressão iônica não é válida. A separação dos analitos se torna possível, pois é adicionados determinados contra-íons que formam, com os íons já existentes na solução, derivados com radical alquil que possuem mais afinidade com a fase estacionária que é por natureza apolar<sup>1</sup>.

É importante destacar novamente que para análise de medicamentos é de vital importância que o analista tenha o conhecimento químico e físico-químico das interações que



estão acontecendo nas cromatografias em fase normal e em fase reversa (as mais comumente usadas). Este conhecimento é necessário pois ao reproduzir a metodologia farmacopeica nem sempre obteremos um cromatograma adequado em termos de conformidade e adequação do cromatograma (“System Suitability”). A figura 9 mostra os tipos de cromatografias.



**Figura 9:** tipos de cromatografias<sup>3</sup>

### 3.2.2 O “System Suitability”

O “System Suitability” é um conjunto de testes aplicados a métodos cromatográficos. São usados para verificar se os sistemas cromatográficos estão adequados quanto à resolução e a reprodutibilidade. Estes testes são baseados no conceito de que equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema integral que podem ser avaliados como um todo<sup>20</sup>.

Em outras palavras o que ressalta no parágrafo anterior e o que a experiência na bancada demonstra é que não basta avaliar estas partes menores individualmente. Faz-se importante checar e se, necessário, ajustar estas partes menores que agem como um todo, pois, do contrário, poderá ser significativamente desqualificado o todo e, com isso, tornar o cromatograma inadequado para a análise. É importante, portanto, que o analista verifique a conformidade do sistema antes ou durante a análise de amostras desconhecidas e dos padrões que serão usados na identificação e quantificação destas amostras.

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados para garantir a conformidade do sistema de acordo com a US-FDA e da USP estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1:** limites dos parâmetros para o "System Suitability"<sup>18,20</sup>

Parâmetros	(US-FDA, 2000)	(USP 29, 2006)
Fator de retenção (K)	$K > 2$	$K > 2$
Nº. de pratos teóricos (N)	Em geral $N > 2000$	Em geral $N > 2000$
Resolução (Rs)	$R_s > 2$	$R_s > 2,0$
Fator de alargamento (TF)	$TF < 2$	$TF < 2$
Repetibilidade (DPR)	$DPR < 1\%$ , para $n > 5$	$DPR < 2\%$

Urge a necessidade de o analista possuir o conhecimento químico e físico-químico destes parâmetros. Somente com este domínio o analista poderá chegar a uma conformidade ideal para se trabalhar determinada amostra, aliando com isto qualidade, custo e benefício. Estes mesmos conhecimentos estão associados à Robustez do método analítico, que é um dos requisitos para validação.

A Robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica uma medida da confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da Robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas

condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento<sup>2</sup>.

A tabela 2 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método, fatores estes que devem ser considerados na avaliação da "Robustez" do método analítico.

**Tabela 2:** principais parâmetros que devem ser avaliados na determinação da "Robustez" na validação<sup>2</sup>

Preparo das Amostras	·Estabilidade das soluções analíticas ·Tempo de extração
Espectrofotometria	·Variação do pH da solução ·Temperatura ·Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	·Variação do pH da fase móvel ·Variação na composição da fase móvel ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Velocidade do gás de arraste

Para entender estes fatores que afetam a Robustez do método analítico na Cromatografia Líquida são necessários que sejam detalhados alguns conceitos químicos e físico-químicos associados aos parâmetros do "System Suitability".

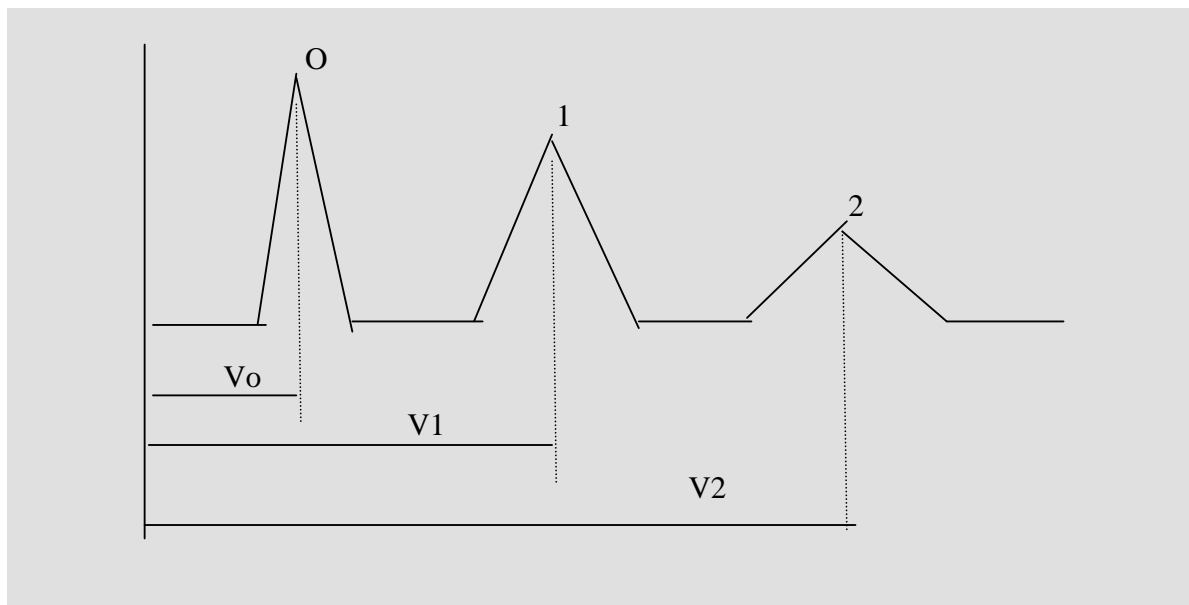
O volume referente à coluna ( $V_0$ ) é o volume compreendido entre o injetor e o detector incluindo a coluna. O  $V_0$  da coluna representa cerca de 95% do  $V_0$  total. O fato de que o  $V_0$  dos injetores, das células de fluxo e dos detectores sejam minimizados pelos fabricantes faz com que o volume de solvente contido nestas partes seja relativamente pequeno (representa cerca de 5% do  $V_0$  total). O volume referente a coluna ( $V_0$ ) poderá ser determinado experimentalmente ou calculado levando-se em conta as dimensões da coluna e o tamanho da partícula<sup>1/3</sup>. A figura 10 mostra a representação de um cromatograma e os volumes de retenção dos picos."

$$V_0 = (0,5 - 0,7) \times (\text{volume interno da coluna vazia})$$

Onde: 0,5 e 0,7 são fatores matemáticos para tamanho de partícula igual a cinco micra e dez micras respectivamente<sup>3</sup>.

$$\text{Volume interno da coluna vazia} = \pi R^2 C$$

A retenção ou fator de capacidade ( $K$ ) é uma medida de quanto tempo um componente passa imobilizado na fase estacionária comparado com o tempo que passa migrando no seio da fase móvel. A retenção ( $K$ ) indica o grau de afinidade que a coluna e a fase móvel possuem em relação ao componente<sup>1,3</sup>.



**Figura 10:** representação de um cromatograma e os volumes de retenção dos picos<sup>3</sup>

$$K_1 = (V_1 - V_0)/V_0$$

$$K_2 = (V_2 - V_0)/V_0$$

A retenção ( $K$ ) é um parâmetro que permite comparar o tempo ou volume de retenção de um componente da amostra com o tempo ou volume morto. Em outras palavras revela em quantas vezes o valor de  $V_0$  (ou  $T_0$ ) o analito elui.

Devem-se evitar valores de retenção ( $K$ ) próximos ao  $V_0$  pois a pouca interação do composto com a fase estacionária pode acarretar coeluição com um outro componente da amostra. Da mesma forma não se deve trabalhar com valores excessivamente altos de retenção (maiores de trinta vezes o  $V_0$ ) porque cresce a tendência ao alargamento dos picos.

A seletividade ou fator de separação ( $\alpha$ ) compara a retenção de um componente com a do outro componente. A seletividade indica até que grau o sistema químico (depende da natureza química da coluna e da fase móvel) está resolvendo (separando) os componentes. Indica o quanto a fase estacionária ou a fase móvel interage com uma substância comparada com outra<sup>1,3</sup>.

$$\alpha = K_2/K_1 = (V_2 - V_0)/(V_1 - V_0)$$

A eficiência (N) ou número de pratos teóricos é uma medida de quanto o sistema incluindo injetor, tubulações, conexões, coluna, fase móvel, fase estacionária e detector está diluindo a banda do componente durante a corrida cromatográfica. A eficiência (N) é uma medida do alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema<sup>1,3</sup>.

$$N = f(V_n/L)^2$$

L = Largura do sinal na metade da altura

f = Fator estatístico e igual a 5,54  $(2,35\sigma)^3$

V<sub>n</sub> = Volume de eluição do sinal

A resolução (R<sub>s</sub>) é o grau de separação entre dois picos em um determinado sistema. Este grau é afetado pela retenção (K), pela seletividade (α) e pela eficiência (N) de forma diferente conforme a equação da resolução<sup>3</sup>.

$$R_s = 1/4 ( (\alpha - 1) / \alpha ) (N^{1/2}) ( K / ( 1 + K ) )$$

Somente poderemos avaliar quando um método é mais eficiente que o outro comparando as suas resoluções (R<sub>s</sub>). É evidente que o analista deverá levar em conta o custo-benefício, ou seja, ele deverá avaliar qual o grau de resolução necessária para determinada análise, considerando que o cromatograma do produto possa ter sinais referentes a degradações ou a substâncias relacionadas sem pôr em risco os resultados analíticos .

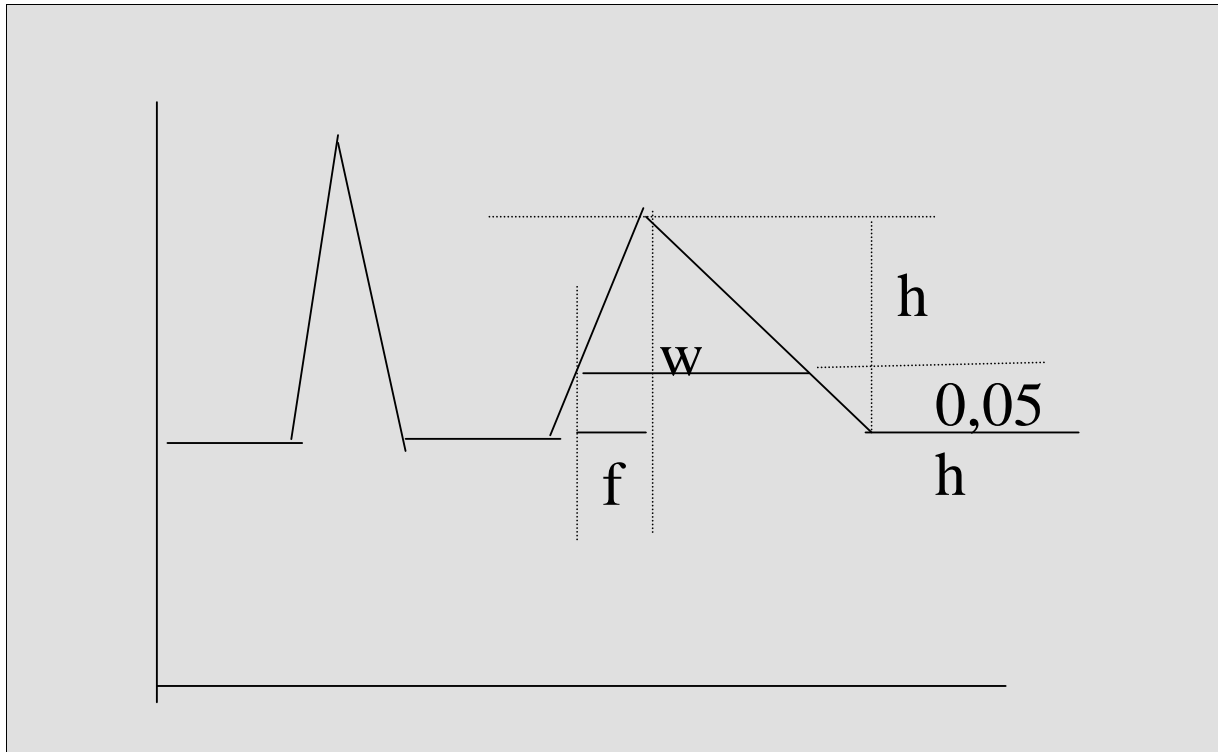
Geralmente as monografias oficiais especificam no “System Suitability” as condições mínimas a serem cumpridas; porém, são condições mínimas para determinado produto, não podendo ser generalizadas para outros que possuam outras formulações e, portanto, poderão requerer outras condições de adequação de “System Suitability”.

Outro fator importante em fase reversa é o fato de que a porcentagem de recobrimento de fase covalentemente ligada ao suporte de sílica ("densidade de carga"), pode variar muito, conforme processo de manufatura do recheio. Esta porcentagem de recobrimento afeta diretamente a retenção (K) inerente à coluna, e, junto com a área superficial do suporte, o tamanho da partícula e o diâmetro da partícula e do poro são responsáveis pela maioria das diferenças entre colunas, supostamente iguais.

É muito comum nas monografias das farmacopéias, no que concerne às condições cromatográficas, só se fazer menção à natureza química da coluna e suas dimensões. Muito raramente há alguma referência quanto ao diâmetro de partícula. Não são contemplados, em momento algum outros parâmetros importantes tais como: diâmetro de poro, densidade da fase orgânica quimicamente ligada aos grupos silanóis, principalmente em se tratando de cromatografia a líquido em fase reversa, que é a metodologia mais preconizada nas farmacopéias atuais.

Estas propriedades são os diferenciais entre “colunas de mesmo nome”, por exemplo L<sub>1</sub>, L<sub>7</sub>, L<sub>11</sub> (nomenclatura usada na “USP”). Exemplificando, a USP define como coluna L<sub>1</sub> qualquer coluna entre 3 e 10 micras, seja que marca for. Este fato obriga ao analista, que prefere seguir rigidamente a rota de análise preconizada, fazer ajustes ou, até mesmo, modificações no método visando otimizar o perfil cromatográfico quanto à resolução, seletividade, pratos teóricos, etc, o que demanda tempo e reagentes. Isso ocorre com frequência em amostra multicomponentes ou quando, além do composto principal, coexistem impurezas ou substâncias relacionadas.

Outro parâmetro importante do “System Suitability” é o fator de cauda ou “tailing factor” (TF), ele mede a simetria do sinal, geralmente os sinais não são simétricos. De fato, torna-se importante o controle da cauda porque ela compromete a qualidade do pico e conseqüentemente aumenta o desvio, após a integração das áreas correspondentes às injeções de uma mesma amostra. Para manter este controle foi preconizado, conforme a tabela 1 o valor máximo de dois para o fator de cauda. A figura 11 mostra a representação de um cromatograma contendo um sinal com cauda.



**Figura 11:** representação de um cromatograma contendo um sinal com cauda

$$TF = W_{0,05} / 2f$$

$W_{0,05}$  = Largura do sinal a cinco por cento da altura

$f$  = Distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a cinco por cento da altura.

O desvio padrão das replicatas (DPR) é o parâmetro do “System Suitability” que mede a repetitividade do método analítico entre as injeções da mesma amostra. O valor preconizado, conforme a tabela 1, é de no máximo dois por cento, porém em análises de produtos de degradação este percentual sobe geralmente para cinco por cento. Conforme especificado na monografia oficial, esta diferença se dá devido ao fato de ser bem menor a relação sinal/ruído e conseqüentemente é aceitável uma maior variabilidade no DPR.

$$DPR (\%) = 100 (s / x)$$

$s$  = desvio padrão das replicatas

$x$  = média das replicatas

Vários fatores afetam a retenção (K), a seletividade ( $\alpha$ ) e a eficiência (N) e conseqüentemente alteram a resolução do sistema; portanto, é importante que o analista tenha conhecimento suficiente para analisar um cromatograma e assim poder controlar estes parâmetros.

A retenção (K) além de ser afetada pela polaridade da fase móvel como foi visto anteriormente, também é afetada pela polaridade da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela percentagem de recobrimento da fase estacionária (já visto, “Densidade de Carga”), tamanho do poro e temperatura da coluna<sup>3</sup>.

A Seletividade ( $\alpha$ ) além de ser controlada pelas características químicas da fase móvel, também é afetada pelo pH da fase móvel e pelas características da fase estacionária<sup>3</sup>.

A eficiência (N) é controlada pelos seguintes parâmetros: tamanho médio das partículas da fase estacionária e pela forma destas partículas (esférica ou irregular), uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, carga (massa) de amostra injetada, tempo de retenção do pico usado para o cálculo de N, fórmula usada para o cálculo de N, comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extra-coluna (como conexões, tubulações, célula, injetor e etc.)<sup>3</sup>.

### **3.2.3 Equipamentos e insumos**

Todos os equipamentos e insumos usados pertencem as salas 113, 114 e 115 do Setor de Medicamentos do Departamento de Química do INCQS na Fiocruz.

#### **3.2.3.1 Maleato de enalapril**

Cromatógrafo líquido n°. 3, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível com arranjos de diodos (DAD), patrimônio n°. 30-07-00081

Coluna C 08, fabricante Merck, dimensões de (4,6 x 250) mm e cinco micra.

Fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), acetonitrila grau "HPLC" e água deionizada grau 0,22 micra.

Substância Química de Referência Maleato de Enalapril da USP



### 3.2.3.2 Rifampicina com isoniazida

Cromatógrafo líquido nº. 3, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível com arranjos de diodos (DAD), patrimônio nº 30-07-00081.

Cromatógrafo líquido nº. 6, fabricante Waters com detector ultravioleta-visível óptico, patrimônio nº. 30-07-00133.

Coluna C 18, fabricante Merck, dimensões de (4,6 x 250) mm e 5 micra e base desativada. Fosfato de sódio dibásico (pH 6,8), acetonitrila grau HPLC, metanol grau "HPLC" e água deionizada grau 0,22 micra.

Substância Química de Referência Rifampicina da USP e Substância Química de Referência Isoniazida da USP.

### 3.2.3.3 Ácido acetilsalicílico

Cromatógrafo líquido nº. 3, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível com arranjos de diodos (DAD), patrimônio nº. 30-07-00081.

Cromatógrafo líquido nº. 6, fabricante Waters com detector ultravioleta-visível óptico, patrimônio nº. 30-07-00133.

Coluna C 18, fabricante Merck, dimensões de (4,6 x 250) mm e 5 micra e base desativada.

Coluna C 18, Waters, novapack TM , dimensões de (3,9 x 150)mm e 4 micra e base desativada. Heptanosulfonato de sódio, ácido fórmico, acetonitrila grau "HPLC", metanol grau "HPLC" ácido trifluoroacético (ATF) e água deionizada grau 0,22 micra.

Substância Química de Referência Ácido Acetilsalicílico da USP e Substância Química de Referência Ácido Salicílico da USP.

## 3.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto,

deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequada à análise<sup>2</sup>.

No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou compêndios oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado nas tabelas 3 e 4<sup>2</sup>.

**Tabela 3:** classificação dos testes, segundo sua finalidade<sup>2</sup>

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

**Tabela 4:** parâmetros necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade<sup>2</sup>

Parâmetro	Catego- ria I	Categoria II		Catego- ria III	Catego- ria IV
		Quantitati- vo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	-	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	-	Não
Intervalo	Sim	Sim	-	-	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim
	Intermediária	-	-	Não	-
Limite de detecção	Não	Não	Sim	-	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	-	Não
Exatidão	Sim	Sim	-	-	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

A metodologia analítica deverá ser revalidada quando houver mudanças na síntese da substância ativa; quando houver mudanças na composição do produto acabado ou, então, quando houver mudanças no procedimento analítico<sup>2</sup>.

A Especificidade e Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz<sup>2</sup>.

A Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado<sup>2</sup>.

O Intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método como mostra a tabela 5. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado<sup>2</sup>.

**Tabela 5:** limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos<sup>2</sup>

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados. A quantificação e detecção devem ser adequadas às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir $-20\%$ sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

A Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: a Repetitividade (precisão intracorrida) que é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; a Precisão intermediária (precisão intercorridas) que é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, e/ou com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes e a Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) que é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente

aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias<sup>2</sup>.

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável<sup>2</sup>.

Limite de Quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções, contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis<sup>2</sup>.

A Exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis<sup>2</sup>.

A Robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal<sup>2</sup>. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da Robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. A tabela 2, vista no item **III. 2.2**, mostra os principais parâmetros que devem ser considerados na determinação da Robustez na validação, segundo a Anvisa<sup>2</sup>.

### **3.4 PORQUE CALCULAR A INCERTEZA**

A Incerteza na Medição Analítica é um requisito fundamental na confiabilidade metrológica de um laboratório. A qualidade de um laboratório está relacionada ao prazo, ao custo e à qualidade científica. A qualidade científica, dentre outros fatores é pautada na necessidade de medições e, portanto, perguntas tais como: qual a grandeza e qual a incerteza devem ser dimensionadas.

Devemos calcular a incerteza porque os resultados analíticos não são perfeitos; através deste cálculo se conhece melhor o processo analítico e, portanto, é assegurada a comparabilidade de resultados; possibilita, também, a tomada de decisão (aceitabilidade por um Cliente ou um Órgão Fiscalizador) e uma das grandes vantagens para o laboratório é a melhor adaptação do custo analítico à necessidade. Depois de efetuado a validação do método quanto aos parâmetros descritos no capítulo anterior (3.2.3), devemos determinar a especificação do mensurando, identificar as fontes de incerteza, quantificação dos componentes, calcular a incerteza combinada, calcular a incerteza expandida e analisar as contribuições.

As principais referências para o Cálculo de Incertezas são o GUM - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (Guia para a Expressão da Incerteza de Medição) e o Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (Eurachem / CITAC).

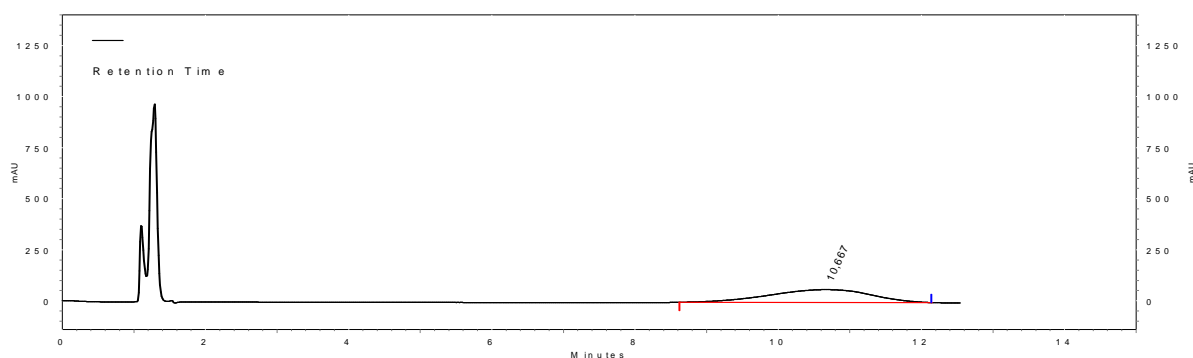
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 O MALEATO DE ENALAPRIL

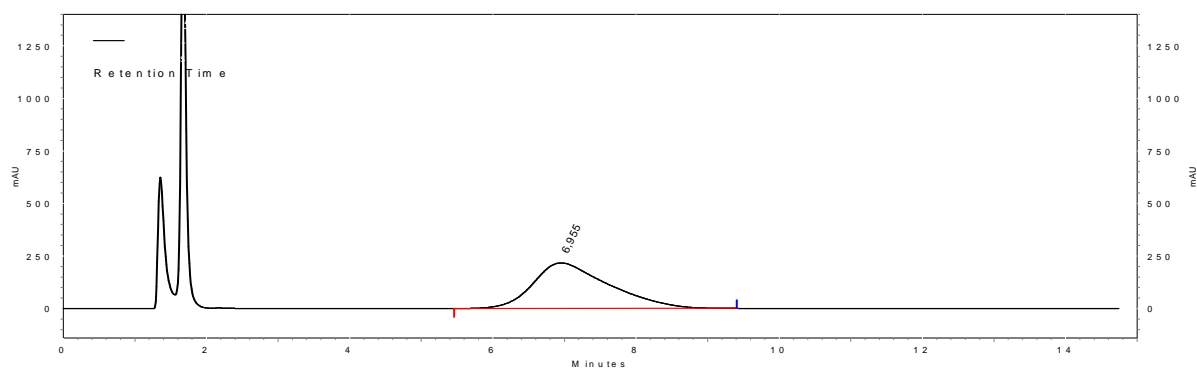
Esta análise evidencia a necessidade de ajustes na proporção dos componentes da fase móvel, de modo a acertar o formato do pico principal. A melhora no formato do pico se consegue ao diminuir a retenção (K) do pico.

#### 5.1.1 Ajustes na fase movel

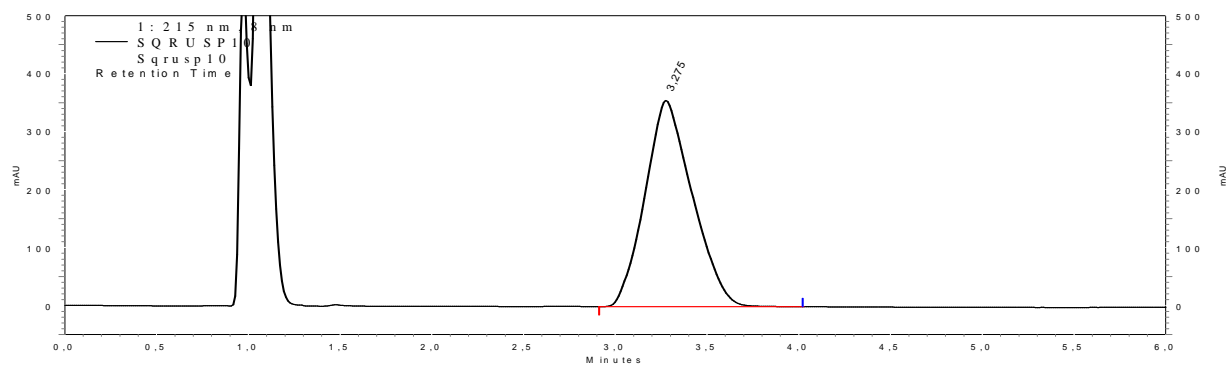
Na metodologia descrita na USP 28 para o maleato de enalapril comprimido (anexo 1), a fase móvel especificada é tampão fosfato pH 2,2 e acetonitrila na proporção (75:25), porém, conforme pode ser visto no cromatograma da figura 1 da SQR USP de maleato de enalapril, a qualidade (formato) do pico está comprometida. Com o objetivo de melhorar estes parâmetros foram feitos sucessivos ajustes na proporção dos componentes da fase móvel (figuras 12 e 13), obtendo-se um cromatograma apreciável para esta análise.



**Figura 12:** cromatograma da SQR USP Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1): diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (75:25), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

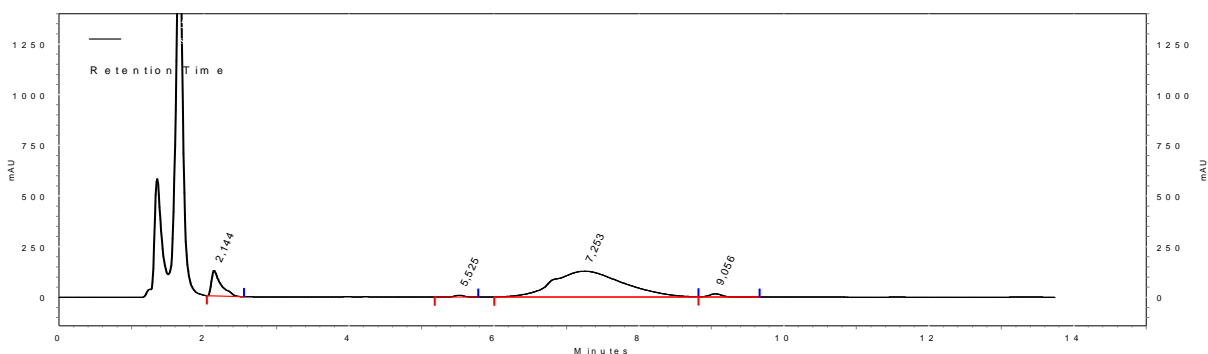


**Figura 13:** cromatograma da SQR USP Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1) com o primeiro ajuste na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (65:35), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

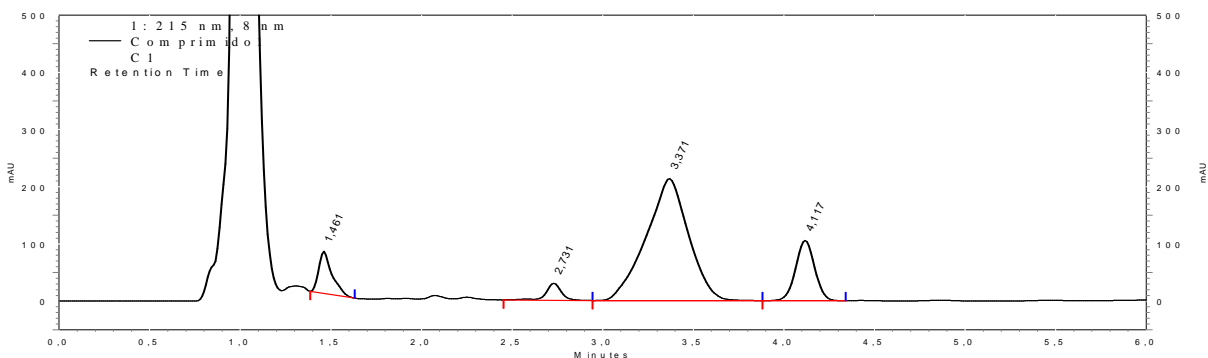


**Figura 14:** cromatograma da SQR USP Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1) com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel (ajuste final): diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Depois de feito o devido ajuste na fase móvel e chegar-se à proporção de trabalho para a SQR, foram realizadas injeções da amostra utilizando as fases móveis correspondente aos cromatogramas das figuras 13 e 14 para verificar se, de fato, o sistema está respondendo adequadamente, pois, na amostra, o princípio ativo pode não está isolado (junto a ele podem estar o Enalaprilat e o Enalapril diketopiperazina, que são produtos de degradações citados na monografia oficial e que podem aparecer também). Os cromatogramas das figuras 15 e 16 evidenciam a melhora no perfil no cromatograma da amostra.



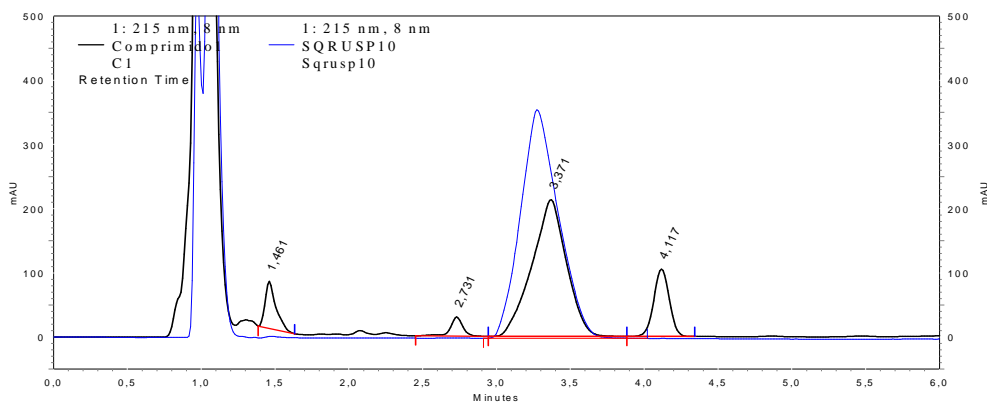
**Figura 15:** cromatograma da amostra de Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1) e com o primeiro ajuste na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (65:35), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros



**Figura 16:** cromatograma da amostra de Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1) e com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel (ajuste final): diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

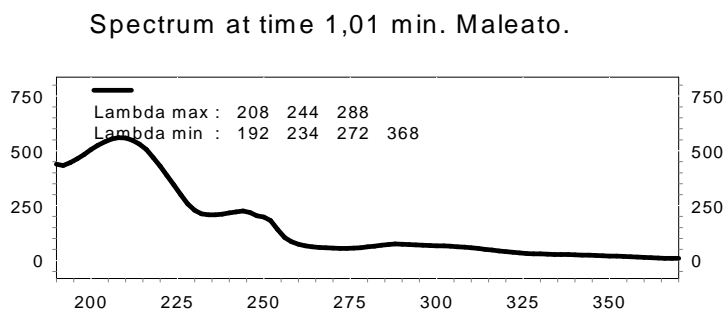
A figura 17 mostra em modo de sobreposição o cromatograma da amostra e da SQR e pode se observar a presença de outros picos extras na amostra. Através destes cromatogramas é possível verificar que as condições foram às adequadas.





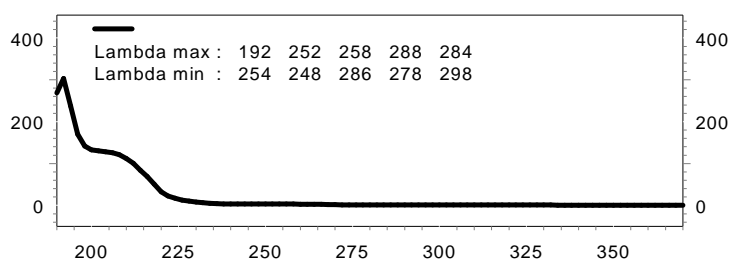
**Figura 17:** cromatograma da amostra fiscal em modo de sobreposição com o cromatograma da SQR Maleato de Enalapril em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1) e com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel (ajuste final): diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Com o objetivo de se pesquisar os picos extras diferentes no cromatograma da amostra (figura 16) em relação ao cromatograma da SQR, foram obtidos os respectivos espectros de absorção molecular na região ultravioleta destes picos, utilizando o detector UV/VIS com DAD, o tempo de retenção e seus respectivos espectros na região do UV são mostrados nas figuras 18 a 22.



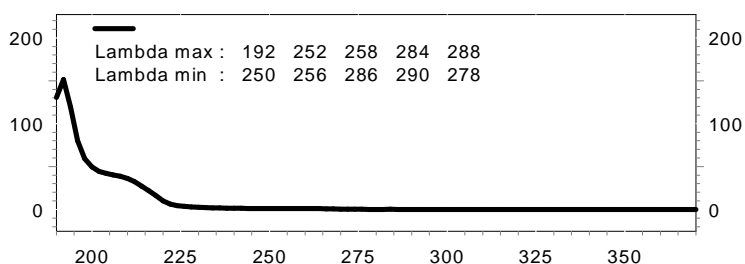
**Figura 18:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,01 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 1,47 min. Estranho 1.



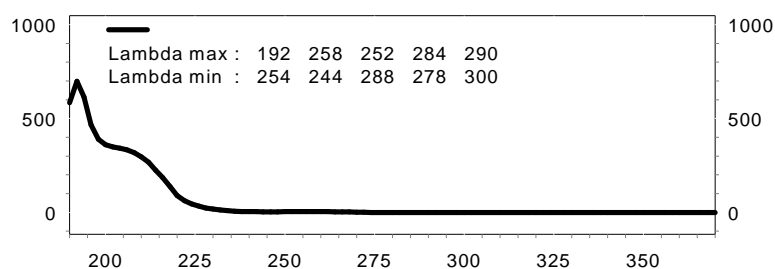
**Figura 19:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,47 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 2,75 min. Estranho 2.



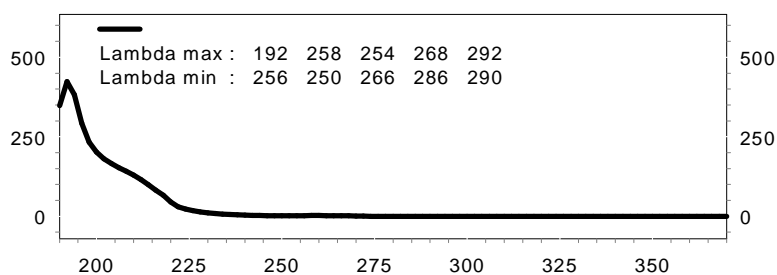
**Figura 20:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 2,75 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 3,37 min. Enalapril.



**Figura 21:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 3,37 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

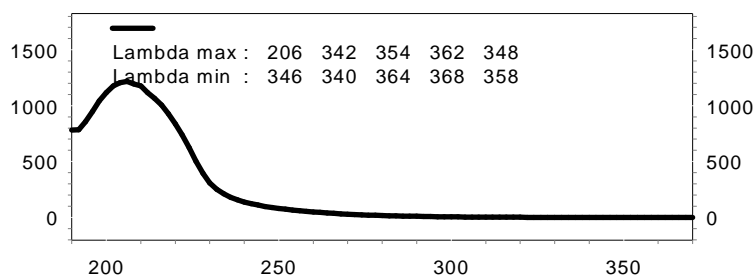
Spectrum at time 4,10 min. Estranho 3.



**Figura 22:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 4,10 minutos no cromatograma obtido da amostra de Maleato de Enalapril (figura 16) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

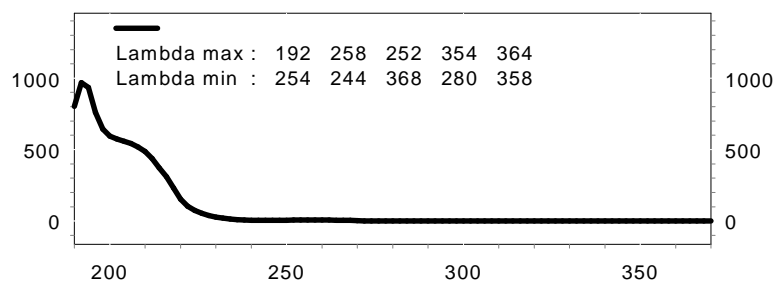
Foram obtidos os respectivos espectros de absorção molecular na região ultravioleta no cromatograma da SQR USP (figura 14), utilizando o mesmo detector (espectros das figuras 23 e 24).

Spectrum at time 1,09 min. Maleato



**Figura 23:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,09 minutos no cromatograma obtido da SQR Maleato de Enalapril (figura 14) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 3,27 min. Enalapril.



**Figura 24:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 3,27 minutos no cromatograma obtido da SQR Maleato de Enalapril (figura 14) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Comparando os respectivos espectros obtidos na amostra (figuras 18 a 22) com os obtidos na SQR USP (figuras 23 e 24), podemos constatar que, de fato, o pico referente ao princípio ativo enalapril elui em 3,37 minutos, em ambos os casos.

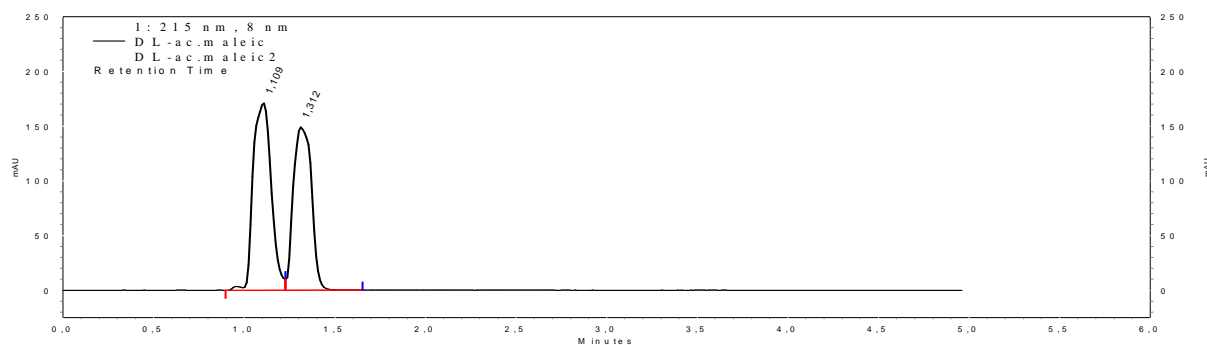
Foram observados, também, que os outros picos obtidos em 1,47 minutos, 2,75 minutos e 4,10 minutos, cujos espectros são semelhantes ao do enalapril, muito provavelmente podem ser produtos de degradação que, na época que esta análise foi feita, não foram

identificados, pois não se possuía os produtos de degradação. Estes são segundo a USP 28; o Enalaprilat e o Enalapril diketopiperazina.

O teor de maleato de enalapril encontrado nesta amostra foi de 74,0%. Este teor ficou abaixo do especificado (mínimo de 90,0 %), o que pode ser explicado, muito provavelmente, pela presença dos picos extras identificados como produto de degradação, partindo-se da hipótese de que o medicamento contenha 100,0% do declarado pelo fabricante de maleato de enalapril.

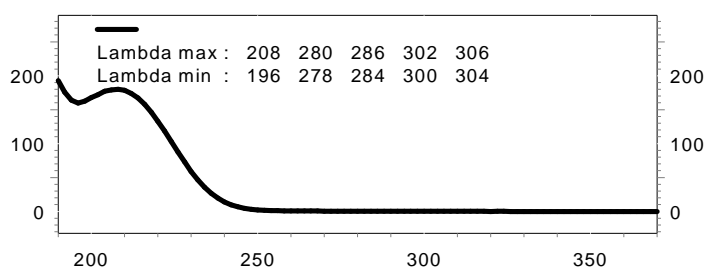
Para identificar o primeiro pico obtido de tempo de retenção de aproximadamente 1,01 minutos no cromatograma da SQR USP (figura 14), foi injetado o reagente ácido maleico (figura 25), este ácido possui duas ionizações, sendo  $pK_{a1}$  1,83 e  $pK_{a2}$  6,10. Através dos espectros obtidos (figuras 26 e 27), verifica-se que o espectro do pico de tempo de retenção 1,09 e 1,31 minutos são similares ao encontrado tanto na SQR USP como na amostra, indicando que este pico trata-se do ácido maleico, contido na fórmula como princípio ativo maleato de enalapril. Devido ao fato de o pH da fase móvel (pH 2,2) ser muito próximo ao  $pK_{a1}$  ( $pK_{a1}$  1,83), coexistem duas espécies em solução, uma não ionizada e a outra proveniente da primeira ionização, consequentemente obtém-se dois picos.

### Ácido Maleico



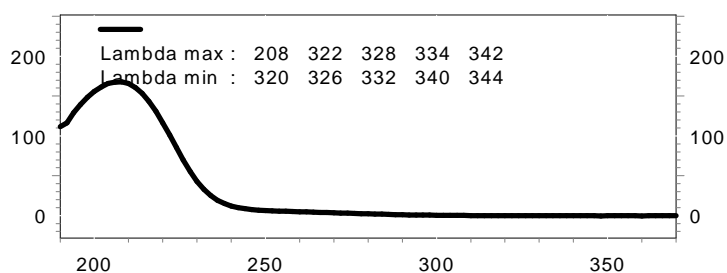
**Figura 25:** cromatograma do reagente ácido maleico em condições preconizadas na USP 28 (anexo 1) e com o segundo ajuste na polaridade da fase móvel (ajuste final): diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 1,09 min.



**Figura 26:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,09 minutos no cromatograma obtido do reagente ácido maleico (figura 25) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 1,31 min.



**Figura 27:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 1,31 minutos no cromatograma obtido do reagente ácido maleico (figura 25) em condições com ajustes na polaridade da fase móvel: diluente tampão tampão fosfato de sódio monobásico (pH 2,2), fase móvel composta de tampão fosfato de sódio monobásico pH 2,2 e acetonitrila (50:50), concentração igual à 0,2000 mg/mL, coluna C 8 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 50 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 215 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

## **5.2 RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**

A análise de rifampicina com isoniazida ratifica a atenção que o analista deve ter ao solubilizar o seu padrão e a sua amostra no diluente especificado na monografia oficial (anexo 2), antes de dar prosseguimento na análise do produto.

Algumas indagações devem ser consideradas. A solubilidade deste analito neste diluente é boa? As metodologias preconizadas na USP 28, apesar de não detalharem o modo de preparo do padrão e da amostra, sempre fornecem a concentração final destas diluições. Será que ela está adequada, considerando diferentes formulações em diversos produtos. No caso de concentrações altas de princípio ativo pode ser necessário grande volume de diluente na primeira diluição, principalmente se o diluente não for ideal para solubilizar.

Esta análise nos faz refletir também sobre a obrigatoriedade do uso de metodologia preconizada na Farmacopéia Brasileira, mesmo que exista em outra Farmacopéia uma metodologia mais atual e com maior relevância científica, que, conseqüentemente, acarretará em um menor Risco Sanitário para a sociedade. Neste caso, a metodologia da Farmacopéia Brasileira para produtos que contém rifampicina indica a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, usando 475nm como comprimento de onda. A espectrofotometria não é uma técnica de separação, como é a cromatografia a líquido. Portanto, se houver produtos de degradação ou interferentes na amostra, estes acarretarão incrementos na absorbância do princípio ativo a ser quantificado naquele comprimento de onda. Por isso a metodologia usada no ensaio de teor seguiu a USP 28, que emprega a cromatografia a líquido como será visto adiante.

### **5.2.1 Ajustes no modo de solubilização**

A metodologia preconizada na USP 28 (anexo 2) para determinar o teor de rifampicina com isoniazida em cápsulas estabelece que, para diluir os padrões usa-se o diluente formado de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e metanol (na proporção de 96:4), e na amostra deve ser usado, somente, tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8.

Apesar de todas as metodologias proposta nas farmacopéias serem validadas, tratar padrão e amostra de diferentes modos quanto à dissolução é incomum na prática. Este fato, aliado ao conhecimento que a rifampicina é pouco solúvel em meio aquoso e que a mesma

encontra-se em uma concentração alta no produto, fez com que fosse necessários realizar testes preliminares antes de começar a análise.

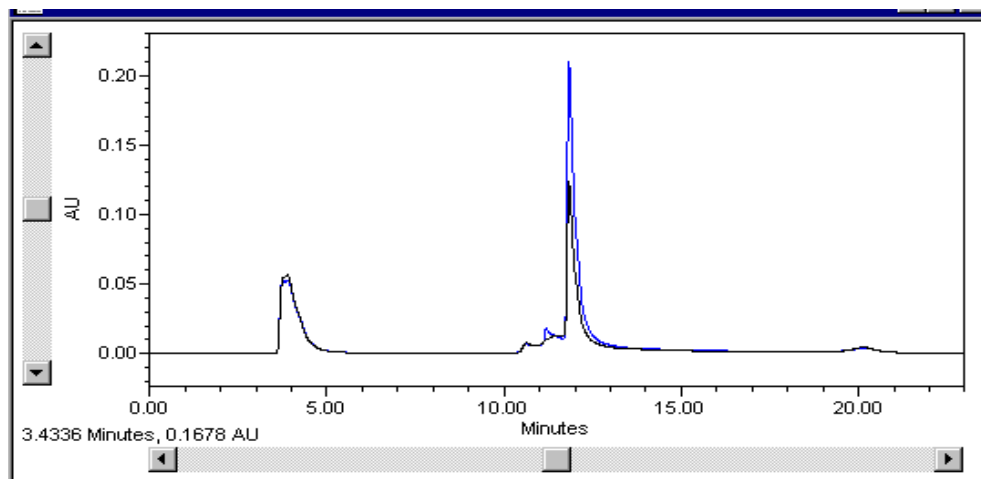
O primeiro teste foi colocar uma massa de um pool (dos comprimidos) referente a 10 mg de isoniazida e 15 mg de rifampicina em balão volumétrico de 100,0 mL, adicionar 70 mL de tampão fosfato de sódio dibásico (pH 6,8), o balão foi submetido ao ultra-som por 10 minutos. Após este tempo foi observada uma grande quantidade de sólido frente à massa nominal do comprimido no fundo do balão, sugerindo, possivelmente solubilização incompleta ou deficiente.

Em seguida foi realizado testes com os padrões. Foram pesados 15,30 mg de rifampicina e 10,10 mg de isoniazida para um balão volumétrico de 10,0 mL. Completando-se o volume com um diluente constituído de tampão fosfato de sódio dibásico (pH 6,8) e metanol (na proporção de 96:4). A seguir, submeteu-se o balão volumétrico ao ultra-som por 15 minutos. Após este procedimento foi observado que a massa também não havia completamente solubilizado, mesmo assim, o balão volumétrico foi aferido com diluente, homogeneizado e filtrado com auxílio de membrana 0,22 micra e transferido para frasco de um mililitro. Foram injetados 20 microlitros no cromatógrafo.

Em um segundo modo de solubilizar foram pesadas às mesmas quantidades de padrões e foram transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL e adicionados 0,4 mL de metanol. O balão foi submetido ao ultra-som por 10 minutos. Após este tempo completou-se o volume com a solução tampão fosfato e, após homogeneização obteve-se dissolução completa. A seguir um volume da solução foi filtrado com auxílio de membrana 0,22 micra e transferido para frasco de um mililitro. Foram injetados 20 microlitros no cromatógrafo usando auto injetor.

A figura 28 mostra a sobreposição dos cromatogramas referentes aos dois modos de solubilização dos padrões. Pode ser observado que não houve diferença significativa de intensidade do sinal no que concerne à isoniazida (tempo de retenção aproximadamente 3,9 minutos), no entanto o mesmo não se pode afirmar para a rifampicina (tempo de retenção aproximadamente 11,7 minutos).

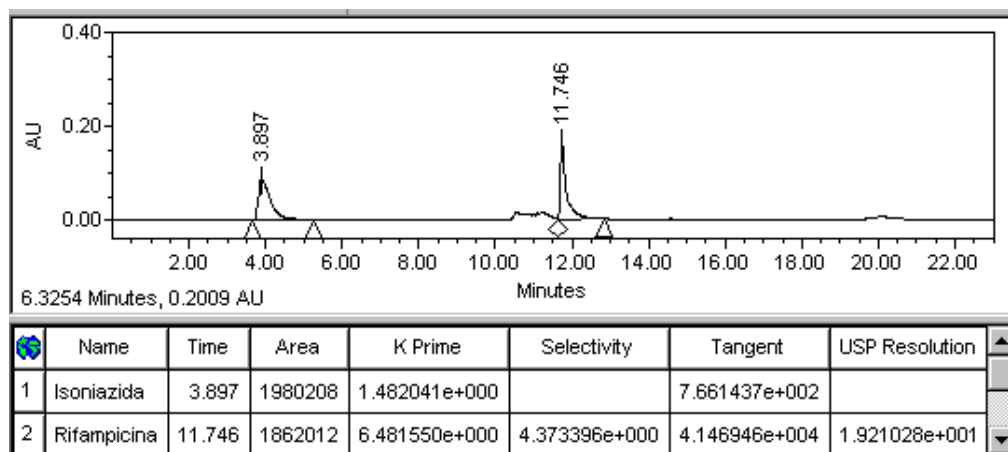




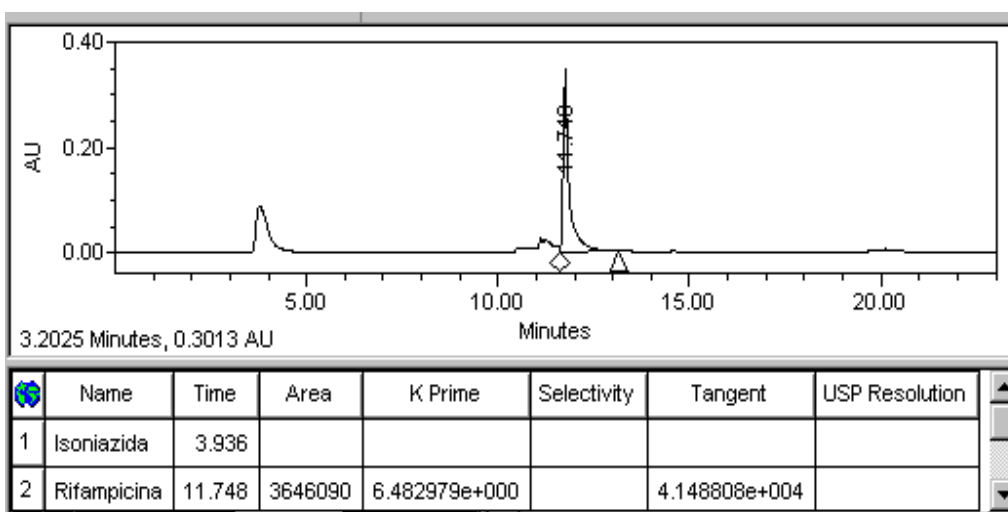
**Figura 28:** cromatogramas em modo de sobreposição obtidos conforme o primeiro modo e o segundo modo de solubilização das SQR USP Isoniazida e Rifampicina em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1010 mg/mL de isoniazida e 0,1530 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

A amostra foi tratada da mesma forma que a mistura dos padrões. As figuras 29 e 30 mostram respectivamente os cromatogramas da amostra proveniente do primeiro modo e segundo modo referente ao procedimentos de solubilização. A figura 31 mostra a superposição dos cromatogramas da amostra de acordo com ambos os procedimentos de solubilização (primeiro modo e segundo modo).

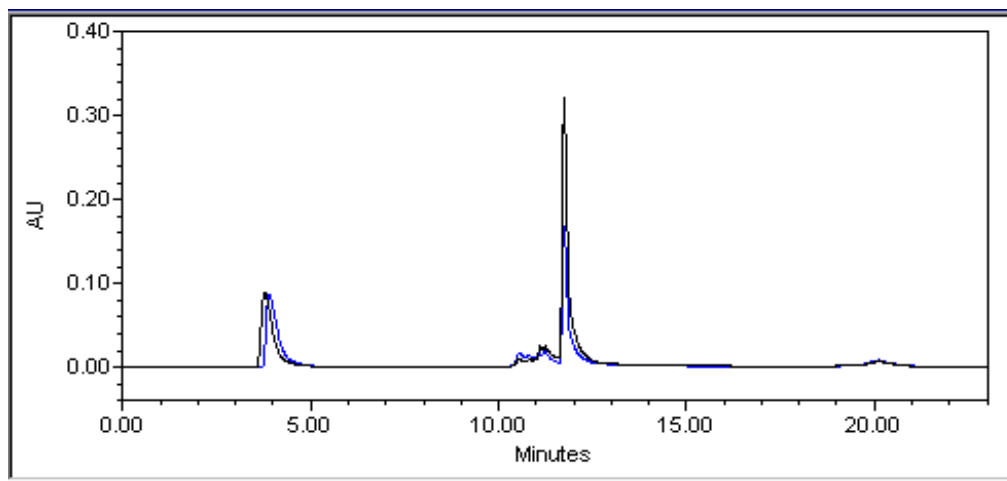
A diferença de 51% entre as áreas dos picos de rifampicina sugere a ineficiência de solubilização seguindo o primeiro procedimento em comparação com o segundo procedimento (dissolução prévia em metanol).



**Figura 29:** cromatograma da amostra obtido conforme o primeiro modo de solubilização em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros



**Figura 30:** cromatograma da amostra obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

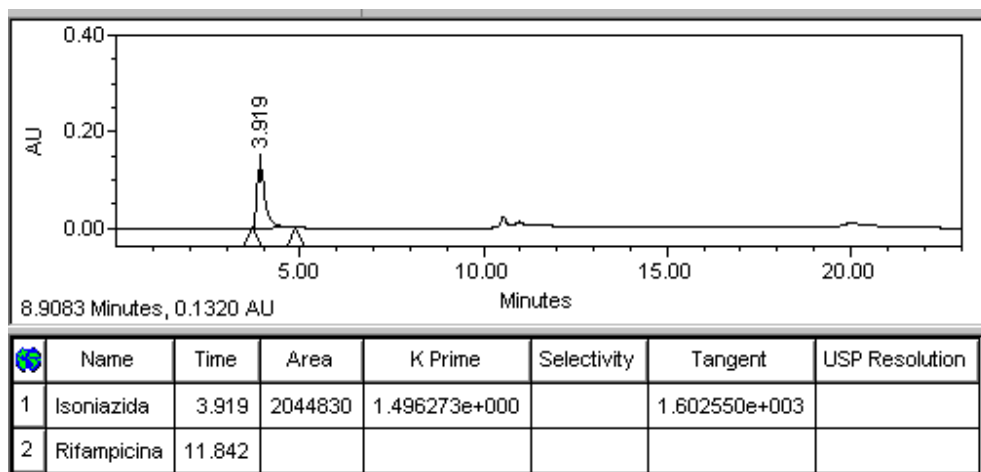


**Figura 31:** cromatogramas em superposição da amostra obtido conforme o primeiro e o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

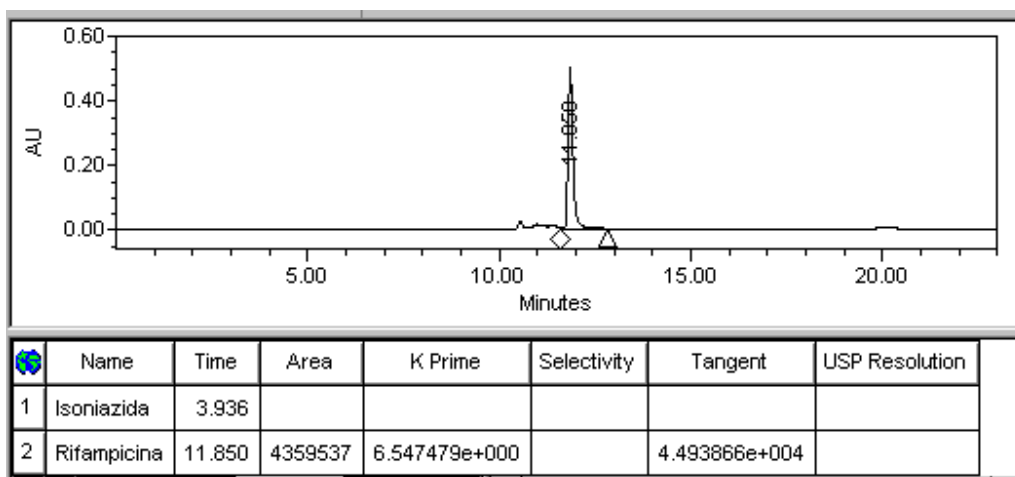
Trata-se de um bom procedimento sempre dissolver os padrões antes da amostra (que contém excipientes) porque a avaliação criteriosa da facilidade com que se dissolvem as substâncias puras em algum tipo de solvente ou mistura de solventes, sob determinadas condições (ultra-som, agitação mecânica, etc...) é fundamental para se evitar erros grosseiros na análise quantitativa por métodos cromatográficos.

### 5.2.2 Ensaio de teor

Após a definição do procedimento de solubilização (segundo modo de solubilização, dissolução prévia em metanol), foi feito o ensaio de teor para os princípios ativos desta amostra. As figuras 32 e 33 mostra os cromatogramas para SQR USP Isoniazida e Rifampicina, respectivamente.

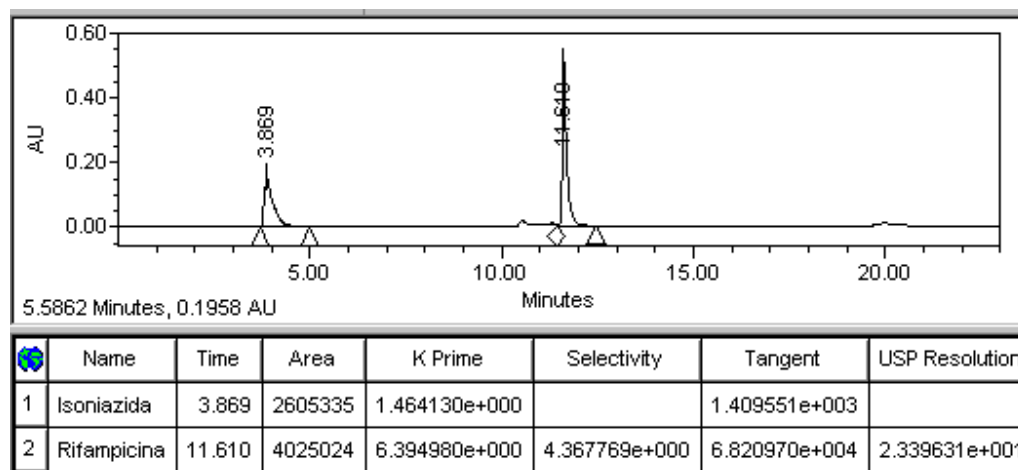


**Figura 32:** cromatograma da SQR Isoniazida obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1203 mg/mL de isoniazida, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros



**Figura 33:** cromatograma da SQR Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1411 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

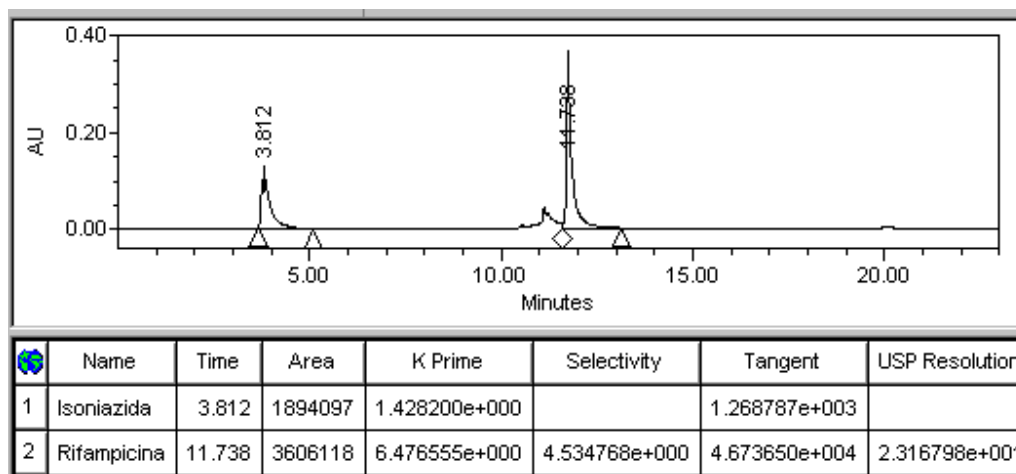
Em seguida, foram injetados 20 microlitros da solução contendo os dois padrões, com o objetivo de verificar se o cromatograma obtido satisfaria as condições de adequação do “System Suitability” preconizada na monografia. A figura 34 mostra o cromatograma desta solução e os parâmetros do “System Suitability” obtidos.



**Figura 34:** cromatograma da solução contendo a SQR Isoniazida e Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1203 mg/mL de isoniazida e 0,1411 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

A figura 34 mostra o cromatograma referente a injeção da amostra solubilizada da mesma forma que os padrões.

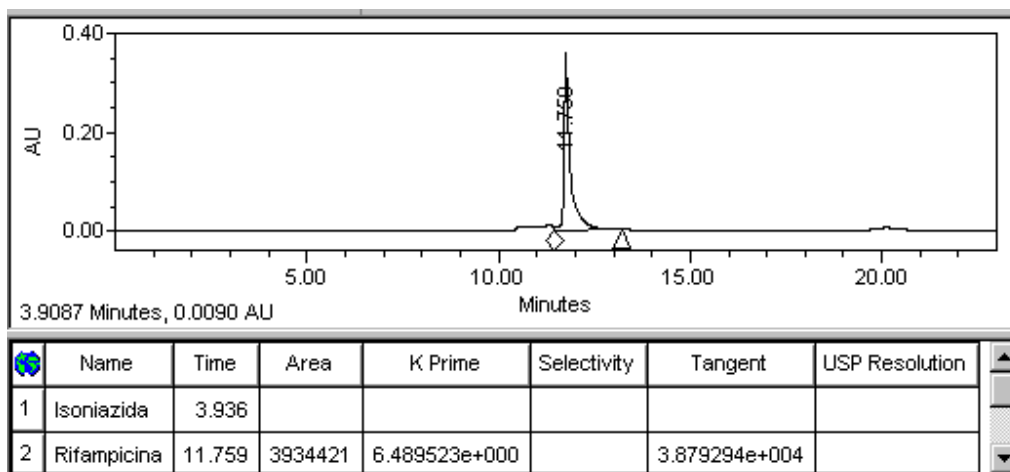
O resultado encontrado para o ensaio de teor dos princípios ativos na amostra foi de 100,0 % do declarado de isoniazida (satisfatória) e 85,3 % do declarado de rifampicina, (insatisfatória, segundo as especificações da USP 28 esta amostra não se encontra dentro dos valores limítrofes declarados pelo fabricante).



**Figura 35:** cromatograma da amostra de Isoniazida e Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Para assegurar a reprovação do produto em questão foi feito em paralelo, e, utilizando o mesmo procedimento de solubilização uma repetição da análise de um produto (só contendo rifampicina) cujo teor do princípio ativo foi obtido por outro analista. A figura 36 mostra o perfil deste re-teste.

O resultado desta nova análise para o ensaio de teor foi de 98,0 % do declarado pelo fabricante em rifampicina (indicando satisfatória). No ensaio original de teor o resultado foi de 101,0 % do declarado pelo fabricante.



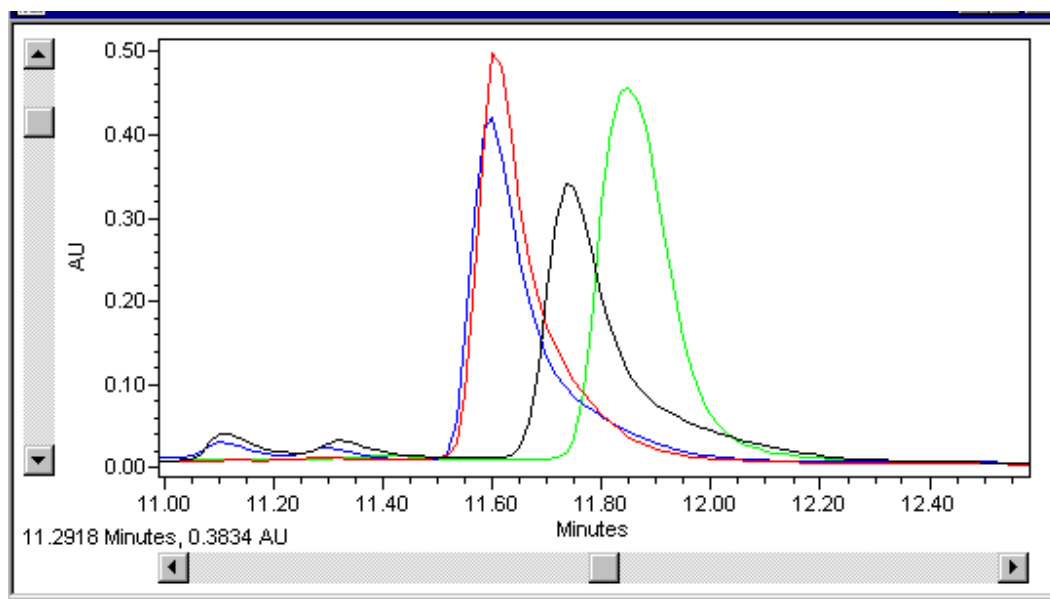
**Figura 36:** cromatograma de uma amostra re-teste de Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

### 5.2.3 Investigação do pico cromatográfico extra obtido no cromatograma da amostra

Através do cromatograma da figura 35 pode ser observada a presença de um ou mais picos extras no cromatograma da amostra de teor insatisfatório entre os tempos de retenção 11,0 minutos e 11,4 minutos.

Foi observado também que no cromatograma da figura 33, referente a SQR USP, rifampicina, também apareciam picos estranhos neste intervalo de tempo de retenção, porém de menor intensidade. Para verificar se haveria alguma correlação dos picos estranhos com o pico principal de rifampicina de tempo de retenção de 11,5 minutos, foram feitas injeções do mesmo frasco por quatro dias consecutivos, após a preparação da solução e deixando o frasco exposto à luz ambiente do laboratório.

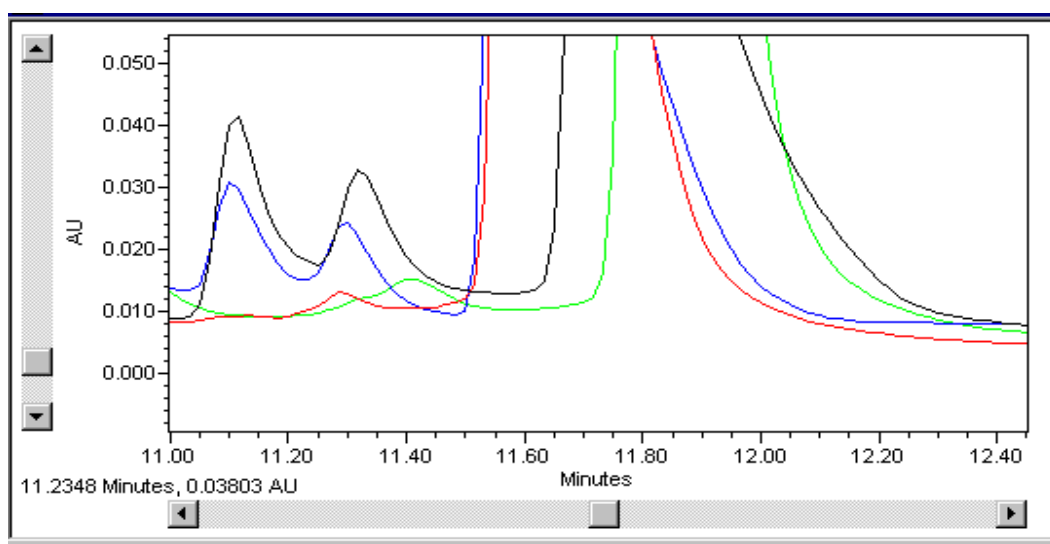
As figuras 37 e 38 mostram os cromatogramas em modo sobreposição da solução da SQR USP rifampicina, obtidos durante os quatros dias após exposição à luz. Observa-se que apesar de haver uma pequena variação em relação ao tempo de retenção do pico de rifampicina (este fato pode ser devido a defeito na bomba, pois a mesma encontrava-se com o prazo de manutenção vencido), verifica-se uma possível correlação entre o pico principal de rifampicina e os sinais estranhos. Nota-se que quanto menor o sinal de rifampicina, mais acentuados são os picos estranhos, indicando que muito provavelmente estes picos se tratam de degradação, visto que a rifampicina é fotossensível.



**Legenda:**

traço vermelho - 0 dia (30 minutos após preparação)      traço verde - 1 dia (após a preparação)  
 traço azul - 2 dias (após a preparação)                      traço preto - 3 dias (após a preparação)

**Figura 37:** cromatogramas em modo de sobreposição da SQR Rifampicina em escala normal, injeções feita do mesmo frasco em quatro dias consecutivos (0,1,2 e 3 dias) após exposição à luz ambiente, obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1411 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros



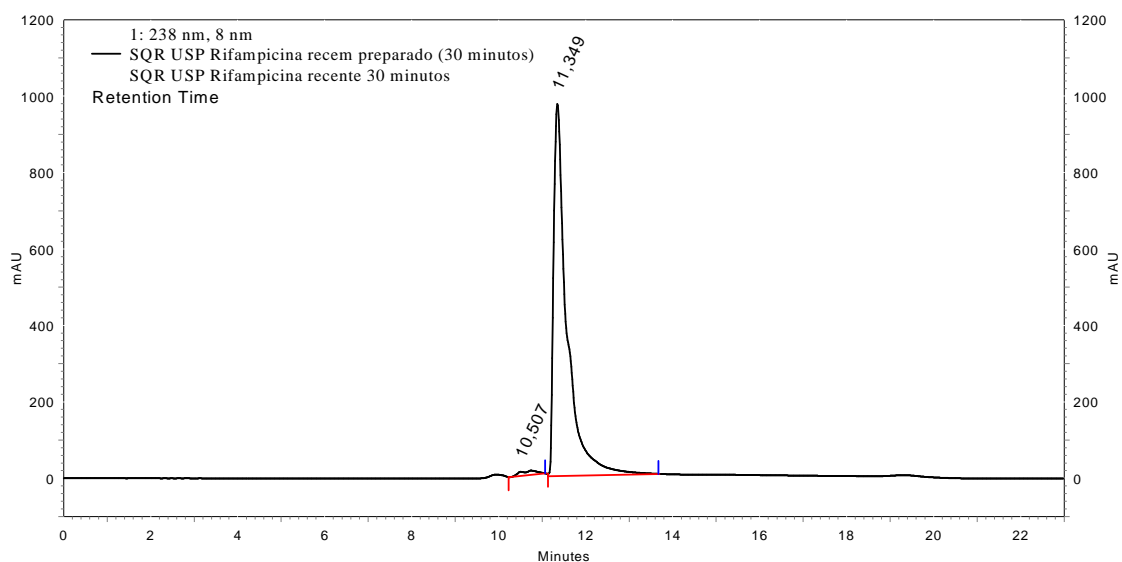
**Legenda:**

traço vermelho - 0 dia (30 minutos após preparação)      traço verde - 1 dia (após a preparação)  
 traço azul - 2 dias (após a preparação)                      traço preto - 3 dias (após a preparação)



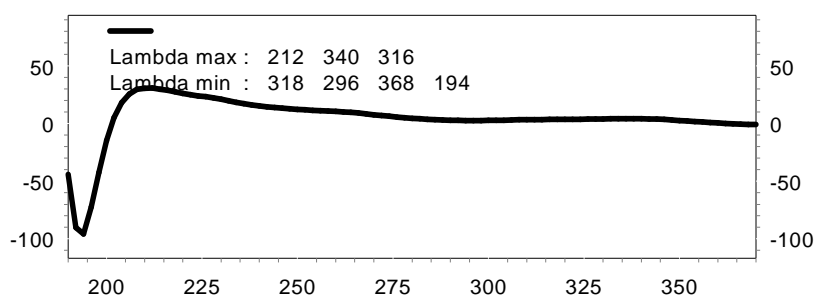
**Figura 38:** cromatogramas em modo de sobreposição da SQR Rifampicina em escala ampliada, injeções feita do mesmo frasco em quatro dias consecutivos (0,1,2 e 3 dias) após exposição à luz ambiente, obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1411 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Dando continuidade a esta investigação, preparou-se uma nova solução da SQR USP rifampicina e uma alíquota de 20 microlitros foi injetada no cromatógrafo a líquido com detector UV/VIS com DAD. A figura 39 mostra o cromatograma obtido e as figuras 40 e 41 mostra os espectros de absorção molecular na região ultravioleta (entre 190 e 370 nm).



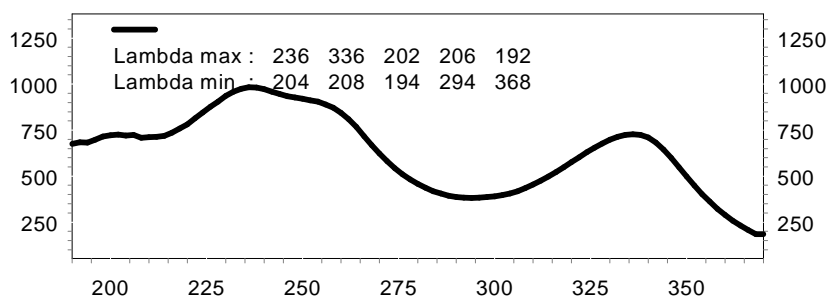
**Figura 39:** cromatograma de uma nova preparação da SQR Rifampicina obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1505 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Spectrum at time 10,53 min. Estranho.



**Figura 40:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 10,53 minutos no cromatograma da SQR Rifampicina (figura 39), obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1505 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

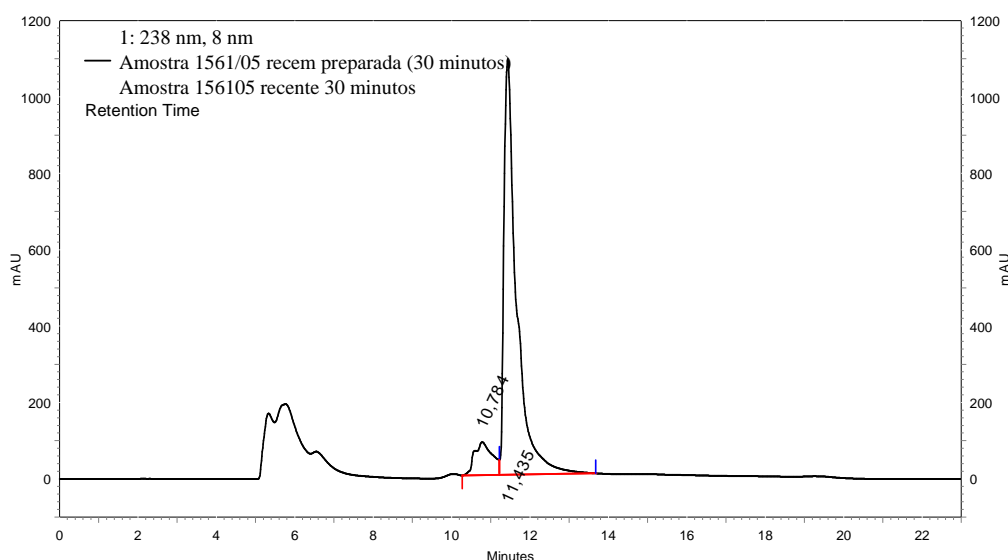
Spectrum at time 11,36 min. Rifampicina.



**Figura 41:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 11,36 minutos no cromatograma da SQR Rifampicina (figura 39), obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1505 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

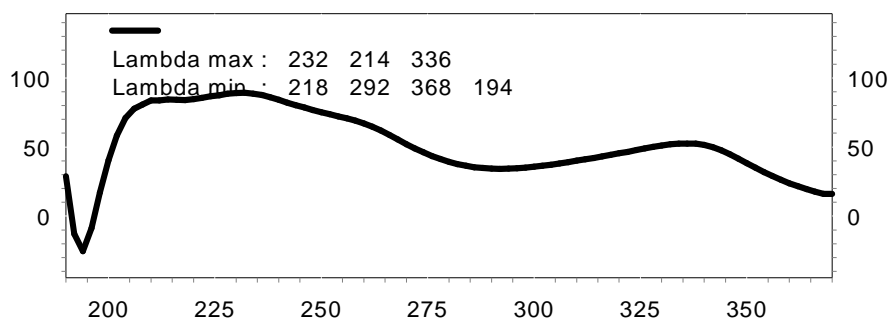
Após injeção da SQR rifampicina foi injetada uma alíquota de 20 microlitros de uma nova preparação da amostra - a figura 42 mostra o perfil do cromatograma obtido. Apesar dos picos obtidos apresentarem distorções (muito possivelmente devido as condições da coluna que já era muito usada e apresentava sinais de fadiga e pressão alterada), este fato não interferiu na obtenção do espectro na região do ultravioleta, como mostra os espectros de absorção molecular na região do ultravioleta das figuras 43 e 44.

Comparando o espectro na região do UV do pico extra obtido no cromatograma da amostra (figura 42), verifica-se uma notória semelhança com o espectro do pico obtido no mesmo tempo de retenção no cromatograma da SQR USP rifampicina (figura ). Este fato, aliado ao fato já anteriormente relatado sobre o cromatograma da figura 37 e 38 permite sugerir que este pico extra no cromatograma da amostra é uma possível fotodegradação da rifampicina e que necessita ser estudado em oportunidade futura.



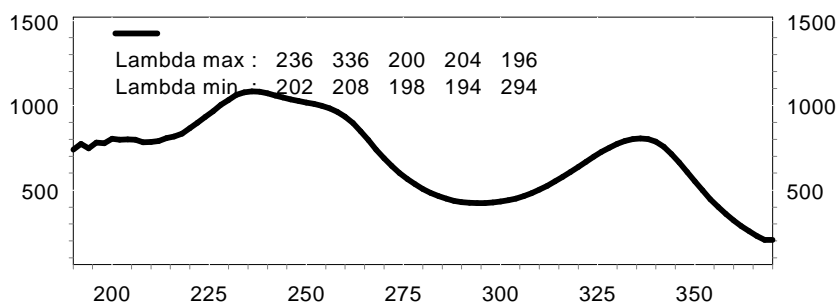
**Figura 42:** cromatograma de uma nova preparação da amostra Isoniazida e Rifampicina, obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

### Spectrum at time 10,72 min. Estranho.



**Figura 43:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 10,72 minutos no cromatograma da amostra de Isoniazida e Rifampicina (figura 42), obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

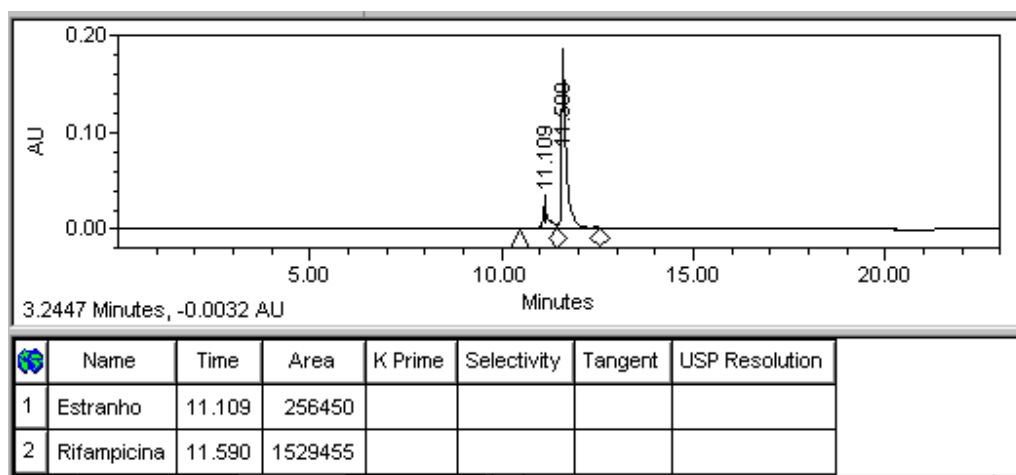
### Spectrum at time 11,46 min. Rifampicina.



**Figura 44:** espectro de absorção molecular na região ultravioleta do pico de tempo de retenção 11,46 minutos no cromatograma da amostra de Isoniazida e Rifampicina (figura 42), obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 238 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Conforme citado anteriormente, a metodologia preconizada na Farmacopéia Brasileira visando a análise de rifampicina utiliza a espectrofotometria de absorção molecular na região do UV/VIS (comprimento de onda igual a 475 nm). Segundo o cromatograma da figura 45

pode se observar que a amostra apresenta também pico estranho no comprimento de onda 475 nm (fixado no DAD), e a área deste pico em relação à área do pico referente a rifampicina representa 16,7%.



**Figura 45:** cromatograma de uma nova preparação da amostra Isoniazida e Rifampicina, fixando o comprimento de onda em 475 nm, obtido conforme o segundo modo de solubilização (dissolução prévia em metanol) em condições preconizadas na USP 28 (anexo 2): fase móvel composta de tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila (gradiente: 0 a 5 minutos (96:4), 5 a 6 minutos (45:55), 6 a 23 minutos (45:55), 23 a 25 minutos (96:4), 25 a 45 minutos (96:4)), concentração igual à 0,1000 mg/mL de isoniazida e 0,1500 mg/mL de rifampicina, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 475 nm, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 20 microlitros

Visto que as absorvâncias são aditivas, utilizando-se a metodologia espectrofotométrica descrita na Farmacopéia Brasileira haverá interferência no valor nominal de absorvância referente a rifampicina, ocasionando um erro experimental. O teor de rifampicina, determinado pela metodologia da USP 28 foi de 85,3 % do declarado pelo fabricante para a amostra.

Nos últimos três meses, o Laboratório de Medicamentos do Departamento de Química do INCQS vem reprovando vários lotes de rifampicina, que foram comprados pelo Ministério da Saúde para abastecer o programa de tratamento contra a tuberculose. Os teores encontrados em alguns lotes analisados chegam, até a 40 % de rifampicina em relação ao declarado pelo fabricante.

Após a realização de algumas perícias de contraprovas onde foi ratificado este teor de 40% de rifampicina, os fabricantes alegaram ter usado a metodologia espectrofotométrica da Farmacopéia Brasileira, a qual, por força da Lei, é a que deveria ser usada no INCQS para este fim.

Algumas considerações, quanto ao parágrafo acima, são importantes. O fato de a análise espectrofotométrica ser mais rápida e de menor custo em relação a CLAE não é, em hipótese alguma, motivo para os fabricantes se eximirem do Risco Sanitário para com os enfermos (tuberculosos).

A espectrofotometria não é uma técnica de separação como é a CLAE, portanto é papel da Vigilância Sanitária, através do Laboratório Oficial, a escolha da metodologia Oficial que minimize o Risco Sanitário para a população. Esta responsabilidade não está descrita em uma simples Resolução e sim em uma Lei maior - a Lei nº. 8.080 de 1990 que regulamenta o SUS. “Entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de serviço de interesse da saúde...”<sup>17</sup>.

Além da Lei nº.8080 de 1990, temos o Código de Defesa do Consumidor - Lei nº. 8.079, de 1990 que, entre outras determinações, busca a proteção da saúde contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O Código de Defesa do Consumidor externa o entendimento social de serem a qualidade e o risco, responsabilidades do fabricante e ou fornecedor<sup>17</sup>.

#### 4.3 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

A análise do ácido acetilsalicílico demonstra a necessidade que o Laboratório Oficial possui em desenvolver metodologias alternativas por CLAE, quando a metodologia preconizada na Farmacopéia não apresenta parâmetros referentes ao “System Suitability” (principalmente resolução) suficientemente adequados para a análise, mesmo depois de realizados possíveis ajustes.

#### 4.3.1 Reprodução da metodologia preconizada na USP 28

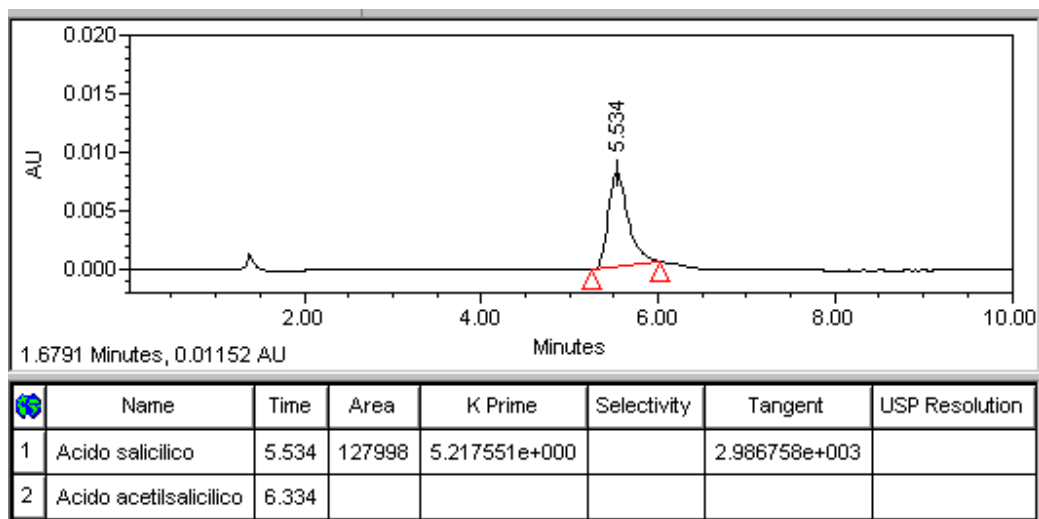
A metodologia preconizada na USP 28 para a Aspirina (anexo 3) utiliza a CLAE, onde são dosados dois ácidos, sendo o limite de 90,0 a 110,0% do declarado pelo fabricante para o ácido acetilsalicílico e teor menor que 3,0 % para ácido salicílico em comprimidos sem revestimento. Esta metodologia apresentou os parâmetros referentes ao “System Suitability” (principalmente resolução e o fator de cauda) não adequados. Este sistema cromatográfico apresentou, também, uma relação sinal/ruído muito baixa, o que não é desejável em qualquer método cromatográfico.

Apesar de terem sido feitos vários ajustes na proporção da fase móvel e de terem sido usadas várias colunas de diferentes dimensões e formato e diâmetro da partícula, não houve melhora nos parâmetros de adequação “System Suitability” empregando a metodologia da USP 28.

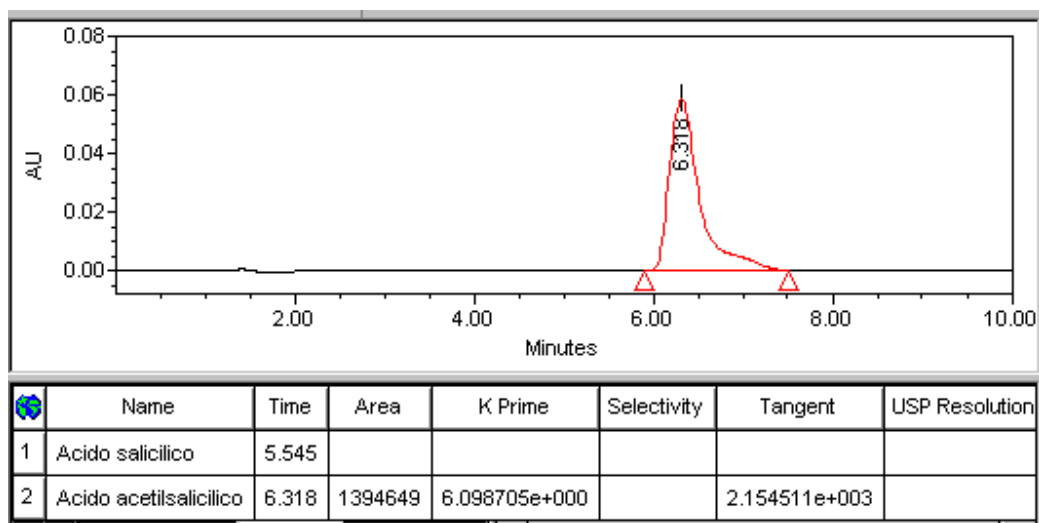
Alguns fatos causam espécie. Um deles é o uso de 1-heptanosulfonato de sódio (PIC 7) em meio ácido para derivatizar analitos do tipo ácido fraco ( $pK_a$  AAS = 3,5 e  $pK_a$  AS = 3,0). Esse tipo de derivatizante é apropriado para reagir com bases fortes que encontram-se fortemente ionizadas no intervalo operacional de pH utilizado na CLAE em fase reversa,  $2,0 < pH < 7,5$ . Além disso o pH da fase móvel deve ser tal que favoreça a ionização do analito para que a derivatização possa ter um rendimento apreciável. Neste caso tratando-se de dois ácidos fracos e o pH ácido favorece a não ionização de ambos.

Seria mais apropriado para se derivatizar os analitos desta amostra a utilização de reagentes básico do tipo sal de amônio quaternário e se manter o pH da fase móvel bem acima dos valores do  $pK_a$  dos ácidos, respeitando-se o limite superior da faixa operacional de pH no sentido de evitar que a sílica se dissolva, danificando a coluna.

Seguindo a metodologia da USP 28 foi feita a injeção de 20 microlitros em separado; de solução do SQR USP ácido acetilsalicílico e de solução do SQR USP ácido salicílico, conforme os cromatogramas das figuras 46 e 47 respectivamente.



**Figura 46:** cromatograma da SQR Ácido salicílico, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 (anexo 3): diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de 1-heptanosulfonato de sódio, água e acetonitrila (2 g : 850 mL : 150 mL) (pH ajustado para 3,4), concentração igual à 0,0152 mg/mL de ácido salicílico, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 280 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

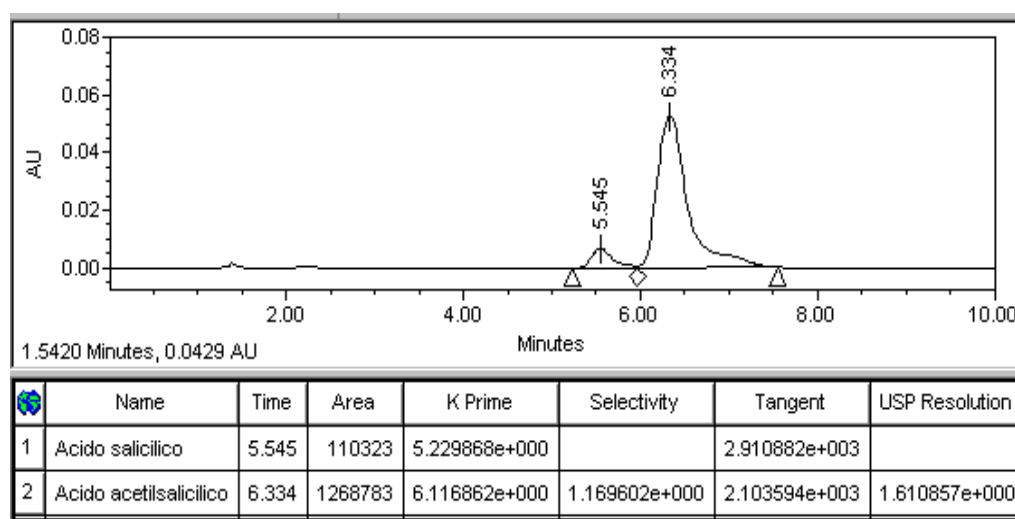


**Figura 47:** cromatograma da SQR Ácido Acetilsalicílico, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 (anexo 3): diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de 1-heptanosulfonato de sódio, água e acetonitrila (2 g : 850 mL : 150 mL) (pH ajustado para 3,4), concentração igual à 0,5020 mg/mL de ácido acetilsalicílico, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 280 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros



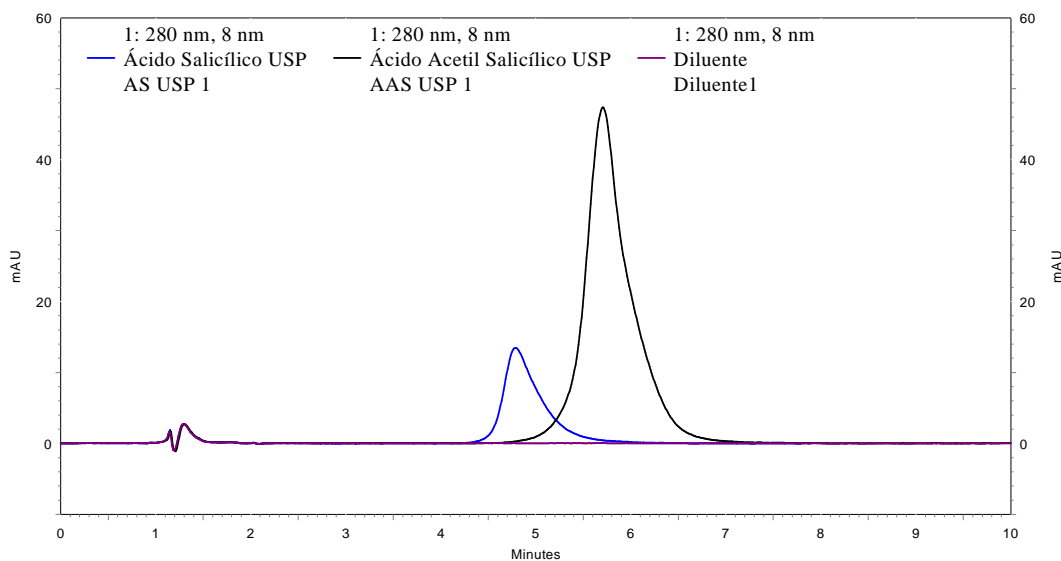
Após determinar o tempo de retenção referente a cada pico, foi feita uma solução contendo os dois padrões, esta solução foi feita para achar os parâmetros referentes ao “System Suitability”. A figura 48 mostra o perfil cromatográfico e os parâmetros obtidos para o “System Suitability”.

Observamos que a resolução obtida ( $R_s = 1,6$ ) não está de acordo com o mínimo preconizado pelo FDA ou pela USP 28 (tabela 1) que deve ser de no mínimo de dois; o fator de cauda (FT) para o ácido acetilsalicílico está acima do máximo permitido ( $FT < 2$ ). Além deste sistema não satisfazer o “System Suitability”, verifica-se que a absorvância dos sinais é baixa, comprometendo a relação sinal/ruído para o ácido salicílico. A propósito o DPR preconizado pela monografia oficial (anexo 3) é no máximo 2,0%.



**Figura 48:** cromatograma das SQR Ácido salicílico e Ácido acetilsalicílico com os parâmetros do “System Suitability” determinados, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 (anexo 3): diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de 1-heptanosulfonato de sódio, água e acetonitrila (2 g : 850 mL : 150 mL) (pH ajustado para 3,4), concentração igual à 0,0135 mg/mL de ácido salicílico e 0,4518 de ácido acetilsalicílico, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 280 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

Após a tentativa anterior, foi feita uma outra usando uma nova coluna com a mesma fase estacionária, porém de outro fabricante. Foi usado também outro cromatógrafo com detector UV/VIS com DAD. Mesmo após vários ajustes na proporção da fase móvel, não se conseguiu uma resolução satisfatória ( $R_s > 2$ ) como pode ser visto na figura 49. Observamos uma melhora no fator de cauda, provavelmente devido ao fato de a coluna possuir maior número de grupos silanóis derivatizados com grupamentos alquilsilila (coluna endcapped).



**Figura 49:** cromatograma das SQR Ácido salicílico e Ácido acetilsalicílico utilizando uma outra coluna (de outro fabricante, coluna endcapped) e outro cromatógrafo, obtido conforme as condições preconizadas na USP 28 (anexo 3): diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de 1-heptanosulfonato de sódio, água e acetonitrila (2 g : 850 mL : 150 mL) (pH ajustado para 3,4), concentração igual à 0,0135 mg/mL de ácido salicílico e 0,4518 de ácido acetilsalicílico, coluna C 18 (4,6 x 250)mm e 5 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS com DAD, comprimento de onda igual à 280 nm, fluxo de 2,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

#### 4.3.2 Metodologia desenvolvida no laboratório de medicamentos do DQ/INCQS/Fiocruz

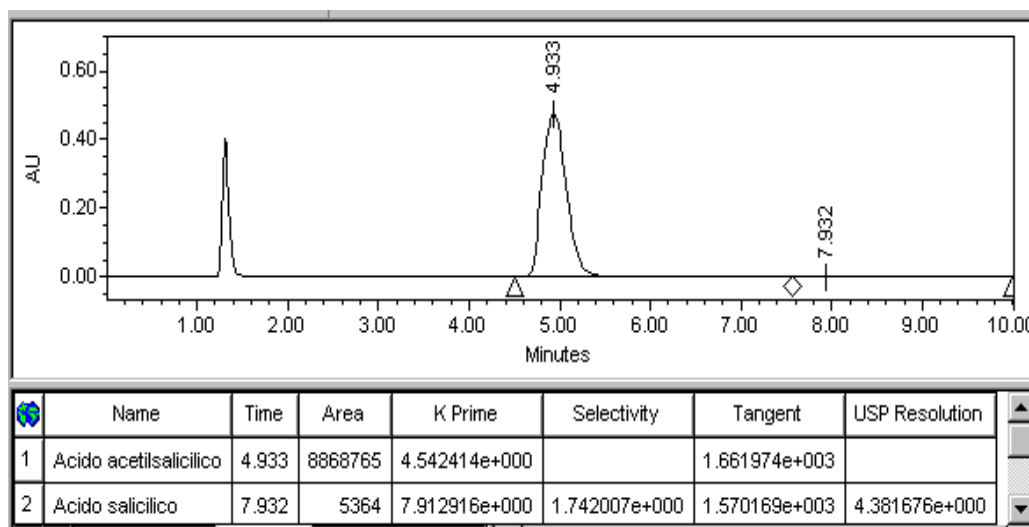
Baseado na relevância científica de que os ácidos acetilsalicílico e o salicílico são ácidos fracos, cujos antilogarítmicos ( $pK_a$ ) da constante de ionização são 3,5 e 3,0, respectivamente, a metodologia em fase reversa mais indicada é a supressão iônica da ionização das mesmas. Este tipo de cromatografia em fase reversa é aplicado para os ácidos fracos e as bases fracas, suprimindo-se as formas ionizadas em solução, através do controle de pH, conforme descrito no Capítulo 3.2.1.

Foi desenvolvida no laboratório de medicamentos uma metodologia por CLAE para análise dos dois ácidos, que apresentou dados referentes ao “System Suitability” melhores do que a metodologia da Farmacopéia Americana (USP 28) e vantagens metodológicas sobre a metodologia volumétrica da Farmacopéia Brasileira (FB 2002). Foi feita, também, a curva de calibração do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico onde se obteve bons resultados quanto à estatística da regressão.

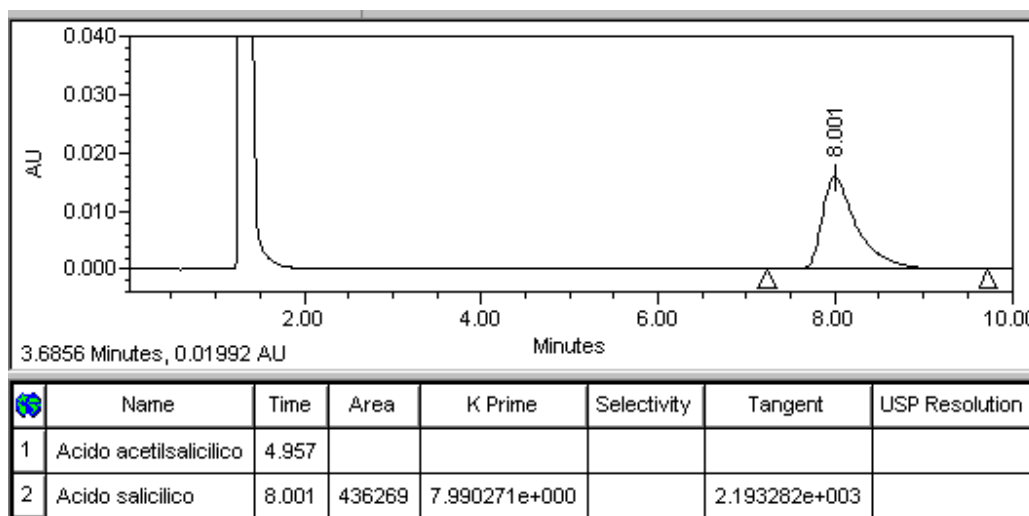
As condições cromatográficas usadas foram: coluna L1(C18) novapack TM, quatro micras, (3,9 x 150) mm, fase móvel composta por solução 0,05% de ácido trifluoroacético

(ATF) e acetonitrila (80:20) e pH 2,2 (ajustado), detector ultravioleta/visível (comprimento de onda 230 nm), fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros, diluente composto por acetonitrila e ácido fórmico (99:1), concentração da SQR USP ácido acetilsalicílico igual a aproximadamente 0,4 mg/mL e a concentração da SQR USP ácido salicílico igual a aproximadamente 0,016 mg/mL.

As 50 e 51 mostram os cromatogramas obtidos pelas injeções separadas do SQR USP ácido acetilsalicílico e do SQR USP ácido salicílico, respectivamente.

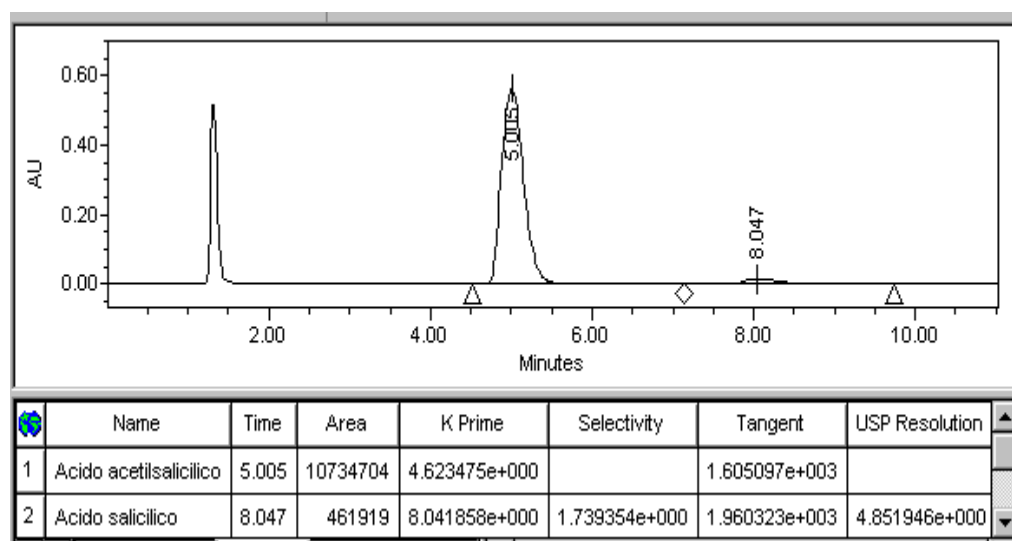


**Figura 50:** cromatograma da SQR Ácido Acetilsalicílico, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS: diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de solução aquosa de ácido trifluoracético (ATF) 0,05% e acetonitrila (80 : 20) (pH ajustado para 2,2), concentração igual à 0,3125 mg/mL de ácido acetilsalicílico, coluna C 18 novapack TM (3,9 x 150)mm e 4 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 230 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros



**Figura 51:** cromatograma da SQR Ácido salicílico, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS: diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de solução aquosa de ácido trifluoroacético (ATF) 0,05% e acetonitrila (80 : 20) (pH ajustado para 2,2), concentração igual à 0,0152 mg/mL de ácido salicílico, coluna C 18 novapack TM (3,9 x 150)mm e 4 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 230 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

Após determinar o tempo de retenção de cada substância foi feita a injeção de uma nova solução contendo os dois padrões. Podemos observar pela tabela do cromatograma valores muito mais adequados para o “System Suitability” (principalmente quanto à resolução,  $R_s = 4,9$  aproximadamente). Observamos, também, que devido ao fato de os picos serem mais finos (estreitos) e a relação sinal/ruído são aproximadamente dez vezes maiores que a relação sinal/ruído do sistema apresentado na metodologia da USP 28. Este fato pode ser verificado ao comparar a escala de absorvância do cromatograma da figura 52 com a escala de absorvância do cromatograma da figura 48.



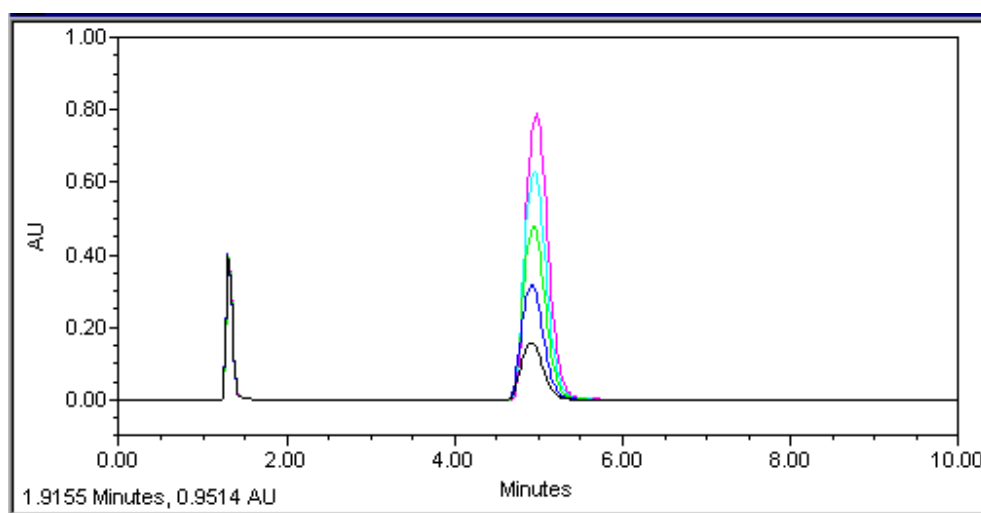
**Figura 52:** cromatograma das SQR Ácido Acetilsalicílico e Ácido Salicílico, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS: diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de solução aquosa de ácido trifluoroacético (ATF) 0,05% e acetonitrila (80 : 20) (pH ajustado para 2,2), concentração igual à 0,3782 mg/mL de ácido acetilsalicílico e 0,0161 mg/mL de ácido salicílico, coluna C 18 novapack TM (3,9 x 150)mm e 4 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 230 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

Antes de proceder a quantificação da amostra foi feita uma curva de calibração para o ácido acetilsalicílico e outra curva para o ácido salicílico, usando os padrões da USP. O nível

nº. 3 é equivalente ao nível de concentração esperado de ácido acetilsalicílico na amostra de aspirina.

O cromatograma da figura 53 mostra, em modo de sobreposição, os picos obtidos dos cromatogramas dos cinco níveis de concentração da curva de calibração para o ácido acetilsalicílico e, em seguida, a tabela 6 mostra os níveis de concentração e área média obtida nas injeções usadas na curva de calibração e, a tabela 7 a análise residual obtida usando o programa Statistica 5.0 na obtenção da curva de calibração.

O gráfico 1 mostra a curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico usando o programa Statistica 5.0 e o gráfico 2 mostra a ampliação da curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico e a obtenção pelo método gráfico do Limite de Detecção (LD = 0,032 mg/mL) e o Limite de Quantificação (LQ = 0,049 mg/mL).



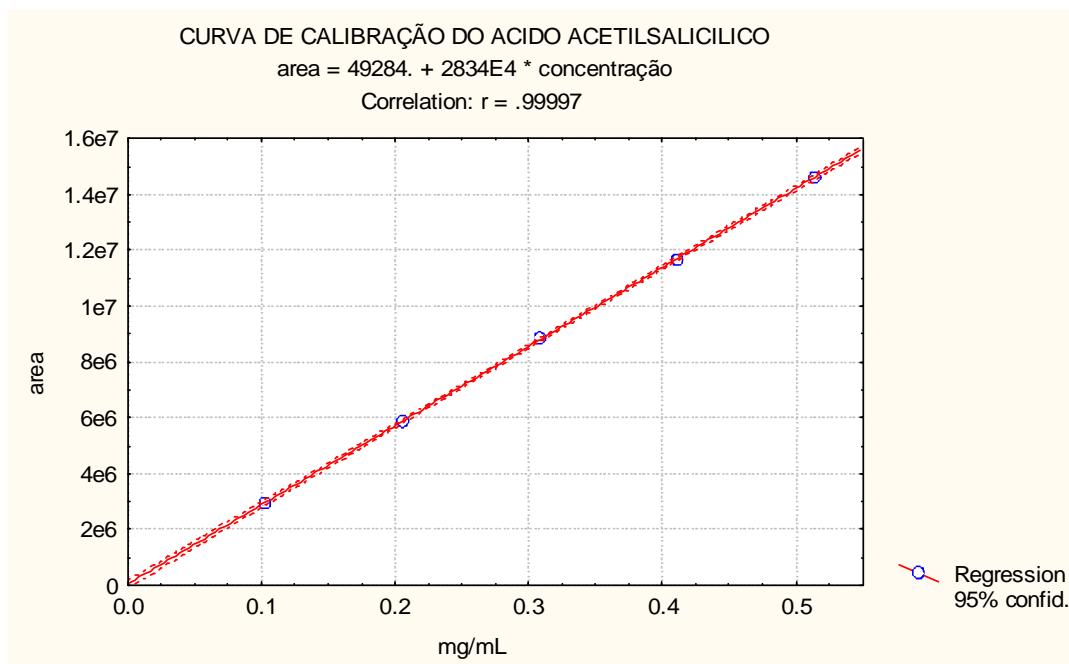
**Figura 53:** cromatogramas da curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico em modo de sobreposição, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS: diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de solução aquosa de ácido trifluoracético (ATF) 0,05% e acetonitrila (80 : 20) (pH ajustado para 2,2), concentração igual à 0,10282 mg/mL (nível 1), 0,20564 mg/mL (nível 2), 0,30846 mg/mL (nível 3), 0,41128 mg/mL (nível 4) e 0,51410 mg/mL (nível 5) de ácido acetilsalicílico, coluna C 18 novapack TM (3,9 x 150)mm e 4 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 230 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

**Tabela 6:** níveis de concentração e área média obtida nas injeções usadas na curva de calibração do ácido acetilsalicílico

Nível	Concentração (mg/mL)	área
1	0,10282	2947197,6
2	0,20564	5870712,9
3	0,30846	8853575,2
4	0,41128	11672260,3
5	0,51410	14618299,1

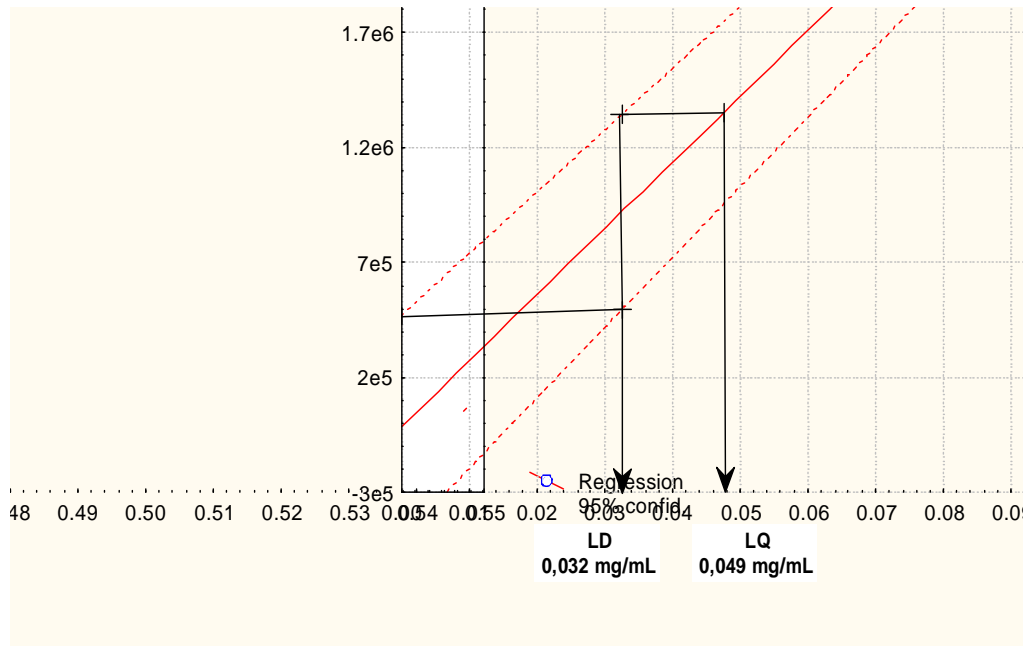
**Tabela 7:** análise residual obtida usando o programa Statistica 5.0 na obtenção da curva de calibração do ácido acetilsalicílico

Residual Analysis		
Dep.Var. : Var 2	Multiple R : .99996900	F = 48387.79
	R <sup>2</sup> : .99993800	df = 1,3
Nº of cases : 5	adjusted R <sup>2</sup> : .99991734	p = .000000
	Standard error of estimate : 41896.479993	
Intercept : 49283.900000	std. error: 43941.40	t ( 3) = 1,1216 p < .3437



**Gráfico 1:** gráfico da curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico usando o programa Statistica 5.0

Observando a tabela 7, verifica-se, que além de uma boa Linearidade demonstrada pela obtenção de um coeficiente de correlação ( $R = 0.99997$ ), maior que o mínimo aceitável pela Anvisa, de  $0,99^2$ , verifica-se também e, principalmente, a ausência de erros sistemáticos, pois o valor de  $p < 0.3437$ , portanto  $p > 0,05$ .

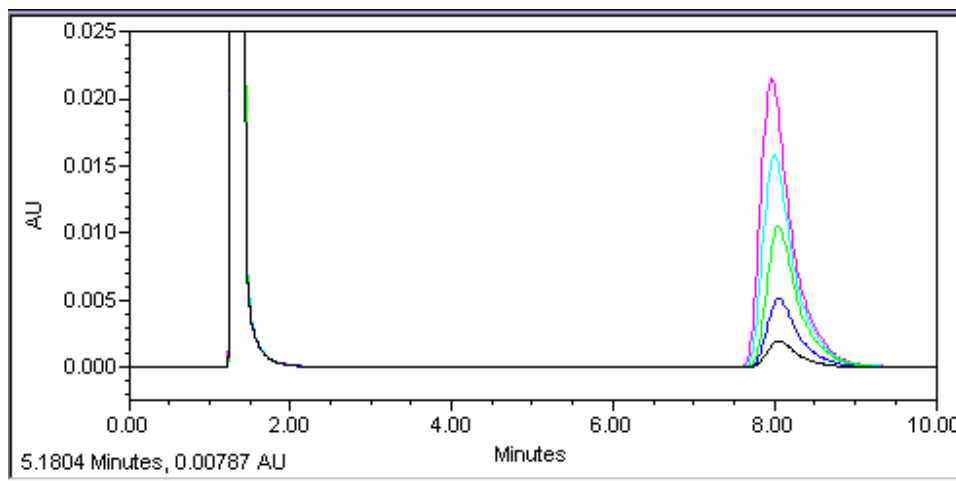


**Gráfico 2:** ampliação do gráfico da curva de calibração da SQR USP Ácido Acetilsalicílico usando o programa Statistica 5.0; obtenção pelo método gráfico do Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ)

Do mesmo modo, foi feita a curva de calibração para o ácido salicílico. O nível n°. 3 é equivalente ao nível máximo permitido de ácido salicílico na amostra de aspirina.

O cromatograma da figura 54 mostra, em modo de sobreposição, os picos obtidos dos cromatogramas dos cinco níveis de concentração da curva de calibração para o ácido salicílico e, em seguida, a tabela 8 mostra os níveis de concentração e a área média obtida nas injeções usadas na curva de calibração e, a tabela 9 a análise residual obtida usando o programa Statistica 5.0 na obtenção da curva de calibração.

O gráfico 3 mostra a curva de calibração da SQR USP Ácido salicílico usando o programa Statistica 5.0 e o gráfico 4 mostra a ampliação da curva de calibração da SQR USP ácido salicílico e a obtenção pelo método gráfico do Limite de Detecção (LD = 2,3 µg/mL) e o Limite de Quantificação (LQ = 3,3 µg/mL).



**Figura 54:** cromatogramas da curva de calibração da SQR USP Ácido Salicílico em modo de sobreposição, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS: diluente composto de acetonitrila e ácido fórmico (99:1), fase móvel composta de solução aquosa de ácido trifluoroacético (ATF) 0,05% e acetonitrila (80 : 20) (pH ajustado para 2,2), concentração igual à 3,042 µg/mL (nível 1), 5,070 µg/mL (nível 2), 10,140 µg/mL (nível 3), 15,210 µg/mL (nível 4) e 20,280 µg/mL (nível 5) de ácido salicílico, coluna C 18 novapack TM (3,9 x 150)mm e 4 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 230 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

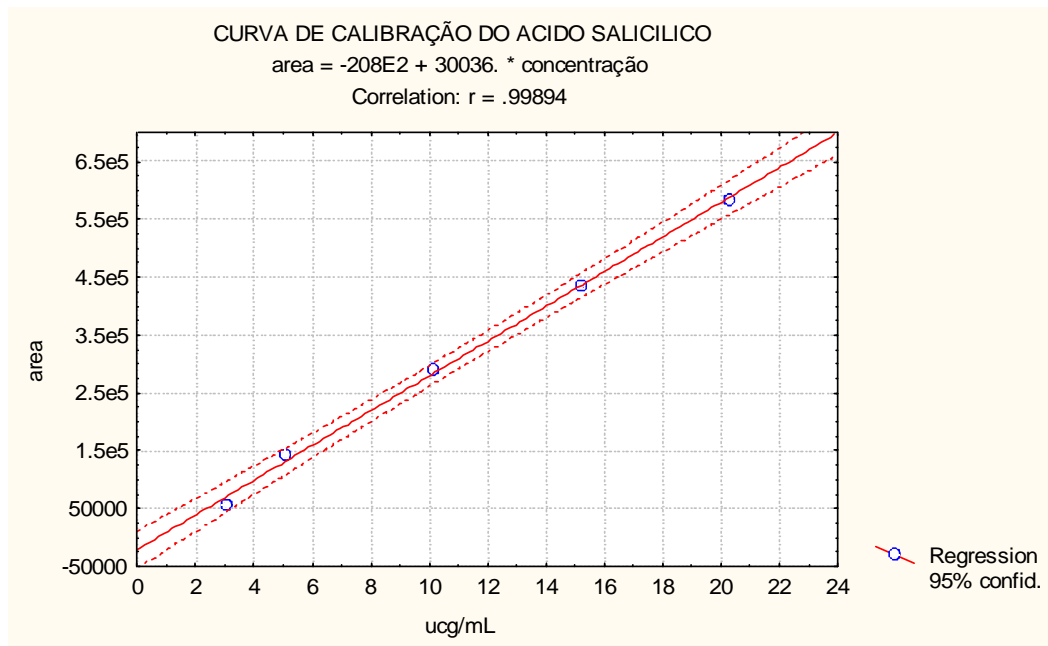
**Tabela 8:** níveis de concentração e área média obtida nas injeções usadas na curva de calibração do ácido salicílico

Nível	Concentração (µg/mL)	área
1	3,042	56475,4
2	5,070	142910,0
3	10,140	290264,7
4	15,210	435941,8
5	20,280	584213,8

**Tabela 9:** análise residual obtida usando o programa Statistica 5.0 na obtenção da curva de calibração do ácido salicílico

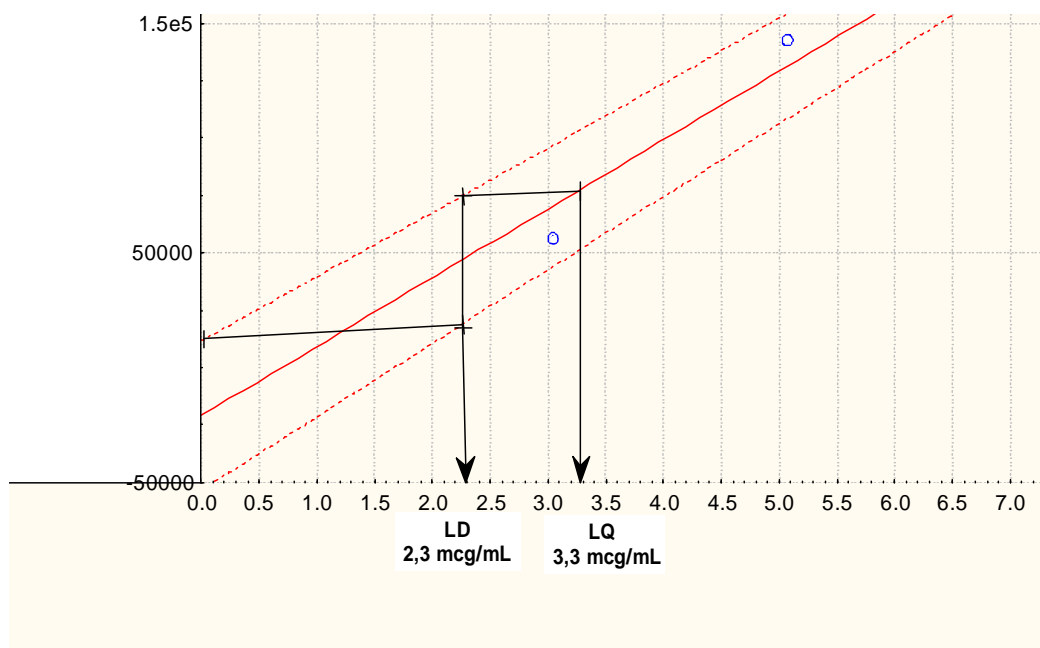
Residual Analysis			
Dep.Var. : Var 2	Multiple R : .99894005	F = 1412.916	
	R <sup>2</sup> : .99788123	df = 1,3	
Nº of cases : 5	adjusted R <sup>2</sup> : .99717497	p = .000041	
	Standard error of estimate : 11378.364444		
Intercept : - 20881.19909	std. error: 9983.027	t ( 3) = -2,092	p < .1276





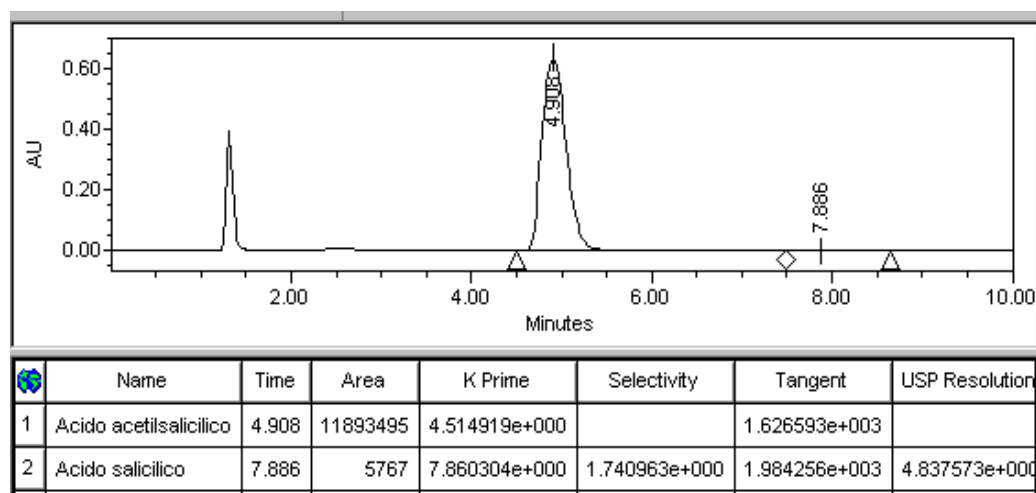
**Gráfico 3:** gráfico da curva de calibração da SQR USP Ácido Salicílico usando o programa Statistica 5.0

Observando a tabela 9, verifica-se, que além de uma boa Linearidade demonstrada pela obtenção de um coeficiente de correlação ( $R = 0.99894$ ), maior que o mínimo aceitável pela Anvisa, de  $0,99^2$ , verifica-se também e, principalmente, a ausência de erros sistemáticos, pois o valor de  $p < 0.1276$ , portanto  $p > 0,05$ .



**Gráfico 4:** ampliação do gráfico da curva de calibração da SQR USP Ácido Salicílico usando o programa Statistica 5.0; obtenção pelo método gráfico do Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ)

Depois de feita a curva de calibração, foi realizado o ensaio de teor de ácido acetilsalicílico e o ensaio limite de ácido salicílico na amostra de aspirina, usando esta metodologia. O resultado encontrado foi de 99,6 % do declarado de ácido acetilsalicílico (especificado é 90,0% a 110,0% do declarado pelo fabricante), portanto, satisfatória. O teor encontrado no ensaio limite de ácido salicílico foi de 0,1% (especificado é no máximo de 3,0 %), portanto, também, está satisfatório o teste. O cromatograma da figura 55 mostra o perfil do cromatograma obtido na amostra de aspirina.



**Figura 55:** cromatograma da amostra fiscal de aspirina, obtido conforme as condições desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS: diluente composto de acetonitrila e

ácido formico (99:1), fase móvel composta de solução aquosa de ácido trifluoracético (ATF) 0,05% e acetonitrila (80 : 20) (pH ajustado para 2,2), concentração igual à 0,4200 mg/mL de ácido acetilsalicílico, coluna C 18 novapack TM (3,9 x 150)mm e 4 micras, temperatura da coluna igual a 25 C, detector UV/VIS óptico, comprimento de onda igual à 230 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 microlitros

#### **4.3.3 Determinação do teor na mesma amostra fiscal usando a metodologia preconizada na F.B. 2002**

A metodologia de dosagem do teor para o ácido acetilsalicílico na Aspirina, definida na FB 2002 (em anexo), é por volumetria ácido-base pelo resto, e seu limite é de (95,0 a 105,0)% do declarado pelo fabricante. Na Aspirina, conforme a FB 2002, devemos também controlar o produto de degradação do ácido acetilsalicílico que é o ácido salicílico. Este é controlado através do ensaio de pureza realizado por uma reação colorimétrica com uma solução de sulfato férrico amoniacal nítrico, onde é gerada uma cor violeta. Esta cor é comparada a olho nu com a cor gerada por um padrão, cuja concentração é de 0,01 % (p/v). A cor gerada na amostra não poderá ser mais intensa que a do padrão.

O método preconizado na FB 2002 (anexo 4) consiste em dissolver uma massa pré-determinada de um pool de vinte comprimidos da amostra em um volume quantitativo de hidróxido de sódio 0,5 M em excesso. Após fervura por dez minutos para eliminar os carbonatos, deve-se dosar o excesso de álcali com ácido clorídrico 0,5 M quantitativamente, utilizando como indicador o vermelho de fenol. Foi feito, também, um branco em paralelo. Cada mL de hidróxido de sódio 0,5 M equivale a 45,040 mg de ácido acetilsalicílico<sup>9</sup>.

O resultado encontrado nas três triplicatas individualmente deste pool de vinte comprimidos foi de 111,1% , 108,8% e 109,2% . A média do resultado gerado desta triplicata ficou em 109,7%, resultado este superior ao que foi encontrado por cromatografia a líquido, por supressão iônica, que foi de 99,6 %. Como esta diferença ficou muito grande em torno de 10,1% foi realizado um simples teste para verificar a sensibilidade e a especificidade do método volumétrico.

Foi pesada uma nova massa (aproximadamente 90%) das massas pesadas anteriormente na análise de teor (do mesmo "pool"). A esta massa foi acrescentada outra massa de ácido salicílico. Em resumo, a massa a ser dissolvida e titulada de acordo com o procedimento da FB 2002 foi composta por 87,4 % de ácido acetilsalicílico e 12,6% de ácido salicílico. Após a titulação, o resultado encontrado foi de 108,9%, resultado este semelhante aos resultados encontrados nas três triplicatas individuais da análise de teor.

O teste realizado vem mostrar indícios de que o ensaio por volumetria não é seletivo e nem específico para dosar o ácido acetilsalicílico. Além deste fato, a diferença encontrada pode ser devido a presença de algum excipiente que também deve estar reagindo com o hidróxido de sódio em excesso. Estes fatos justificam a necessidade de se ter um outro método que seja capaz de separar e quantificar cada um dos ácidos.

Verificamos que o valor encontrado na análise de dissolução de ácido acetilsalicílico para esta amostra, realizado no Laboratório de Dissolução do INCQS por outro analista e usando a metodologia preconizada na USP 28 (anexo 3), por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta<sup>20</sup> foi de  $(95 \pm 3)\%$  do declarado em trinta minutos - resultado este que ratifica o teor encontrado utilizando a metodologia por CLAE, desenvolvida no laboratório de medicamentos do INCQS que foi de  $(498 \pm 5)$  mg/comprimido. Este resultado é equivalente a 99,6% do declarado pelo fabricante.

Outro detalhe importante é que esta amostra seria reprovada se o resultado realizado pela FB 2002 fosse considerado, pois o limite especificado na FB 2002 para o ácido acetilsalicílico é de (95,0 a 105,0)% do declarado pelo fabricante, diferentemente do limite preconizado na USP 28, que é de (90,0 a 110,0)% do declarado pelo fabricante, especificado mais comum quando se trata de formas farmacêuticas administradas por via oral.

Esta análise novamente trás a discussão o assunto, sobre a obrigatoriedade do uso de metodologia preconizada na Farmacopéia Brasileira, mesmo que exista em outra Farmacopéia uma metodologia mais atual e com maior relevância científica, o que conseqüentemente acarretará um menor Risco Sanitário para a sociedade. Neste caso a metodologia da Farmacopéia Brasileira para este produto, ao analisar o ácido acetilsalicílico por volumetria ácido-base, não apresentou resultado satisfatório quanto à seletividade e especificidade ao adicionar 12,6 % de ácido salicílico na amostra de aspirina, como foi visto anteriormente.

A tabela 10 mostra o resumo dos resultados encontrados na amostra analisada por diferentes metodologias.

**Tabela 10:** comparação dos resultados encontrados na amostra fiscal de ácido acetilsalicílico no ensaio de teor, usando metodologias diferentes

Técnica, Metodologia	Teores (% do declarado)
CLAE por supressão iônica, DQ/INCQS	$(498 \pm 5)$ mg/comprimido (99,6% d.d.) 0,1% de ácido salicílico
Volumetria ácido-base, FB 2002	$(548 \pm 15)$ mg/comprimido (109,6% d.d.)
Espectrofotometria, USP 28 (Dissolução)	$(95 \pm 3)$ % d.d. em trinta minutos

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esperamos que com bases na definição de Vigilância Sanitária expressa na Lei nº. 8.080 de 1990, do Código de Defesa do Consumidor - Lei nº. 8.079, de 1990 e da nossa Missão Institucional (todas externa o mesmo objetivo, de "...eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de serviços de interesse da saúde..."<sup>17</sup>), em ter mostrado a importância que o profissional que trabalha na rotina de um laboratório oficial, sendo no INCQS ou nos LACENS, tem que possuir ao analisar criticamente algumas metodologias "Farmacopeicas", quanto ao "System Suitability" e ao Risco Sanitário para a população.

Mostramos com este trabalho que existe a necessidade de com base em conceitos químicos e físico-químicos, fazer ajustes ao método Farmacopeico, a fim de torná-lo mais adequado em termos de conformidade e adequação do cromatograma ("System Suitability"). Este fato ocorre com frequência em amostras com multicomponentes ou quando, além do composto principal, coexistem impurezas ou substâncias relacionadas.

É bom ressaltar que os três exemplos de metodologias discutidos nesta monografia (Maleato de Enalapril, Rifampicina com Isoniazida e Ácido acetilsalicílico) não são casos isolados, existem tantas outras monografias farmacopeicas que são necessários efetuar ajustes ou, até mesmo, modificações no método visando otimizar o perfil cromatográfico assegurando com isso a confiabilidade analítica.

Através desse estudo, é necessário que se revise a legislação que trata da prioridade de se usar a Farmacopéia Brasileira, quando esta não estiver atualizada em relação a outras Farmacopéias Internacionais, quanto à existência de produtos de degradação e impurezas.

Atualizar e modernizar a Farmacopéia Brasileira com bases na competência analítica deste Instituto, transferindo conhecimentos adquiridos em experimentos no laboratório durante a nossa rotina de trabalho faz parte da nossa Missão Institucional. É necessário que o Setor de Medicamentos do INCQS assuma esta responsabilidade no que diz respeito ao Controle de Qualidade de Medicamentos.

Futuramente, fica a proposta de, além de fazer outras curvas de calibração para ambos os ácidos, fazer ainda uma bateria de testes preconizados na Legislação<sup>2</sup> para que, de fato, este método possa ser validado. A validação e a construção de uma planilha de incerteza deste método poderão fazer parte do pré-projeto da Dissertação de Mestrado, a ser iniciada ("pretendida") em 2006 no INCQS.

Devido ao fato discutido nesta monografia no que se refere à rifampicina, e que segundo trabalhos internacionais parece ser um problema de vários países, não somente do Brasil. A intenção que será decidida junto com o meu orientador e baseado em levantamento bibliográfico a continuação dos estudos dessa molécula (figura 2) e seus produtos de degradação para a Dissertação de Mestrado, a ser iniciada ("pretendida") em 2006 no INCQS.

Este estudo constará em expor esta molécula a várias fontes de estresse (luz, calor, temperatura, umidade, radiações ultravioleta e etc...), identificar as possíveis degradações, estudar os mecanismos cinéticos envolvidos, determinar a correlação destes mecanismos com a estabilidade relacionada ao acondicionamento de produtos e matéria-prima que contém rifampicina, desenvolver e validar uma metodologia alternativa por CLAE (modo isocrático) que apresente menor tempo e custo do que a metodologia preconizada na USP 28 (modo gradiente), onde dependendo do produto é preciso um tempo muito grande de corrida (mínimo 25 minutos e mais 20 minutos para reequilibrar a coluna), tornando este método inviável para o uso de um laboratório de controle de qualidade de uma indústria.

Esperamos que através deste trabalho e baseado em anos de experiência em bancada, o autor e seu orientador buscam compartilhar a sua experiência sobre análises de medicamentos voltados para a Vigilância Sanitária, oferecendo um instrumento de trabalho para todos os profissionais iniciantes nesta área e principalmente aos LACENS.

Com muito orgulho pretendemos lembrar a todos os profissionais que trabalham de alguma forma para Anvisa, o "Princípio da Precaução" é, por natureza, o mais típico dos atuais princípios relacionados à Vigilância Sanitária, porque é em função dele que os profissionais atuam. É para a existência (ou probabilidade de existência) de risco que se dirigem às ações dessa Instituição<sup>21</sup>.

Como diz Hurd (1987)

*... O alfabetismo científico e tecnológico como finalidade de ensino traduz-se na capacidade de um estudante interpretar as realizações e as deficiências da ciência e tecnologia em termos de forças humanas e sociais que as sustentam (...).*

*Quando a ciência e a tecnologia estão relacionadas com o bem-estar humano e social, levantam-se problemas éticos de valores: a ciência e tecnologia nunca estão isentas de valores, nem são eticamente neutras, quer para os cientistas, quer para os cidadãos.*

## 6 REFERÊNCIAS

- 01 ALBERT, A. L. M. **Curso de cromatografia líquida de alta eficiência**. INCQS / FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2001
- 02 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.
- 03 BERGQUIST, C.W. **Curso de cromatografia líquida de alta eficiência**. Warters, Rio de Janeiro, 2001
- 04 CARVALHO, G. I.; SANTOS, L. **SUS: Comentários a lei orgânica de saúde**, 3ª ed., São Paulo: Unicamp, 1996.
- 05 COSTA, E. A. Constituição da vigilância sanitária no Brasil. In: **Fundamentos da vigilância sanitária** (Rozenfeld, S., org.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000, p 15 – 40.
- 06 DEZEN, G. J. Curso completo de direito constitucional. 4ª ed., [s.l.]: Vestcon, 1998.
- 07 Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, DEF 2004/2003, 32ª ed., Rio de Janeiro: publicações científicas, 2003, 845p
- 08 European Pharmacopeia (EP), 2002.
- 09 Farmacopéia Brasileira (FB), 4ª ed., 2002.
- 10 Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde. **Manual de coleta de amostras de produtos sujeitos à vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1998, p. 40.
- 11 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **atividades institucionais**, 2001-2004.
- 12 KOROLKOVAS A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, 1984, p. 2-33.
- 13 MORIN, E. **A cabeça bem feita: repensar e reformar, reformar o pensamento**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2000.
- 14 PIOVESAN, M. F. **A construção política da agência nacional de vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Fiocruz/ ENSP, 2002.
- 15 SANTOS E. M.; ESCODA M. S. Q. **Vigilância sanitária: um histórico e um locus**. In: Curso de Especialização em Gerencia de Serviços Básicos de Saúde, 2000.
- 16 SCHNETZLER, Roseli Pacheco et al. **Educação em química - compromisso com a cidadania**, v.1, 3 ed., p.47-56, 2003.

- 17** SILVA, A. C. P. **O laboratório oficial na avaliação analítica.** In: Fundamentos da Vigilância Sanitária (Rozenfeld, S., org.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000, p.271 – 301.
- 18** United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Analytical Procedures and Method Validation, 2000.
- 19** United States Pharmacopoeia 27° ed., Rockville, 2002
- 20** United States Pharmacopoeia (USP) 28<sup>a</sup> ed., 2005.
- 21** ZILDA,P.S. ; COROA,M.L. **Vigilância Sanitária: Um histórico discursivo**
- 22** Revisa – Revista Brasileira de Vigilância Sanitária, v.1, n.1, p.3-15