

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE VOLTAMETRIA EM PULSO DIFERENCIAL, ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA E VÍSÍVEL E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COMO METODOLOGIAS ANALÍTICAS NO DOSEAMENTO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA PARACETAMOL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUCIANA OLIVEIRA DOS SANTOS

Dedico

À meus pais, Germires Alfredo e Maria Alice, por seu amor e compreensão, e ao meu marido Felipe Camello, por seu amor, carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus.

Ao Prof. Dr. Josino Costa Moreira pela orientação durante a construção deste trabalho e amizade.

À Kátia Miriam Menezes, Chefe do Departamento de Química do INCQS pela minha liberação ao Curso de Pós-Graduação e amizade.

A Mariete Lemos, Chefe do Laboratório de Medicamentos pela liberação do cromatógrafo líquido para realização das análises e amizade.

A Nilzete Paiva de Souza, Responsável do Setor de SQR pela amizade.

Aos amigos do INCQS/FIOCRUZ, pelo incentivo e amizade no convívio diário principalmente:

Maria do Carmo Vasquez Garcia,

Rosângela Christiano Dantas,

José Luiz Neves Aguiar

André Luiz Mazzei Albert,

Kátia Christina Leandro Antunes,

Maristela Rezende,

Jaylei Monteiro Gonçalves,

Lílian Venâncio,

Mararlene Ulberg Pereira,

Ao Márcio de Oliveira e Cassão pela confecção das figuras escaneadas.

As amigas do mestrado Andréa Diogo, Tereza Cristina e Antônia.

A banca examinadora pelas correções finais.

RESUMO

A necessidade de utilização de substâncias químicas de referência (SQR) nas determinações quantitativas feitas por via instrumental é fato por demais conhecido e dispensa comentários adicionais. O estabelecimento destas SQR, por sua vez, requer estudos exaustivos e a utilização de métodos analíticos seletivos, precisos e exatos.

O paracetamol é uma substância amplamente utilizada como antipiréticos e se constitui na terapia de escolha para pacientes sensíveis a aspirina, por não irritar a mucosa estomacal quando administrada em doses inferiores a máxima recomendada. Sua ampla utilização e seus limites terapêuticos fazem desta substância uma importante candidato a SQR a ser estudado.

O paracetamol é um composto fenólico que sofre oxidação irreversível em meio ácido, através de ataque eletrolítico no anel aromático com participação de 2 elétrons e 2 prótons. Baseado nesta constatação este estudo buscou implementar e validar uma metodologia voltamétrica, cujos resultados foram comparados com aqueles produzidos pelas técnicas oficialmente recomendadas (espectrofotometria no ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência).

Todos os parâmetros analíticos significativos para técnica voltamétrica em pulso diferencial foram otimizados e o procedimento final foi validado, de acordo com as recomendações do INMETRO. As condições julgadas mais adequadas para determinação do paracetamol foram:

- eletrólito de suporte : metanol : ácido perclórico (1:1);
- amplitude de pulso: -50mv;
- velocidade de varredura: 15mv/s;
- velocidade de rotação do eletrodo de trabalho: 200 rpm.

Nestas condições, observa-se pico de oxidação do paracetamol a 780 mV que se mostrou útil para sua determinação quantitativa.

Os resultados obtidos na determinação voltamétrica do paracetamol em 3 amostras produzidas por diferentes fabricantes, demonstram que o método é

homocedástico e produz resultados equivalentes em exatidão e precisão àqueles oficialmente recomendados.

ABSTRACT

The paracetamol is a chemical substance extensively used in medicine against fever and pain. It constitutes a therapeutic alternative for those patients sensible to aspirin.

It is a phenolic compound and it suffers irreversible oxidation in acidic medium with the participation of 2 electrons and 2 protons per paracetamol molecule.

This work was carried out, in order to evaluate the applicability of voltammetry with solid electrodes as an alternative analytical method for analyzing paracetamol in raw material used for preparation of chemical standard.

All significant voltammetric analytical parameters were studied. The following voltammetric conditions were used:

Support electrolyte – metanol: perchloric acid

Diluent - metanol

pH –0.6

Scan rate – 15mv/s

Rotated speed – 200 rpm

The results obtained by this optimized method were compared with those obtained by using official methods (HPLC and UV- spectrophotometry) using paracetamol produced in three different producers.

Statistical tests used in these comparisons showed that all three methods produce precise and accurate results, based on the student test.

LUCIANA OLIVEIRA DOS SANTOS

Estudo Comparativo entre as técnicas de Voltametria em pulso diferencial, Espectrofotometria no ultravioleta e visível e Cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química Paracetamol.

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2003

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE VOLTAMETRIA EM PULSO DIFERENCIAL, ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA E VÍSÍVEL E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COMO METODOLOGIAS ANALÍTICAS NO DOSEAMENTO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA PARACETAMOL.

LUCIANA OLIVEIRA DOS SANTOS

Dissertação para obtenção de título de mestre em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

ORIENTADOR: JOSINO COSTA MOREIRA

COLABORADORA: SILVANA DO COUTO JACOB

Rio de Janeiro, 28 de agosto de 2003.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo Comparativo entre as técnicas de Voltametria em pulso diferencial, Espectrofotometria no ultravioleta e visível e Cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química Paracetamol.

LUCIANA OLIVEIRA DOS SANTOS

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Doutor Josino Costa Moreira (INCQS/FIOCRUZ)

Doutor Armir Wanderlei Nóbrega (INCQS/FIOCRUZ)

Doutora Célia Regina Souza da Silva (UFRJ)

Rio de Janeiro, 28 de agosto de 2003.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Luciana Oliveira

Estudo Comparativo entra as técnicas de Voltametria em pulso diferencial, Espectrofotometria no ultravioleta e visível e Cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química Paracetamol./Luciana Oliveira dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2003.

XII, 96p.il.tab

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/ INCQS, 2003. Orientador: Josino Costa Moreira.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Aspectos gerais sobre o paracetamol*

A utilização de analgésicos naturais para alívio das dores remonta aos primórdios da história escrita (cerca de 3.000 a.C.) e para esta finalidade recorria-se ao uso de plantas. Posteriormente, o rápido avanço dos conhecimentos fitoquímicos levou à descoberta e ao desenvolvimento dos analgésicos. Um clássico exemplo foi à síntese do ácido salicílico, em 1860, e dos compostos do grupo da pirazolona, representada pela antipirina, em 1883. A fenacetina foi sintetizada em 1886 e finalmente em 1890, tem-se o desenvolvimento do paracetamol (acetaminofen)¹.

Somente em 1893 o paracetamol foi introduzido na prática clínica por Von Mering. Contudo só foi utilizado extensivamente a partir de 1949, quando Brodie e Axelrod o identificaram como principal metabólito ativo tanto, da fenacetina como da acetanilida, ambos com ação analgésica-antipirética².

A partir desta época o paracetamol tem sido utilizado como ingrediente ativo para uma série de produtos farmacêuticos, sob diferentes formas de dosagens, sozinho ou associado. O Tylenol, por exemplo, foi introduzido no mercado norte-americano em 1955 por McNeil Laboratories.¹

Hoje em dia, o paracetamol é um dos medicamentos mais utilizados para alívio de dores crônicas e é um dos melhores analgésicos disponíveis no mercado.

Alguns efeitos colaterais são associados à esta substância. O de maior destaque é a sua ação hepatotóxica para humanos e animais de laboratório, observado quando administrado em doses acima da recomendada. A redução da hepatotoxicidade do paracetamol é conseguida com a introdução de um grupamento 2- metila na posição meta em relação ao grupo hidroxila, o que ocasiona também a redução na ação analgésica.³

Produtos farmacêuticos a base do paracetamol tiveram, recentemente, uma exaustiva utilização no Estado do Rio de Janeiro, no verão do ano de 2002, devido à epidemia de dengue. Este princípio ativo é o mais indicado, devido a não irritar a mucosa estomacal, quando administrado em doses inferiores à dose máxima.

recomendada é de 4 gramas/ dia para adultos e 100 miligramas/ quilo de peso para criança. Doses superiores a estas podem causar hemorragia digestiva, intoxicação exógena, hepatite medicamentosa e até mesmo levar à morte. No caso do paracetamol, a diferença entre a dose terapêutica e a tóxica, é pequena por isso a necessidade do controle de sua administração⁴.

As determinações dessa substância farmacêutica, tanto em fluidos biológicos como em medicamentos têm sido realizadas através de diferentes procedimentos, descritos em compêndios oficiais ou não.

As metodologias recomendadas pelas farmacopéias (compêndios oficiais) para o controle da qualidade do paracetamol e de seus produtos, são a espectrofotometria no UVVIS, para a avaliação da matéria-prima, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica ou eletroquímica para análise de preparações medicamentosas.⁶

O método proposto no presente estudo é o voltamétrico, apresentam em alguns casos, vantagens quando comparado com outros métodos analíticos tais como, elevada sensibilidade e boa seletividade, geralmente pouca ou nenhuma interferência de substâncias relacionadas, de excipientes, corantes, aglutinantes e outras substâncias utilizadas nas diferentes formas farmacêuticas, além de oferecer a possibilidade de realizar estudo dos mecanismos eletródicos de oxidação e redução⁵.

O paracetamol é um composto fenólico que sofre oxidação em meio ácido através de ataque eletrolítico no anel aromático com remoção irreversível de dois elétrons e dois prótons, produzindo a N-acetil-p-quinoneimina que através de um processo puramente químico dá como produto final a benzoquinona (mecanismo do tipo EC).^{5,7}

A estrutura química do paracetamol (acetaminofen, 4' hidroxiacetanilida, n-acetil-p-aminofenol, p-acetamidofenol) é mostrada na Figura 1.

Com perspectiva de avaliar a possibilidade de utilização da voltametria como técnica analítica de escolha ou mesmo alternativa, na determinação do paracetamol tanto como matéria prima quanto em preparações farmacêuticas, os parâmetros experimentais necessários foram otimizados. Nesta otimização além dos parâmetros instrumentais: amplitude de pulso, velocidade de varredura,

velocidade de agitação e tempo de purga; e também foram estudadas a influência: do pH do meio, a natureza do eletrólito suporte, do diluente da amostra⁸.

A metodologia resultante foi validada e comparada com as metodologias oficiais⁶.

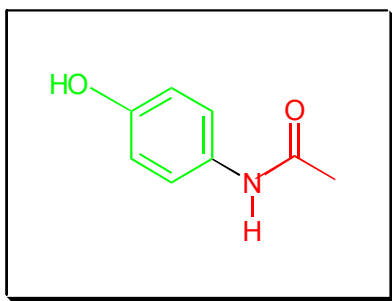


Figura 1: Estrutura química do paracetamol

2. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo, implementar e validar a técnica voltamétrica em regime de pulso diferencial e compará-la com a espectrofotometria no ultravioleta e visível e a cromatografia em fase líquida de alta eficiência, para a determinação do paracetamol tanto para matéria-prima como em formulações farmacêuticas.

Pretende-se, com isto, verificar a aplicabilidade desta técnica em estudos para o Estabelecimento de Substância Química de Referência, como Paracetamol.

3. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS MAIS IMPORTANTES PARA VALIDAÇÃO

Com objetivo de confirmar que os métodos analíticos utilizados são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar:

- Métodos não normalizados;
- Métodos criados/desenvolvidos pelo laboratório;
- Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos;
- Ampliações e modificações de métodos já normalizados.

A validação é o estabelecimento de uma evidência documentada que fornece um alto grau de segurança de que um processo específico levará consistentemente a um resultado confiável, ou seja, é o ato de provar, de acordo com princípios das Boas Práticas de Laboratório, que o procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva a resultados próximos ao de referência.⁹

O processo de validação de um método não normalizado deve estar descrito em um procedimento e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e previamente validados. Da mesma forma, o operador que realiza os estudos deve ser competente para tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo.

Planejamento da Validação

No planejamento e execução da validação, sugere-se uma seqüência de trabalho como a que se segue:⁹

- Definir a aplicação, objetivo e escopo do método;
- Definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
- Desenvolver um procedimento operacional para validação;

- Definir os experimentos de validação;
- Verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- Qualificar os materiais, padrões e reagentes;
- Executar os experimentos preliminares de validação;
- Ajustar os parâmetros do método e/ ou critérios de aceitação
- Executar experimentos completos de validação;
- Preparar um procedimento operacional para execução do método;
- Definir critérios de revalidação;
- Definir tipo e freqüência de verificações de controle da qualidade analítica

Espera-se que assim haja a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento e incluir, quando aplicável: ^{9,10}

- ✓ Linearidade;
- ✓ Faixa de linearidade;
- ✓ Exatidão (taxa de recuperação);
- ✓ Seletividade/Especificidade;
- ✓ Limite de Detecção;
- ✓ Limite de Quantificação
- ✓ Precisão – Repetitividade, Precisão intermediária e Reprodutibilidade;

3.1. **Linearidade:**^{10,11 e 12}

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é apresentada abaixo:

$$y = ax + b$$

Equação 3.1a

Onde:

y= resposta medida (absorbância, corrente do pico, etc.);

x= concentração;

a= inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b= interseção com eixo y, quando x=0.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto à reta pode ser considerada adequada como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado como livre de tendências, se o cálculo do desvio dos resíduos plotados contra a concentração apresentarem randomicamente uma distribuição normal no eixo zero

Como os desvios da linearidade são difíceis de serem detectados, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre valores medidos.

e os valores calculados a partir da equação de regressão. Calcula-se o valor de t , conforme equação 3.1b.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}}$$

Equação 3.1b

Onde:

resíduo = $X_{\text{medido}} - X_{\text{calculado}}$

s_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos

Se o valor de t calculado para um ponto duvidoso de uma curva de calibração for menor ou igual ao valor de t unilateral, para a confiança desejada e $(n-1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear.

A maioria dos equipamentos de detecção existentes possui uma faixa dinâmica linear. É necessário, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta.

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica deve ser descrita por uma função adequada relacionado à concentração do analito na amostra.

Para verificar que o método possui condição de uniformidade no valor das variâncias, utiliza-se o Teste de Cochran verificando se este é homocedástico ou heterocedástico.

Homocedasticidade/Heterocedasticidade

É importante verificar se o método é a homocedástico ou heterocedástico através do Teste de Cochran, a partir dos 5 valores obtidos para elaboração da curva de calibração. O cálculo é baseado nas variâncias, segundo a equação 3.1c.

$$C_{\text{calculado}} = S^2_{\text{maior}} / \Sigma S^2$$

Equação 3.1c

Onde:

S^2_{maior} – maior variância

ΣS^2 – somatório das variâncias

O valor crítico (tabelado) varia em função do número de pontos da curva de calibração (k) e dos números de repetições (NJ).

Quando:

$C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}} \Rightarrow$ O método é Heterocedástico

$C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}} \Rightarrow$ O método é Homocedástico

A constatação de que o método é homocedástico indica que a concentração da amostra apresenta-se em condição uniforme de variância, isto é, a variância é a mesma para todas as faixas de concentração. Caso constatada heterocedasticidade, é necessário transformar o método em homocedástico a partir de um artifício matemático como função logarítmica, razão inversa dos valores, e raiz quadrada. A função usada varia de acordo com as características dos dados encontrados.

3.2. Seletividade/especificidade: ^{10,11}

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz que os contém e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se deseja quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz resposta para vários analitos, mas que, em algumas situações pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

Dependendo da técnica analítica utilizada, a quantidade relativa da matriz pode diminuir conforme a amostra é processada durante as etapas do ensaio.

Teste de Especificidade

É a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a substância de interesse na presença dos demais componentes do meio, tais como: impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz (por exemplo, os constituintes da formulação de um comprimido, os excipientes). Demonstrando que os resultados não são afetados pela presença desses componentes.

É importante diferenciar o sinal da substância íntegra de seus produtos de degradação e impurezas. Na ausência de padrão de impurezas, sub-produto ou produto de degradação, expor a substância de interesse a uma degradação forçada, submetendo-a a condições de estresse: luz, calor, umidade, hidrólise e oxidação.

Este teste pode ser comprovado pelo estudo da estabilidade da substância de interesse, com a realização de metodologias analíticas pré-estabelecidas.

Testes de seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho do detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de especificidade. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Vários testes e tratamentos estatísticos correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz sem o analito ou um grupo satisfatório e amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência.

Preparam-se dois grupos de amostras testes, um com a amostra e outro com padrão de referência, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica. O número de amostras paralelas deve ser maior ou igual a 7 (sete) para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida. Faz-se o teste F (homogeneidade de variâncias) para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais, calculando-se conforme equação 3.2:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Equação 3.2

Onde:

S_1^2 = variância da matéria-prima (amostra);

S_2^2 = variância do material de referência certificado (padrão);

3.3. **Exatidão (taxa de recuperação):** ^{10,11}

É definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendências).

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/ valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação realizados analisando três amostras diferentes, com três concentrações em triplicata ou uma concentração efetuando nove leituras e a comparação entre os métodos.

- Taxa de recuperação - Avaliar a exatidão do método através do cálculo abaixo expresso em percentagem, na equação 3.3 ou também calculando pela equação da reta.

$$TR = \frac{(X_{exp})}{X_v} \cdot 100$$

Equação 3.3

X_{exp} . = valor obtido experimentalmente ou médio aritmético de valores obtidos

X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do material de referência)

3.4. Limite de detecção (LD): ^{10,11}

O limite de detecção representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo grau de confiabilidade utilizando um determinado procedimento, mas não necessariamente quantificada.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes, a razão ruído/sinal do equipamento.

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito.

Isto requer o cálculo da variância (s^2) e o desvio padrão (sd) das medições em replicata, calculando-se o LDM como a equação 3.4.

$$\text{LDM} = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (\text{sd})$$

Equação 3.4

Onde:

LDM = limite de detecção do método

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor da abscissa t_{Student} para $(1-\alpha) \times 100\%$ nível de confiança e $(n-1)$ graus de liberdade

sd= desvio padrão das análises em replicata

3.5. *Limite de Quantificação (LQ):^{10,11}*

O limite de quantificação representa a mais baixa concentração da substância em exame, que pode ser determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão adequadas utilizando o procedimento experimental em estudo.

O limite de quantificação inferior é estabelecido a partir de uma relação de valores (desvio padrão e inclinação) obtidos na curva de calibração no estudo da linearidade.

Para o estudo do limite de quantificação do método são analisadas soluções matrizes com baixas concentrações de substância, determinando-se a concentração mínima que pode ser quantificada com precisão e exatidão. O Limite de quantificação pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor de 10 desvios-padrão ou da média do branco.

Deve-se medir até 7 vezes a mesma concentração, calcular o desvio padrão e calcular conforme equação 3.5.

$$LQ = 10 \times (sd)$$

Equação 3.5

Onde:

LQ = limite de quantificação do método

sd= desvio padrão das análises em replicata

3.6. **Precisão:** ^{10,11}

O grau de concordância entre uma série de medidas, obtidas de múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, sob determinadas condições prescritas no método analítico. A precisão é considerada em três níveis: **Repetitividade, Precisão Intermediária e Reprodutibilidade.**

Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (VIM), descritas a seguir:

- Uso do mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local;
- Repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade pode ser expressa, quantitativamente, em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a uma amostra-branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Sugere-se 7 ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade.

Limite de repetitividade - r

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetitividade é aconselhável calcular este limite para saber se a diferença entre duas análises de uma amostra é significativa.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetitividade é calculado conforme equação 3.6a:

$$r = 2,8 \cdot S_r$$

Equação 3.6a

Onde:

S_r = desvio padrão de repetitividade associada aos resultados considerados

Precisão Intermediária

Refere-se à precisão do método analítico, medida em um mesmo laboratório sob condições diferentes: dias diferentes, equipamentos diferentes, colunas diferentes (lotes de empacotamento diferentes) e analistas diferentes .

O resultado obtido nos dois diferentes dias deverá ser o mesmo, o que pode ser comprovado por teste t, no qual a hipótese a ser afirmada é que o resultado obtido em diferentes dias é significativamente igual.

O cálculo é feito através da equação 3.6b:

$$S_i = \left[\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - y_j)^2 \right]^{1/2}$$

Equação 3.6b

Onde:

S_i = desvio padrão de precisão intermediária;

t = total de amostras ensaiadas;

n = total de ensaios efetuados por amostra;

j = número da amostra

k = número do ensaio da amostra

y_{jk} = valor do resultado K para amostra j

y_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j

Reprodutibilidade:

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial. Também se calcula o limite de reprodutibilidade (R), conforme equação 3.6c

$$R = 2,8 \cdot (S_r^2)^{1/2}$$

Equação 3.6c

4. BREVE DISCUSSÃO DO MÉTODO ANALÍTICO ABORDADO NESTE TRABALHO

4.1. *Voltametria em Pulso Diferencial*

A voltametria é um método eletroanalítico que se baseia na medição e interpretação das relações corrente-potencial, durante a eletrólise de uma solução, onde se introduziram dois ou três eletrodos, sendo um deles um eletrodo indicador, o outro, um eletrodo de referência e o terceiro um eletrodo auxiliar. O potencial é aplicado entre os eletrodos em forma de varredura, variando-se a uma velocidade constante em função do tempo, e as curvas originadas, correntes versus o potencial, é chamada de voltamograma.

Os primeiros estudos voltamétricos foram feitos por Heyrovsky e Kuceras em 1922 usando um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho e como de referência o eletrodo de calomelano saturado. Quando o eletrodo indicador ou de trabalho é o eletrodo gotejante de mercúrio, a técnica recebe o nome especial de polarografia¹³.

O eletrodo gotejante de mercúrio consiste, essencialmente, num tubo capilar ligado a um reservatório que contém uma coluna de mercúrio metálico puro. À medida que o mercúrio passa através do capilar forma-se uma gota no orifício de saída. Esta cresce até atingir um tamanho máximo, de uma forma perfeitamente definida, que depende do raio de abertura do capilar e da tensão superficial entre o mercúrio e a solução. Este eletrodo tem uma vantagem sobre os eletrodos sólidos (platina, ouro, carbono, etc), pois possui uma superfície renovável e livre de estrias ou outras irregularidades.¹⁴ No entanto é útil apenas para determinações catódicas, não podendo ser utilizado nos potenciais maiores que 0,1 volts, uma vez que o mercúrio sofre oxidação. Para trabalhar na faixa anódica, devem-se utilizar como eletrodos sólidos de trabalho, os exemplos citados anteriormente

Neste trabalho optou-se pelo eletrodo de trabalho sólido o de carbono vítreo¹⁵, atua no intervalo de 0 a +1.5 em meio ácido, ideal para oxidação da

substância paracetamol. É constituído de um disco circular de metal, grafite ou outro condutor, sendo revestido com material como teflon ou resina epóxi inerte, chamado de eletrodo de disco rotatório (RDE).

A técnica utilizada para as medidas foi a de voltametria de pulso diferencial, na qual aplicam-se pulsos de potencial, geralmente de 25 a 100 mV, sobre a variação contínua do potencial, medindo-se a corrente antes e no final da duração do pulso, e registrando-se a diferença do potencial.

O fluxo de elétrons resultante das reações eletroquímicas que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho, em função do potencial aplicado, pode ser medido e é denominado de corrente faradáica, pois obedece às leis de Faraday.

A resposta do procedimento voltamétrico é fortemente influenciada pelo material do eletrodo de trabalho, ou seja, a taxa de transferência de elétrons através da interface eletrodo-solução é dependente das propriedades físico-químicas do material do eletrodo, dentre eles destaca-se: mercúrio, carbono, ouro, platina e outros metais nobres.

O voltamograma é o registro do processo eletroquímico que ocorre ao nível dos eletrodos, sendo resultado da transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e as espécies em solução. Para que possa ser utilizado analiticamente, o voltamograma deverá refletir as mudanças que acontecerão na concentração das espécies da solução e não da superfície do eletrodo, que no caso de RDE é dado pela equação de Levich (equação 4.1)¹⁶:

$$I_p = 0,62nFAD_o^{2/3}W^{1/2}V^{-1/6}C_a$$

$$I_p = KC_a$$

Equação 4.1

Onde:

I_p = corrente;

n = número de mol de elétrons por mol do analito;

F = constante de faraday;

A = área do eletrodo (cm^2);

C_a = concentração de A (mol/cm^3);

$D_o^{2/3}$ = coeficiente de difusão (cm^2/s);

$W^{1/2}$ = velocidade angular do disco (rpm/s);

$V^{-1/6}$ = viscosidade cinemática (cm^2/s).

Técnicas eletroquímicas de potencial controlado, ou seja, nas quais o potencial do eletrodo de trabalho é utilizado para conduzir a reação de transferência de elétrons, têm sido utilizadas para medidas de concentração de espécies específicas, mesmo em concentrações que às vezes podem atingir níveis de até 10^{-12} mol/L ¹⁷.

Dentre os fatores de grande importância para a precisão voltamétrica, a reprodutibilidade na área efetiva do eletrodo, é provavelmente a mais importante. E outros parâmetros analíticos como: tipo de eletrodo de trabalho, de referência e auxiliar, natureza do eletrólito suporte, diluente da amostra, influência do pH no meio, concentração das soluções de trabalho e os parâmetros instrumentais: amplitude de pulso, velocidade de agitação, velocidade de varredura e tempo de purga, são variáveis conforme a estrutura química da substância em análise.

A utilização de técnicas voltamétricas na determinação de compostos orgânicos de interesse biológico e farmacêutico é ampla uma vez que a maioria destes compostos contém grupos passíveis de redução ou oxidação em eletrodo de grafite (carbono vítreo), platina ou mercúrio. A aplicabilidade das técnicas pode ainda ser estendida para compostos não eletroativos através de reações de derivatização tais como: nitração e condensação, sendo capaz de tornar os compostos eletroquimicamente ativos, e também o estudo da cinética e dos mecanismos das reações, a determinação da fórmula e da estabilidade de complexos podem ser feitos por esta técnica.

No caso de aplicações farmacêuticas, a grande vantagem da voltametria tem sido a pequena influência de excipientes não dissolvidos ou coloridos presentes nestas formulações sobre o sinal eletródico.

As fotos a seguir ilustram o equipamento polarógrafo e os eletrodos utilizados no desenvolvimento do trabalho.

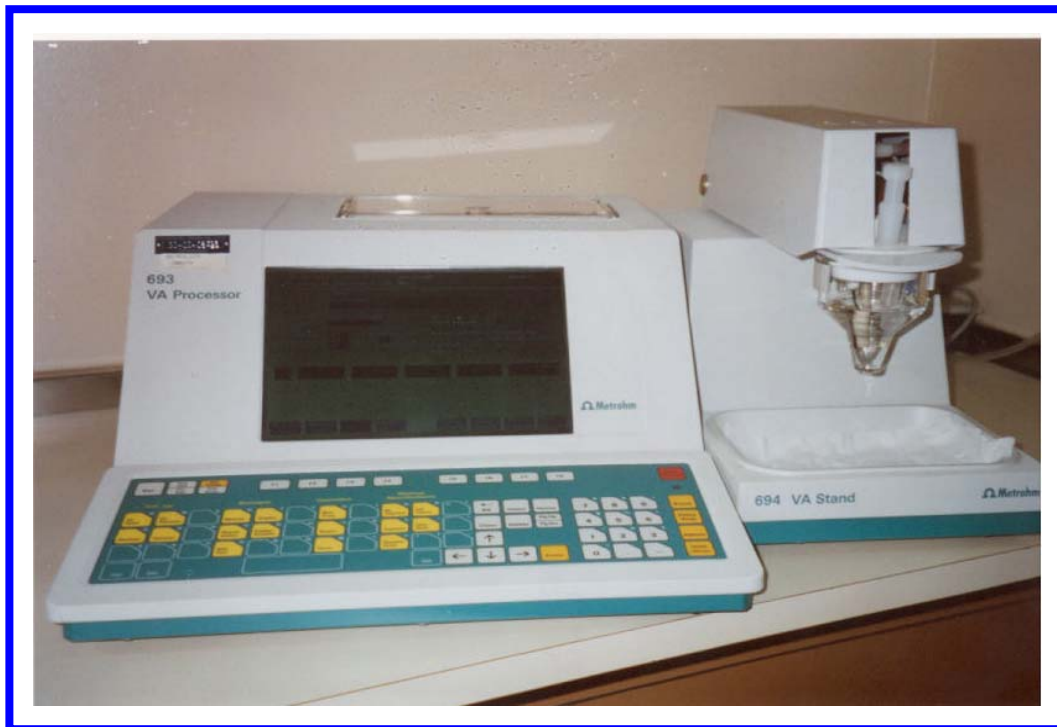


Figura 2: Polarógrafo Metrohm 693 VA Processor



Figura 3: Célula voltamétrica utilizada neste trabalho

5. IMPORTÂNCIA ANALÍTICA DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA (SQR)¹⁸

5.1. Criação do Setor de Substância Química de Referência

Este Setor foi fundado em 1983 no INCQS estando lotado no Departamento de Química e todos os equipamentos foram financiados pela OPAS. Desde então houve estabelecimento de 20 substâncias químicas de referência (SQR) com uma variedade na classe terapêutica.

Em julho de 2000 foi criado um Projeto de Certificação de Material de Referência, parceria do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) com a Comissão de Revisão da Farmacopéia Brasileira (CPRFB) e Laboratório de Produção de Padrões Secundários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) financiado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como objetivo de suprir a demanda nacional de padrões de referência, dando início assim a conquista da auto-suficiência no mercado.

Tem-se a previsão de que até o final 2003 será feito o Estabelecimento de 30 substâncias químicas de referência (SQRFB);

De posse desta matéria-prima é feito um levantamento bibliográfico nos compêndios oficiais para avaliação da substância em estudo, e execução dos métodos analíticos neles descritos para assegurar a identidade e estimar a pureza rastreado a um material de referência certificado internacionalmente.

A produção e a distribuição destas substâncias é tarefa longa e custosa. Para tanto é de fundamental importância a escolha crítica, de quais substâncias deve ser objetos de padronização e sua pureza deve estar próxima a 99.5%, para que o mínimo de impurezas presentes não interfira no doseamento do princípio ativo e nos demais ensaios analíticos selecionados.

Os resultados obtidos são avaliados estatisticamente pela Farmacopéia Brasileira, certificando que esta matéria-prima é uma SQR certificada (SQRFB);

Após a certificação deste material de referência, o Laboratório de SQR efetua o processo de preparação na confecção do informe analítico,

empacotamento, rotulagem, armazenamento, monitoramento periódico e distribuição da SQR certificada.

Posteriormente esta SQR certificada é publicada no Diário Oficial da ANVISA como Resolução para torná-la de uso obrigatório para teste e ensaios de Controle de Qualidade de insumos e especialidades farmacêuticas baseados na comparação da substância a ser analisada frente a material de referência certificado.

As SQR'S além de serem empregadas como termos de comparação nos testes e ensaios oficiais, são também de grande utilidade nos programas de segurança da qualidade nas indústrias, onde são usados testes não oficialmente reconhecidos.

Além disto, as instituições de pesquisa necessitam de padrões de referência certificados para identificação ou para a calibração de métodos.

Desde que se tenha por objetivo a avaliação da pureza de determinada substância com finalidade de distribuí-la como SQR, este composto deve ser submetido a análises rigorosas e minuciosas através da utilização de diversos métodos analíticos.

A demanda de novas substâncias de referência está associada ao aparecimento de substâncias novas que vão sendo oficializadas nas farmacopéias.

5.2. **Conceitos prévios**¹⁹

PADRÃO PRIMÁRIO - Material ou substância que tem uma ou mais propriedades conhecidas e determinadas sendo suficientemente homogêneo para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO (MCR) - Material de referência acompanhado por um certificado contendo um ou mais valores de algumas propriedades, obtidas através de um procedimento que estabelece rastreabilidade à obtenção exata destes valores. Cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.

SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) – É um material de referência, cujas características são comprovadas por comparação a um material de referência certificado. São utilizados em ensaios químicos, físicos, físico-químicos e às vezes biológicos onde uma ou mais propriedades são comparadas à de um produto em análise.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Reagentes/ Materiais

Reagentes

- Matéria-prima Paracetamol de 3 fabricantes (Codificadas como: A, B e C);
- Padrão Acetaminofen USP – Lote J-1(lote corrente);
- Água destilada purificada .

Todos reagentes utilizados neste trabalho foram de grau de pureza analítico (p.a). Dentre estes, merecem ser citados:

- Acetona – **Merck**;
- Ácido Acético p.a – **Merck**;
- Ácido Benzoico (para calibração) – **Fluka**;
- Ácido Bórico p.a – **Merck**;
- Ácido Clorídrico 37% – **Merck**;
- Ácido Fosfórico p.a - **Merck**;
- Ácido Perclórico p.a- **Merck**;
- Anidrido Acético p.a- **Merck**;
- Alumina p.a – **Merck**;
- Cloreto de lítio p.a – **Merck**;
- Cloreto de amônia p.a – **Merck**;
- Clorofórmio p.a – **Merck**;
- Etanol 96% p.a – **Merck**;
- 4- cloroacetanilida – **Fluka**;
- Metanol grau Onnisolv para HPLC - **Merck**;
- Metanol grau para espectrofotometria- **Merck**;
- Tiocianato de Potássio p.a– **Merck**;
- Tolueno – **Merck**;
- Sulfato de sódio p.a– **Merck**;
- Sílica ge azul- **Merck**;

Materiais

- Capilar para ponto de fusão;
- Coluna Octadecilsilano Lichrosorb RP18 – 125 x 4 mm, 5 micras- **Merck**;
- Dessecador com sílica ;
- Eppendorf 1000 μ L calibrada;
- Eletrodo de trabalho – Carbono vítreo – **Metrohm**;
- Eletrodo de referência- Ag/AgCl – **Metrohm**;
- Eletrodo auxiliar- Carbono Vítreo- **Metrohm**;
- Placa de sílica gel F254 – **Merck**;
- Vials de 1 mL;
- Todos balões de 25, 50 e 100 mL e as pipetas de 1, 2, 3, 4, 5 mL volumétricas são calibradas e certificadas- **Pyrex**;

6.2. Soluções

- Soluções padrões e das amostras da matéria-prima paracetamol (três fabricantes codificadas como: A, B e C) foram preparadas como descrito anteriormente para cada metodologia estudada;
- Solução de ácido perclórico 0,1 mol/L recentemente preparada, adiciona-se 8,2 mL ácido perclórico em 900 mL de ácido acético glacial, ao qual posteriormente se junta 32 mL de anidrido acético e avolumando com ácido acético para balão volumétrico de 1000 mL (um dos constituintes do eletrólito de suporte)²⁰ ;
- Solução tampão Britton Robinson; (pH 2,0 a 12) foi preparado através da mistura de soluções 0,1 mol/L formado pelos ácidos acético, bórico e fosfórico, sendo o pH ajustado pela adição de quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio 2 mol/L ²¹ ;
- Soluções de sais de cloreto de lítio, cloreto de amônio, sulfato de sódio e tiocianato de potássio, para o sistema de estabilidade do paracetamol (descrita no parâmetro de especificidade – metodologia de voltametria)²².

6.3. Equipamentos

- As determinações espectrofotométricas foram realizadas em um Espectrofotômetro Ultravioleta e Visível **Hitachi** U2000;
- As determinações cromatográficas foram feitas em um Cromatógrafo Líquido **Waters** acoplado ao detector 2487, registrador 600, injetor automático e carrossel de amostra 717 plus;
- As determinações voltamétricas realizadas em pulso diferencial no Polarógrafo **Metrohm** 693 VA Processor acoplado ao 694 VA Stand, possuindo três eletrodos: um eletrodo de referência (Ag/AgCl, 3 mol/L KCl,) um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um contra eletrodo de carbono vítreo;
- As medidas de pH da solução tampão foram realizadas em um pHmetro B474 da **Micronal** acoplado ao eletrodo de vidro, previamente calibradas;
- Ponto de Fusão FP 5- **Mettler** para realização das amostras de estabilidade;
- Densitômetro CS 930- **Shimadzu** acoplado a lâmpada de deutério para leituras das placas em cromatografia de camada delgada;
- Balança semianalítica AG204- **Mettler** Toledo para realização de todos ensaios.

6.4. METODOLOGIA DE TRABALHO

6.4.1. Voltametria em Pulso diferencial

O método proposto a ser validade é constituído de uma célula eletrolítica acoplada com 3 eletrodos (figura 3): o eletrodo de trabalho- carbono vítreo; o eletrodo de referência- Ag/AgCl (KCl 3mol/L) e o eletrodo auxiliar- carbono vítreo e como eletrólito suporte tem-se a solução na proporção (1:1) de metanol : ácido perclórico 0,1 mol/L .

6.4.1.1. Preparo da curva de calibração e da amostra (matéria-prima)

Preparo da curva de calibração

Após ser retirado o frasco do padrão de Paracetamol USP de lote corrente acondicionado em geladeira (4°C), deixar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por pelo menos 2 horas antes de secá-lo em sílica gel azul.

- a) Ativar a sílica gel azul em estufa a 120 °C por 2 horas, até que se retire toda umidade;
- b) Após deixar esfriar e inseri-la no dessecador pequeno fechado;
- c) Pesar cerca de 100 mg do padrão paracetamol em pesa-filtro pequeno;
- d) Inserir este pesa-filtro aberto no dessecador contendo o padrão e deixá-lo secar por 18 horas;
- e) Passado estas horas pode-se preparar a solução estoque padrão.

Para preparo da solução padrão de paracetamol, pesou-se 25 mg ($\pm 0,0001g$) previamente seco, avolumando com metanol em balão volumétrico de 25 mL obtendo-se uma solução estoque de concentração de $6,61 \times 10^{-3}$ mol/L.

Para o preparo das soluções de trabalho, retiraram-se alíquotas de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 e 7.0 mL da solução estoque sendo transferidas cada alíquota para balões

volumétricos de 50 mL, avolumadas com metanol, obtendo-se soluções de concentrações de $3,96$ a $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L.

Após serem preparadas as soluções de trabalho efetuar a curva de calibração para verificar a linearidade do método proposto à validação.

As concentrações das soluções de trabalho utilizadas seguiram as mesmas concentrações descritas nas metodologias analíticas validadas dos compêndios oficiais.

Preparo das amostras (matérias-primas)

Após retirar os frascos das matérias-primas de paracetamol a serem analisadas, acondicionadas em geladeira (4°C), deixar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por pelo menos 2 horas antes de secá-las em sílica gel azul.

- a) Ativar a sílica gel azul em estufa a 120°C por 2 horas, até que se retire toda umidade;
- b) Após deixar esfriar e inseri-la no dessecador pequeno fechado;
- c) Pesar cerca de 500 mg de cada matéria-prima de paracetamol a ser analisada em pesa-filtros diferenciados;
- d) Inserir estes pesa-filtros abertos em dessecador contendo as matérias-primas e deixá-las secar por 18 horas;
- e) Passado estas horas podem-se preparar as soluções de trabalho das matérias-primas.

Para preparo das soluções das matérias-primas de paracetamol, pesou-se 100 mg ($\pm 0,0001\text{g}$) de cada previamente seca, avolumando-as com metanol em balões volumétricos de 100 mL obtendo-se uma solução estoque de concentração de $6,61 \times 10^{-3}$ mol/L para cada substância estudada.

Para o preparo das soluções de trabalho, retiraram-se alíquotas de 4.0, 5.0 e 6.0mL da solução estoque sendo transferida cada alíquota para balões volumétricos de 50 mL, avolumando-os com metanol, obtendo-se soluções de concentração de $5,29$ a $7,93 \times 10^{-4}$ mol/L .

Estas soluções de trabalho são utilizadas na determinação de todos os parâmetros para a validação deste método.

6.4.1.2. Condições de análise¹⁵

- Preparou-se o eletrólito suporte na proporção de 1:1 de metanol e ácido perclórico 0,1mol/L;
- Transferindo-se 10mL deste eletrólito para célula eletroquímica adicionando 1 mL de cada concentração das soluções-padrões para obtenção da curva de calibração e o mesmo volume para cada concentração das soluções-trabalho das matérias-primas, efetuando leituras em triplicata separadamente para cada concentração das soluções estudadas;
- Após término das análises e de posse dos resultados efetuar os cálculos conforme os parâmetros de validação do método citado.

6.4.2. Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência

Esta metodologia analítica já é validada e encontra-se descrita na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP), sendo recomendada para o doseamento de produtos a base de paracetamol. Preparou-se uma curva de calibração, com cinco pontos na concentração de 3,96 a $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L. E mediante a linearidade do método foi realizado a análise das amostras nas concentrações que variam de $5,29$ a $7,93 \times 10^{-4}$ mol/L.⁶

6.4.2.1. Preparo da curva de calibração e da amostra (matéria-prima)

Preparo da curva de calibração

Após ser retirado o frasco do padrão de Paracetamol USP de lote corrente acondicionado em geladeira (4°C), deixar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por pelo menos 2 horas antes de secá-lo em sílica gel azul.

- a) Ativar a sílica gel azul em estufa a 120°C por 2 horas, até que se retire toda umidade;
- b) Após deixar esfriar e inseri-la no dessecador pequeno fechado;
- c) Pesar cerca de 100 mg do padrão paracetamol em pesa-filtro pequeno;
- d) Inserir este pesa-filtro aberto no dessecador contendo o padrão e deixá-lo secar por 18 horas;
- e) Passado estas horas pode-se preparar a solução estoque padrão.

Para o preparo da solução padrão de paracetamol, pesou-se 25 mg ($\pm 0,0001\text{g}$) previamente seco, avolumando com a fase móvel em balão volumétrico de 25 mL obtendo-se uma solução estoque de concentração de $6,61 \times 10^{-3}$ mol/L.

Para o preparo das soluções de trabalho, retiraram-se alíquotas de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 e 7.0 mL da solução estoque sendo transferidas cada alíquota para balões volumétricos de 50 mL, avolumadas com a fase móvel, obtendo-se soluções de concentrações de 3,96 a $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L.

Após serem preparadas as soluções de trabalho efetuar a curva de calibração para verificar a linearidade do método já validado.

As concentrações das soluções de trabalho utilizadas seguiram as concentrações descritas nesta metodologia analítica validada e descrita no compêndio oficial.

Preparo das amostras (matérias-primas)

Após retirar os frascos das matérias-primas de paracetamol a serem analisadas e acondicionadas em geladeira (4°C), deixar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por pelo menos 2 horas antes de secá-lo em sílica gel azul.

- a) Ativar a sílica gel azul em estufa a 120 °C por 2 horas, até que se retire toda umidade;
- b) Após deixar esfriar e inseri-la no dessecador pequeno fechado;
- c) Pesar cerca de 500 mg da cada matéria-prima paracetamol em pesa-filtro;
- d) Inserir este pesa-filtro aberto no dessecador contendo as matérias-primas e deixá-las secar por 18 horas;
- e) Passado estas horas pode se preparar a soluções de trabalho das matérias-primas.

Para o preparo das soluções das matérias-primas de paracetamol, pesou-se 100 mg ($\pm 0,0001g$) de cada previamente seca, avolumando-as com a fase móvel em balões volumétricos de 25 mL obtendo-se uma solução estoque de concentração de $6,61 \times 10^{-3}$ mol/L.

Para o preparo das soluções de trabalho, retiraram-se alíquotas de 4.0, 5.0 e 6.0 mL da solução estoque sendo transferidas cada alíquota para balões volumétricos de 50 mL, avolumadas com a fase móvel, obtendo-se soluções de concentrações de 5,29 a $7,93 \times 10^{-4}$ mol/L.

As concentrações das soluções de trabalho foram utilizadas para o estudo dos parâmetros de validação – linearidade, exatidão (teor) e precisão.

6.4.2.2. *Condições de análise*⁶

- Fase móvel - metanol e água destilada (3:1);
- Coluna RP18 Lichrosorb – 125 x 4 mm de 5 micras de porosidade;
- Detector UVVIS ajustado para 244 nm.
- Fluxo de 1.0mL/min;
- Volume de Injeção é de 10 μ L;
- Diluente para amostra e padrão é fase móvel.

6.4.3. Espectrofotometria de Ultravioleta e Visível

Esta metodologia analítica já é validada e encontra-se publicada na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP), sendo utilizada para o doseamento da matéria-prima paracetamol. Por ser um método validado, utilizaram-se os parâmetros pré-estabelecidos, como: diluentes, concentrações amostras e padrão e comprimento de onda⁶.

Primeiro foi preparado uma curva de calibração com cinco pontos, envolvendo as concentrações que variavam de 2,64 a 7,93 x10⁻⁵ mol/L, utilizando água destilada - diluente (Curva I)²³.

Uma 2^a curva de calibração foi preparada, utilizando-se o ácido clorídrico (HCl) 0,01mol/L -diluente (Curva II)²⁴.

6.4.3.1. Preparo da curva de calibração e da amostra (matéria-prima)

Preparo da curva de calibração

Após ser retirado o frasco do padrão de Paracetamol USP de lote corrente acondicionado em geladeira (4°C), deixar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por pelo menos 2 horas antes de secá-lo em sílica gel azul.

- a) Ativar a sílica gel azul em estufa a 120 °C por 2 horas, até que se retire toda umidade;
- b) Após deixar esfriar e inseri-la no dessecador pequeno fechado;
- c) Pesar cerca de 100 mg do padrão paracetamol em pesa-filtro pequeno;
- d) Inserir este pesa-filtro aberto no dessecador contendo o padrão e deixá-lo secar por 18 horas;
- e) Passado estas horas pode-se preparar a solução estoque padrão.

Para o preparo da solução padrão de paracetamol, pesou-se 20 mg ($\pm 0,0001\text{g}$) previamente seco, adicionando 1 mL de metanol e avolumando-se com água destilada em balão volumétrico de 100 mL obtendo-se uma solução estoque de concentração de $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

Para o preparo das soluções de trabalho, retiraram-se alíquotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 3.0 mL da solução estoque sendo transferidas cada alíquota para balões volumétricos de 50 mL, avolumadas com água destilada, obtendo-se soluções de concentrações de 2,64 a $7,93 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Preparo das amostras (matérias-primas)

Após retirar os frascos das matérias-primas de paracetamol a serem analisadas, acondicionadas em geladeira (4°C), deixar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por pelo menos 2 horas antes de secá-lo em sílica gel azul.

- a) Ativar a sílica gel azul em estufa a 120°C por 2 horas, até que se retire toda umidade;
- b) Após deixar esfriar e inseri-la no dessecador pequeno fechado;
- c) Pesar cerca de 500 mg da cada matéria-prima paracetamol em pesa-filtro;
- d) Inserir este pesa-filtro aberto no dessecador contendo as matérias-primas e deixá-las secar por 18 horas;
- e) Passado estas horas pode se preparar a soluções de trabalho das matérias-primas.

Para o preparo das soluções das matérias-primas de paracetamol, pesou-se 20 mg ($\pm 0,0001\text{g}$) de cada previamente seca, adicionado 1mL de metanol e avolumando-as com água destilada em balões volumétricos de 100 mL obtendo-se uma solução estoque de concentração de $1,32 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

Para o preparo das soluções de trabalho, retiraram-se alíquotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 3.0 mL da solução estoque sendo transferidas cada alíquota para balões

volumétricos de 50 mL, avolumadas com água destilada, obtendo-se soluções de concentrações de 2,64 a $7,93 \times 10^{-5}$ mol/L.

Para a realização da 2ª curva de calibração, trocou apenas o diluente que para Ácido Clorídrico 0,01 mol/L, procedendo da mesma forma para a preparação das soluções de trabalho tanto para o padrão quanto para as amostras.

As concentrações das soluções de trabalho das amostras foram utilizadas para o estudo no parâmetro de validação – exatidão (teor).

6.4.3.2. Condições de análise

- Determinou-se a absorvância das soluções-padrões e das soluções de trabalho numa célula de quartzo de 1 cm , efetuando-se leituras em triplicata para cada concentração das soluções, sendo que o comprimento máximo é de 244 nm⁶;

Após término das análises e de posse dos resultados foi efetuado o cálculo estipulado para os parâmetros de linearidade e exatidão (teor).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Voltametria em pulso diferencial

7.1.1 *Parâmetros de otimização do método*

Estudo dos eletrólitos e diluente da amostra (matéria-prima)

O estudo eletroquímico do paracetamol foi feito através da técnica voltamétrica utilizando o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (sólido) de carbono vítreo e eletrodo de referência Ag/AgCl no modo RDE (rotatório)¹⁵, devido às características do processo eletródico a ser utilizado.

Inicialmente foi estudada a oxidação do paracetamol em água destilada, utilizando-se como eletrólito suporte à solução tampão de Britton – Robinson na faixa de pH de 2 a 12. Embora a melhor faixa de pH ácido tenha sido entre 4 e 5, a reprodutibilidade obtida neste sistema não foi satisfatória. Sendo assim optou-se por substituir o eletrólito, utilizando a solução- tampão de biftalato de sódio e de ácido acético-acetato²⁴. Não houve melhora na reprodutibilidade e observou-se ainda um alargamento do pico de oxidação.

Posteriormente foi estudado substituído o diluente para metanol, utilizando os três tipos de eletrólito suporte citados anteriormente, obtendo-se também resultados não reprodutíveis.

Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se como eletrólito suporte uma mistura de ácido perclórico e metanol (1:1)¹⁵. Neste caso tem-se o meio ácido (pH em torno de 0,6), que favorece o processo eletroquímico. Os resultados obtidos nestes experimentos são sumarizados na tabela 1.

Tabela 1: Resultados qualitativos dos testes de reprodutibilidade para diferentes meios

ELETRODO DE TRABALHO	DILUENTES	ELETRÓLITO	RESULTADOS
CARBONO	AGUA DESIONIZADA	TAMPÃO BRITTON - ROBINSON	NÃO REPRODUTÍVEIS
CARBONO	AGUA DESIONIZADA	TAMPÃO BIFITALATO DE SÓDIO (ajustar com NaOH 0.2 M)	NÃO REPRODUTÍVEIS
CARBONO	AGUA DESIONIZADA	TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO (2M) E ÁCIDO ACÉTICO (2 M)	NÃO REPRODUTÍVEIS
CARBONO	METANOL	TAMPÃO BRITTON - ROBINSON	NÃO REPRODUTÍVEIS
CARBONO	METANOL	TAMPÃO BIFITALATO DE SÓDIO (ajustar com NaOH 0.2 M)	NÃO REPRODUTÍVEIS
CARBONO	METANOL	TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO (2M) E ÁCIDO ACÉTICO (2 M)	NÃO REPRODUTÍVEIS
CARBONO	METANOL	ÁCIDO PERCLÓRICO METANOL (1:1)	REPRODUTÍVEIS

Estudo da amplitude de pulso

Depois de escolhidos o eletrólito suporte e o diluente da amostra, foi feito o estudo da amplitude de pulso. Foram testados quatro valores de amplitude de pulso: -25 mV, -50 mV, -75 mV e -100 mV. Como é mostrado na tabela 2, apesar do aumento da corrente de oxidação, houve também um aumento significativo da largura do pico, que poderia influenciar nas análises futuras. Deste modo foi escolhida para a análise do paracetamol a amplitude de pulso de -50 mV, normalmente utilizado para remoção de 2 elétrons¹⁷.

Tabela 2 :Resultados dos testes da amplitude de pulso e suas respectivas correntes obtidas a partir de uma solução de paracetamol $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L.

AMPLITUDE DE PULSO	CORRENTE (-nA)	POTENCIAL (mV)	LARGURA DO PICO (mV)
-25 mV	311	792	75
-50 mV	462	782	80
-75 mV	494	780	90
-100 mV	518	786	95

Estudo da velocidade de agitação

Depois de escolhidos o eletrólito suporte, diluente da amostra e amplitude de pulso. Foram testados três valores para velocidade de agitação: 200 rpm, 400 rpm e 600 rpm, obtendo-se os mesmos valores para o potencial de oxidação da substância paracetamol. Deste modo foi escolhido a velocidade de 200 rpm.

Estudo da velocidade de varredura

A velocidade de varredura é um parâmetro auxiliar do software do equipamento e está relacionado com o tempo de pulso (t. step) em segundos. Foram testados três valores para velocidade de varredura: 15mV/s, 30mV/s e 60mV/s, e obteve-se um alargamento do pico proporcional ao aumento da velocidade, como é mostrado na tabela 3. Deste modo foi escolhido a velocidade de varredura de 15 mV/s.

Tabela 3 :Resultados dos testes da velocidade de varredura e suas respectivas larguras de pico obtidas a partir de uma solução de paracetamol $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L.

VELOCIDADE DE VARREDURA	TEMPO DE PULSO (s)	POTENCIAL (mV)	LARGURA DO PICO (mV)
15 mV/s	0.40	780	80
30 mV/s	0.20	788	140
60 mV/s	0.10	799	150

Estudo do tempo de purga

Foram testados três tempos de purga: 10s, 20s e 30s; não houve diferença nos resultados obtidos, optando-se para trabalhar com o tempo de purga de 20 segundos.

As condições apresentadas na Tabela 4 foram otimizadas e utilizadas no estudo da substância paracetamol para validação do método de voltametria em pulso diferencial, depois do estudo de todos parâmetros mencionados.

Tabela 4: Condições utilizadas nos estudos da determinação voltamétrica do paracetamol.

ELETRODO DE TRABALHO	Carbono vítreo
ELETRODO DE REFERÊNCIA	Ag/AgCl (KCl- 3 mol/L)
ELETRODO AUXILIAR	Carbono Vítreo
ELETRÓLITO	Ácido Perclórico 0.1 mol/L: Metanol (1:1)
VOLUME DO ELETRÓLITO	10 mL
SOLVENTE PARA AMOSTRA	Metanol
POTENCIAL PICO DO PARACETAMOL	780 mV
POTENCIAL INICIAL	600 mV
POTENCIAL FINAL	1200mV
TEMPO DE PURGA	20s
VELOCIDADE DE AGITAÇÃO	200 rpm
AMPLITUDE	-50mV
VELOCIDADE DE VARREDURA	15mV/s

7.1.2 Parâmetros de validação do método

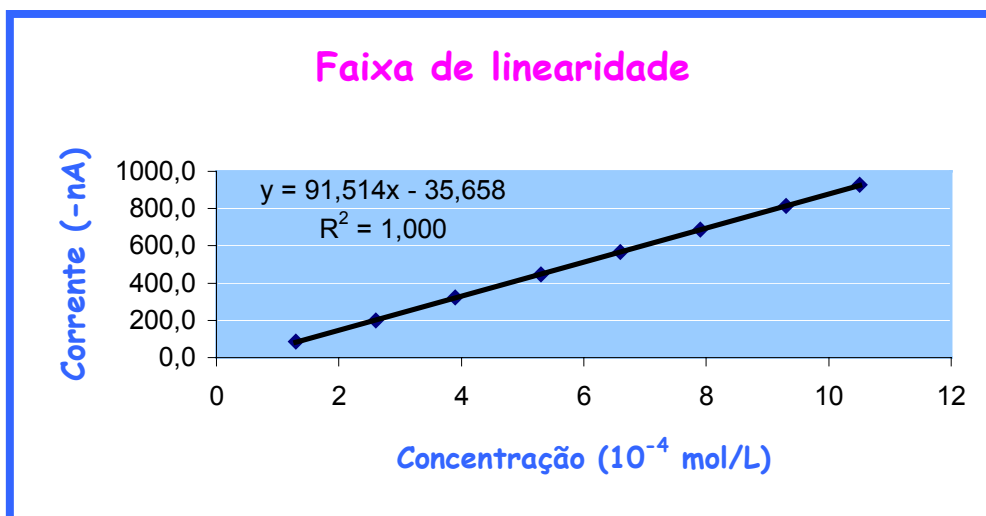
7.1.2.1 Faixa de linearidade⁹

A análise para determinação da faixa de linearidade do método, foi realizada utilizando-se 10 mL de eletrólito suporte (metanol e ácido Perclórico 1:1) na célula eletrolítica, adicionando-se volumes de 0,2 mL, da solução estoque padrão de concentração $6,61 \times 10^{-3}$ mol/L, para cada ponto do gráfico iniciando na concentração de $1,32 \times 10^{-4}$ a $14,54 \times 10^{-4}$ mol/L , leituras em triplicata, conforme tabela 5.

Tabela 5: Estudo da faixa de linearidade do método voltamétrico para determinação de paracetamol em metanol : ácido perclórico

Concentração (10^{-4} mol/L)	Corrente Média (-nA)
1,32	85,7
2,64	200,9
3,96	322,5
5,29	447,1
6,61	566,1
7,93	687,5
9,25	816,1
10,58	926,6
11,90	959,9
13,22	1030,0
14,54	1150,0

Figura 4: Estudo da faixa de linearidade do método voltamétrico para determinação do paracetamol no eletrólito suporte de metanol : ácido perclórico



Uma melhor correlação foi obtida restringindo-se a faixa de trabalho para o intervalo de $1,32 \times 10^{-4}$ a $10,58 \times 10^{-4}$ mol/L, como pode ser observado na figura 4, obtém-se um comportamento linear, possuindo um coeficiente de correlação linear de 1.

Tendo determinado a faixa linear do método, selecionam-se as concentrações para análise da curva de calibração, destacando-se o primeiro parâmetro para validação do método- LINEARIDADE.

7.1.2.2. Linearidade^{10,11}

Este parâmetro é verificado mediante a confecção da curva de calibração, que foi obtida, através do uso de uma solução padrão de Paracetamol – USP lote corrente, de concentração $6,61 \times 10^{-3}$ mol/L, as determinações foram feitas em triplicata; após realizar uma diluição de uma alíquota de 5 mL da solução padrão para balão de 50 mL, origina concentração de $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L (solução estoque).

E as soluções de trabalho foram preparadas conforme descrito na metodologia de trabalho.

A curva analítica foi feita mediante adição padrão das soluções de trabalho, adicionando uma alíquota de cada vez, de cada uma das cinco diluições diferentes determinando assim o coeficiente de correlação linear da curva, desvio padrão, desvio padrão relativo, variância e resíduos de cada ponto da curva conforme tabelas 6, 7 e 8 ; e no anexo I apresenta-se o voltamograma da curva analítica.

Tabela 6: Primeira curva de calibração obtida para determinação de paracetamol por voltametria de pulso diferencial;

Concentração (10^{-4} mol/L)	Corrente				SD	SDR(%)	S ²
	Corrente 1 (-nA)	Corrente 2 (-nA)	Corrente 3 (-nA)	Média (-nA)			
3,96	227,7	228,2	227,8	227,9	0,26	0,11	0,07
5,29	346,8	346,7	347,3	346,9	0,32	0,09	0,10
6,61	452,5	452,9	452,4	452,6	0,26	0,06	0,07
7,93	558,7	558,4	558,9	558,7	0,25	0,04	0,06
9,25	662,1	662,0	662,4	662,2	0,21	0,03	0,04

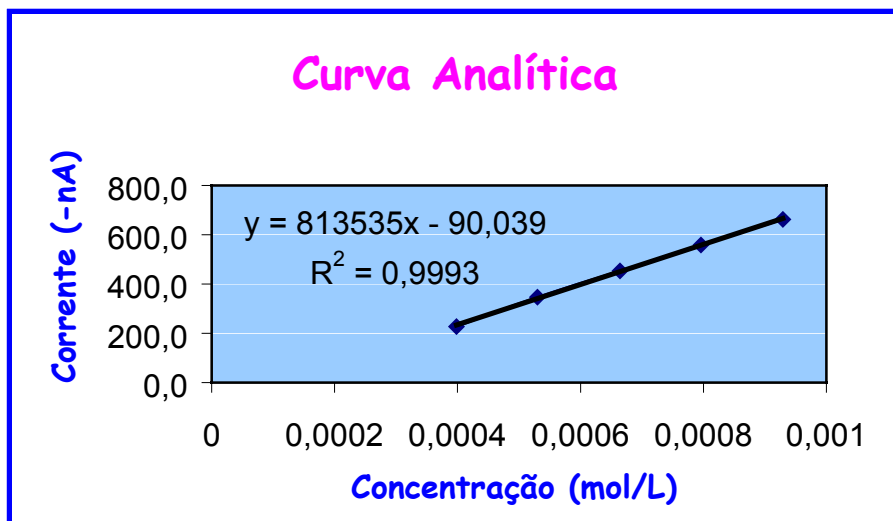
Tabela 7: Segunda curva de calibração obtida para determinação de paracetamol por voltametria de pulso diferencial;

Concentração (10 ⁻⁴ mol/L)	Corrente			Média (-nA)	SD	SDR (%)	S ²
	Corrente 1 (-nA)	Corrente 2 (-nA)	Corrente 3 (-nA)				
3,96	245,1	245,6	245,6	245,1	0,3	0,12	0,09
5,29	353,9	354,3	353,6	353,9	0,4	0,10	0,16
6,61	480,0	480,3	478,6	479,6	0,9	0,19	0,81
7,93	595,6	595,9	596,0	595,8	0,2	0,03	0,04
9,25	710,4	709,2	710,4	709,8	0,7	0,10	0,49

Tabela 8: Terceira curva de calibração obtida para determinação de paracetamol por voltametria de pulso diferencial;

Concentração (10 ⁻⁴ mol/L)	Corrente			Média (-nA)	SD	SDR (%)	S ²
	Corrente 1 (-nA)	Corrente 2 (-nA)	Corrente 3 (-nA)				
3,96	222,0	221,6	221,9	221,8	0,2	0,09	0,04
5,29	343,1	343,0	342,7	342,9	0,2	0,05	0,04
6,61	470,9	470,3	470,9	470,7	0,3	0,06	0,12
7,93	594,4	594,0	593,6	594,0	0,4	0,07	0,16
9,25	704,3	703,7	704,4	704,1	0,4	0,06	0,14

Figura 5: Primeira curva de calibração obtida para determinação de paracetamol por voltametria de pulso diferencial;



As curvas mostram um comportamento linear e as equações foram:

Primeira Curva : $y=813535x -90.039$; $R^2= 0.9993$

Segunda Curva: $y=882029x -108.3$; $R^2= 0.9997$

Terceira Curva: $y=915445x -140.61$; $R^2= 0.9994$

Estas variações podem ser consideradas normais, uma vez que pode haver pequenas modificações da área disponível para a reação eletrolítica na superfície do eletrodo de trabalho, que não é rigorosamente restaurada na limpeza com alumina e água deionizada.

Para verificar se algum ponto de concentração desvia da linearidade da curva, calcula-se o $t_{\text{calculado}}$ mediante a diferença dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados¹², conforme equação 3.1b.

1ª curva de calibração

$t_{\text{calculado}}=2,62$

2ª curva de calibração

$t_{\text{calculado}}=2,02$

3ª curva de calibração

$$t_{\text{calculado}} = \mathbf{2,74}$$

Observa-se que este método pode ser considerado livre de tendências, pois os cálculos do desvio dos resíduos plotados versus a concentração no gráfico, apresentaram randomicamente uma distribuição normal no eixo zero, e também quando comparados com o $t_{\text{tabelado}} (n=2) = 4,303$ (unilateral para $n-1$ graus de liberdade), possuem valor $t_{\text{calculado}}$ menor.

E para verificar se o método é homo ou heterocedástico, calculam-se os resultados das variâncias obtidas nas três curvas, através do Teste de Cochran:

1ª curva de calibração

$$C_{\text{calculado}} = S^2_{\text{maior}} / \Sigma S^2$$

$$C_{\text{calculado}} = 0,1/0,34 = \mathbf{0,29}$$

2ª curva de calibração

$$C_{\text{calculado}} = 0,81/1,59 = \mathbf{0,51}$$

3ª curva de calibração

$$C_{\text{calculado}} = 0,16/0,52 = \mathbf{0,31}$$

O $C_{\text{calculado}}$ das três curvas tem valor menor que o $C_{\text{tabelado}} (n=4) = 0,686$ ($V=n-1$ - graus de liberdade para $\alpha=0,05$), indicando-se que a concentração da amostra apresenta-se em condição uniforme de variância, e que o método é **homocedástico**^{10,11}.

7.1.2.3. Seletividade / Especificidade ^{9,10}

Seletividade

A determinação da seletividade foi efetuada através das medidas de correntes realizadas a partir de soluções da mesma concentração da amostra e do padrão de referência do paracetamol e comparando-se os resultados das variâncias (S^2), através do teste F conforme equação 3.2.

Grupo 1: Matéria-Prima

Tabela 9: Valores de corrente, de potencial pico e da variância obtidos a partir de solução da matéria- prima de paracetamol de concentração $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L.

Leitura	Potencial (mV)	Corrente 1 (-nA)	S_1	S^2_1
1	795	445,5		
2	794	443,5		
3	794	440,8	1,9	3,6
4	794	442,5		
5	795	444,6		
6	796	441,0		
7	795	444,8		
Média	795	443,2		

Grupo 2: Material de Referência (padrão)

Tabela 10: Valores de corrente, de potencial pico e da variância obtidos a partir de solução padrão de paracetamol de concentração $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L.

Leitura	Potencial (mV)	Corrente 1 (-nA)	S_2	S_2^2
1	790	446,3		
2	791	443,0		
3	793	439,8	2,1	4,5
4	794	440,8		
5	792	441,8		
6	793	442,6		
7	794	443,7		
Média	792	442,6		

Através dos valores das variâncias calculados, obteve-se o valor $F_{\text{calculado}} = 3,6 / 4,5 = \mathbf{0,82}$ que é menor que o $F_{\text{tabelado}} = 6,6$ (n-1 graus de liberdade), indicando que o método é **seletivo**^{9,10}.

Esta seletividade do método é apenas para estes parâmetros e condições de análises citadas anteriormente, indicando que o método detecta apenas o potencial pico de oxidação da substância paracetamol.

Especificidade²²

Como não existe registro de substâncias relacionadas ao paracetamol, este foi exposto a condições diversificadas de umidades relativas obtidas por acondicionamento de sais específicos saturados em dessecadores, como:

- Umidade Relativa de 19% (UR) – Cloreto de Lítio Monohidratado (1g/1.3mL);
- Umidade Relativa de 48% (UR) - Tiocianato de Potássio (1g/0.5mL);
- Umidade Relativa de 87% (UR) - Cloreto de amônio (1g/3mL);
- Umidade Relativa de 99% (UR) - Sulfato de Sódio (1g/10mL).

Uma amostra de 300 mg de paracetamol de cada fabricante foi estocada em cada um dos dessecadores com umidade relativa mencionada, determinando-se a perda ou ganho de água, semanalmente durante 2 meses. Após este período, realizou-se teste de aspecto, ponto de fusão e análise por cromatografia de camada fina ou delgada (CCD).

A técnica utilizada para certificar que a substância paracetamol, não possui nenhuma degradação, foi a CCD e a figura segue no anexo II.

➤ Aspecto

Comparação visual de uma quantidade de amostra a ser examinada contra uma quantidade de amostra padrão (amostra com acondicionamento normal).

➤ Ponto de Fusão

Calibração do equipamento com ácido benzóico e posterior análise das amostras de cada fabricante. Se a substância permanece íntegra, fundirá na faixa estipulada 168-172°C.

➤ Condições utilizadas em Cromatografia de camada delgada ou fina (CCD)²⁵

Fase móvel: Clorofórmio:Acetona: Tolueno (65:25:10)

Fase estacionária: Sílica gel F254 com fluorescência

Diluyente: Metanol

Concentração das amostras: 100 mg/10 mL e 10 mg/10 mL

Concentração do padrão: 10 mg/10 mL

Concentração da solução 4-cloroacetanilida: 25 mg/ 50 mL em etanol

Volume spotado: 5 a 10 µL

Concentração do spot na placa: 0.1 a 100 µg

Limite de detecção: 0.1 µg em $\lambda = 244\text{nm}$

Lâmpada UV-VIS: 254 nm

Tabela 11: Resultados obtidos nos testes de estabilidade do paracetamol dos três fabricantes

UMIDADE		PONTO DE			
RELATIVA	PERDA DE	GANHO DE	ASPECTO	FUSÃO	CCD
(UR %)	PESO (%)	PESO (%)		(168-172 ^o C)	
UR 19%	-----	0,04	OK	170,1	NID
UR 48%	-----	0,03	OK	170,1	NID
UR 87%	-----	0,01	OK	170,1	NID
UR 99%	-----	0,03	OK	170,1	NID

NID- nenhuma impureza detectada

A análise dos resultados obtidos na tabela 11, demonstra que a substância permanece com as mesmas propriedades físico-químicas de origem, o percentual resultante do ganho de peso é a faixa de variação da balança estando dentro do estipulado, e a análise em CCD (anexo II) certifica-se a **não detecção de nenhuma impureza** ou possível produto de degradação que perturbe o sinal do analito – paracetamol.

7.1.2.4 Exatidão – Teor das matérias-primas

É o grau de concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como referência. Para o cálculo do teor, foi utilizada a equação da reta $y=813535x - 90.039$.

Estes cálculos foram realizados para os três fabricantes (codificados como A, B e C), e os resultados são demonstrados na tabela 12, utilizando-se uma concentração da solução paracetamol de trabalho de $6,67 \times 10^{-4}$ mol/L; os voltamogramas de cada fabricante estão nos anexos III, IV e V.

Tabela 12: Determinação do teor das matérias-primas (fabricante A, B e C)

Concentração (10^{-4} mol/L)	Potencial (mV)	Corrente Concentração		Teor (%)
		Média (-nA)	obtida (Curva)	
6,67	776	452,4	6,667	99,95
6,67	775	452,2	6,665	99,91
6,67	777	452,0	6,662	99,87

Desvio padrão para correntes médias = 0,17, $t_{(n=8)} = 2,306$

Resultado= (99,9 ± 0,13)% -fabricante A

Resultado= (99,9 ± 0,13)% -fabricante B

Resultado= (99,9 ± 0,13)% -fabricante C

Mediante análise dos resultados, observa-se que o teor de cada matéria-prima estudada, está dentro da faixa de restrição de aceitabilidade estipulada pelo compêndio oficial (98 a 101%)⁶.

Par verificar que o método é exato efetua-se a comparação dos resultados obtidos e os encontrados no Estudo Interlaboratorial através do método espectrofotométrico dos fabricantes estudados neste trabalho.

Fabricante A – 99,61 ± 0,77

Fabricante B – 99,79 ± 0,57

7.1.2.5. Limite de Detecção^{9,10}

O cálculo do limite de detecção é feito com equação 3.4 e os valores obtidos das correntes é demonstrado na tabela abaixo e o voltamograma do eletrólito suporte consta no anexo VI e o do limite de detecção consta no anexo VII:

Tabela 13: Determinação do limite de detecção do método voltamétrico de uma solução de padrão de referência do paracetamol

Leituras	Potencial (mv)	Corrente (-nA)	SD	S ²
1	788	6,23		
2	783	6,59		
3	785	6,84	0,22	0,05
4	784	6,65		
5	786	6,70		
6	785	6,83		
7	784	6,45		
Média	785	6,61		

LDM $t_{\text{tabelado (6)}} = 3,143$ (t de student)

LDM = $3,143 \times 0,22 = 0,691$

Devido aos resultados obtidos , o limite de detecção foi calculado aplicando-se a equação da reta **$y = 813535x - 90,039$** de acordo com a abordagem baseada na teoria de regressão , obtendo-se para método voltamétrico uma concentração **$8,5 \times 10^{-7}$ mol/L.**

7.1.2.6. Limite de Quantificação ^{9,10}

O cálculo do limite de detecção é conforme a equação 3.5, levando em consideração o valor do desvio padrão calculado no limite de detecção. O voltamograma deste limite consta no anexo VIII:

$$LQ = 10 \times 0,22 = 2,22$$

$$LQ = 2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$$

Aplicando-se a equação da reta $y = 813535x - 90,039$, obtém-se o limite de quantificação do método na concentração de $2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$, que significa dizer que este valor obtido pode ser o primeiro ponto da curva e/ ou o início da faixa de trabalho. Conforme cálculo obtido a concentração do limite de detecção é 10 vezes menor que a concentração obtida para o limite de quantificação .

Estando comprovado que este método pode quantificar concentrações pequenas de resíduos de paracetamol em insumos e produtos farmacêuticos.

E como objetivo desta validação é efetuar a comparação entre os dois métodos validados de espectrofotometria e cromatografia em fase líquida, optou-se por trabalhar em concentrações de 10^{-4} mol/L conforme referenciado pelo compêndio oficial.

7.1.2.7. Precisão ^{26,27}

Este parâmetro é dividido em 3 partes : Repetitividade e Precisão Intermediária .

Repetitividade - Este parâmetro foi avaliado analisando-se as três matérias-primas em três dias diferentes, com três concentrações 5,29 a 7,93 x 10⁻⁴ mol/L (soluções de trabalho), utilizou-se à equação 3.6a para verificar o limite de repetitividade.

Tabela 14: Estudo do parâmetro de repetitividade do método voltamétrico (fabricante A)

Concentração (10 ⁻⁴ mol/L)	Potencial (mV)	Corrente Média (-nA)	SD	r
		316,1	0,3	0,8
5,29	782	299,4	0,3	0,9
		293,7	0,4	1,0
		437,5	0,5	1,3
6,61	781	433,3	0,3	0,7
		429,6	0,6	1,7
		604,9	0,6	1,7
7,93	780	576,5	0,3	0,9
		570,8	0,5	1,4

Conforme os resultados demonstrados na tabela, verifica-se que os três dias de análise obtiveram-se o valor de $r_{\text{calculado}}$ para todas concentrações dos fabricantes estudados menor que o $r_{\text{tabelado}} = 2,8$ (n=2), desta forma pode-se dizer que o método tem uma **repetitividade aceitável** e os valores obtidos estão dentro da faixa de restrição de aceitabilidade da matéria-prima estipulada pelo compêndio oficial (98 a 101%)⁶ .

Precisão Intermediária^{26,27}

Para avaliar este parâmetro foram analisadas as três matérias-primas, em dias e analistas diferentes, a concentração da solução de trabalho foi de $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L, e após calculou-se o desvio padrão da precisão intermediária conforme equação 3.6b.

Fabricante: A

Tabela 15: Estudo do parâmetro de precisão intermediária do método voltamétrico (fabricante A)

AMOSTRA	CORRENTE (-nA)				CORRENTE MÉDIA (-nA)	SD
	1	2	3	4		
1	331,0	332,0	331,9	331,6	331,6	0,45
2	328,4	329,8	330,1	331,2	330,4	0,74
3	315,6	315,9	315,7	316,1	315,8	0,22
4	309,6	309,7	308,9	309,4	309,4	0,36
5	298,9	299,7	299,8	298,9	299,3	0,49

Fabricante: B

Tabela 16: Estudo do parâmetro de precisão intermediária do método voltamétrico (fabricante B)

AMOSTRA	CORRENTE (-nA)				CORRENTE MÉDIA (-nA)	SD
	1	2	3	4		
1	286,8	288,1	286,3	285,7	286,7	1,0
2	273,5	275,0	276,3	275,3	275,0	1,2
3	258,8	258,6	259,2	260,7	259,3	0,9
4	257,2	257,5	256,5	256,5	256,9	0,5
5	251,3	251,9	252,4	249,2	251,2	1,4

Fabricante: C

Tabela 17: Estudo do parâmetro de precisão intermediária do método voltamétrico (fabricante C)

AMOSTRA	CORRENTE (-nA)				CORRENTE MÉDIA (-nA)	SD
	1	2	3	4		
1	265,4	264,9	265,3	265,8	265,4	0,4
2	255,0	255,5	255,9	254,8	255,3	0,5
3	243,9	244,6	244,3	243,8	244,2	0,4
4	233,5	234,3	235,7	234,9	234,6	0,9
5	229,2	230,8	231,8	232,5	231,1	1,4

Conforme os resultados obtidos nas tabelas 15, 16 e 17 observa-se que os desvios padrão de precisão intermediária de todos os fabricantes são **significativamente iguais**, comprovado pelo teste t, com variação de analista e dias na execução dos ensaios, mediante valores abaixo:

Fabricante A

1º Analista

Si = **0,53**

2º Analista

Si = **0,50**

Fabricante B

1º Analista

Si = **1,11**

2º Analista

Si = **0,97**

Fabricante C

1º Analista

Si = **0,81**

2º Analista

Si = **0,90**

Conclui-se que este método pode ser realizado em matérias-primas de diferentes fabricantes por vários analistas em dias alternados, obtendo-se resultados de correntes pico de oxidação do paracetamol dentro do valor estipulado e sem variação significativa.

7.1.3. Variação de potencial

As leituras das amostras, foram feitas em duplicata, do fabricante A na concentração de $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L (solução estoque) e utilizando o eletrólito suporte tampão de Britton- Robinson; foi realizado adicionando 1 mL da solução estoque na célula eletrolítica contendo 10 mL do eletrólito para cada faixa de pH (2 a 12), conforme tabela 18, obteve-se os seguintes resultados:

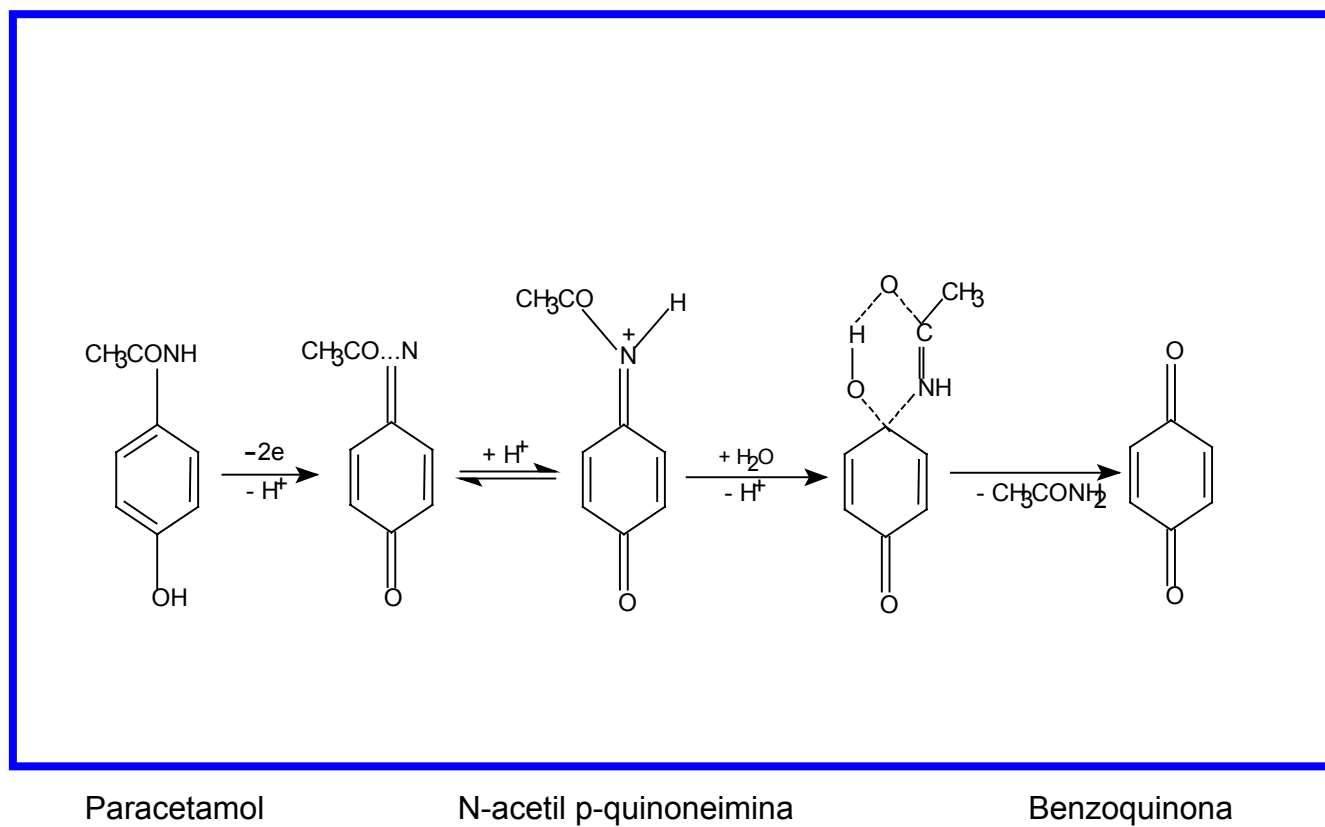
Tabela 18: Resultados obtidos para o potencial de pico versus pH na solução de paracetamol na concentração $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L

pH	Potencial		
	Potencial 1 (mV)	Potencial 2 (mv)	(Média) (mV)
2	715	713	714,0
3	662	657	659,5
4	636	637	636,5
5	603	591	597,0
6	536	539	537,5
7	541	549	545,0
8	510	519	514,5
9	414	408	411,0
10	323	326	324,5
11	312	320	316,0
12	304	310	307,0

O pH do eletrólito suporte também afeta o potencial do pico de oxidação do paracetamol. Na faixa de pH de 2 a 6, observa-se um deslocamento anódico do potencial de pico com aumento do pH através de uma relação linear, indicando a participação de prótons no processo eletroquímico, conforme a equação da reta $y=41,55x +795,1$, obtida pelos resultados da tabela 18, observa-se que a faixa de pH que dá uma maior estabilidade no paracetamol é a faixa ácida.

Os estudos por voltametria em pulso diferencial mostram que o mecanismo eletroquímico, sendo um processo irreversível e envolvem a participação de **2 elétrons** e **2 prótons**, conforme comprovados pelos resultados obtidos e referenciado por Miner na figura abaixo⁷:

Figura 6: Reação de oxidação do paracetamol originando benzoquinona⁷



7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

7.2.1. Parâmetros de validação do método

7.2.1.1. Linearidade^{9,10}

Este parâmetro é verificado mediante a confecção da curva de calibração, através da preparação de uma solução padrão Paracetamol – USP lote corrente de concentração 6.61×10^{-3} mol/L em triplicata, efetua-se diluições para as soluções de trabalho, conforme descrito na parte experimental; e conforme as tabelas 19, 20 e 21 determina-se o desvio padrão, desvio padrão relativo, variância e o coeficiente de correlação linear de cada curva.

Curva analítica I:

Tabela 19: Primeira da curva de calibração para determinação de paracetamol por clae.

CONCENTRAÇÃO (10^{-4} mol/L)	ÁREA MÉDIA (X)	SD	SDR(%)	S ²
3,96	2506694,819	4544,4	0,2	0,04
5,29	3298759,199	9327,9	0,3	0,09
6,61	4203355,386	5779,8	0,1	0,01
7,93	5020413,056	4465,9	0,1	0,01
9,25	5870427,538	10711,5	0,2	0,04

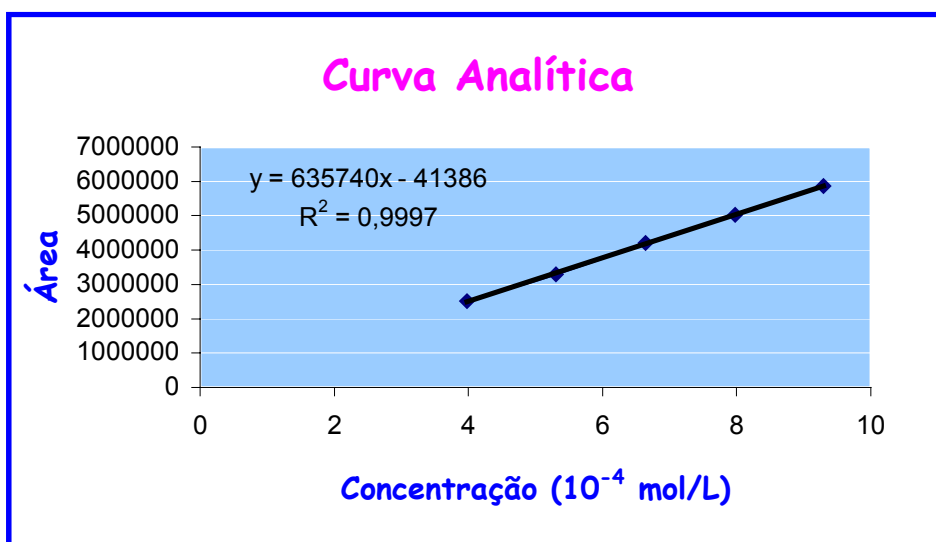
Curva analítica II**Tabela 20: Segunda curva de calibração para determinação de paracetamol por clae.**

CONCENTRAÇÃO (10⁻⁴ mol/L)	ÁREA MÉDIA (X)	SD	SDR(%)	S²
3,96	2429652,456	4862,9	0,2	0,04
5,29	3208663,803	4550,3	0,1	0,01
6,61	4105077,532	18731,8	0,4	0,16
7,93	4964576,466	7911,7	0,2	0,04
9,25	5806298,33	27499,5	0,5	0,25

Curva analítica III**Tabela 21: Terceira curva de calibração para determinação de paracetamol por clae.**

CONCENTRAÇÃO (10⁻⁴ mol/L)	ÁREA MÉDIA (4)	SD	SDR(%)	S²
3,96	2480044,356	4628,1	0,2	0,04
5,29	3305125,584	4454,3	0,1	0,01
6,61	4217299,871	6105,7	0,1	0,01
7,93	5044859,534	10008,3	0,2	0,04
9,25	5852552,624	12001,1	0,2	0,04

Figura 7: Primeira curva de calibração obtida para determinação de paracetamol por clae;



As curvas mostram um comportamento linear e as equações foram:

Primeira Curva : $y=635740x - 41386$; $R^2= 0.9997$

Segunda Curva: $y=640270x - 148536$; $R^2= 0.9996$

Terceira Curva: $y=638447x - 59314$; $R^2= 0.9996$

Observa-se que este método pode ser considerado livre de tendências, pois os cálculos do desvio dos resíduos plotados *versus* a concentração no gráfico apresentaram randomicamente uma distribuição normal no eixo zero, no qual o valor do $t_{\text{calculado}}=2.92$ é menor ¹², que o $t_{\text{tabelado}}(n=2)=4,303$ (unilateral para $v=n-1$ graus de liberdade).

Para verificar se o método é homo ou heterocedástico, calcularam-se os resultados das variâncias obtidas nas três curvas, através do Teste de Cochran.

1ª Curva analítica

$$C_{\text{calculado}} = S^2_{\text{maior}} / \Sigma S^2$$

$$C_{\text{calculado}} = 0,09 / 0,17 = \mathbf{0,47}$$

2ª Curva analítica $C_{\text{calculado}} = \mathbf{0,59}$ 3ª Curva analítica $C_{\text{calculado}} = \mathbf{0,28}$

O $C_{\text{calculado}}$ é menor que o $C_{\text{tabelado}, n=4} = 0,686$ ($V=n-1$ - graus de liberdade para $\alpha=0,05$), indica que a concentração da amostra apresenta-se em condição uniforme de variância, e que o método é **homocedástico**.

7.2.1.2. Exatidão- Teor das matérias-primas

É o grau de concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como referência. Para o cálculo da taxa de recuperação, foi utilizada a equação da reta $y=635740x -41386$.

Estes cálculos foram realizados para os três fabricantes (codificados como A, B e C), e os resultados são demonstrados nas tabelas 22, utilizando uma concentração da solução de trabalho do paracetamol de $7,97 \times 10^{-4}$ mol/L.

Os cromatogramas do fabricante A e do padrão seguem nos anexo IX e X.

Tabela 22: Determinação do teor das matérias-primas (fabricante A, B e C)

Concentração (10^{-4} mol/L)	Concentração		Teor (%)
	Área Média	Obtida (Curva)	
7,97	5032820,368	8,05	100,3
7,97	5030413,489	8,04	100,2
7,97	5025806,236	8,03	100,1

Desvio padrão para correntes médias = 0.1, $t_{(n=9)} = 2,306$

Resultado= (100,3 ± 0.08)% - fabricante A

Resultado= (100,2 ± 0.08)% - fabricante B

Resultado= (100,1 ± 0.08)% - fabricante C

Mediante análise dos resultados, observa-se que o teor de cada matéria-prima estudada está dentro da faixa de restrição de aceitabilidade estipulada pelo compêndio oficial (98 a 101%)⁶.

Para verificar que o método é exato efetua-se a comparação dos resultados obtidos e os encontrados no Estudo Interlaboratorial através do método espectrofotométrico dos fabricantes estudados neste trabalho.

Fabricante A – 99,61 ± 0,77

Fabricante B – 99,79 ± 0,57

7.2.1.3. Limite de Detecção

O cálculo do limite de detecção é realizado empregando-se a equação 3.4 e os valores obtidos das áreas são apresentados na tabela abaixo e o cromatograma deste limite consta no anexo XI:

Tabela 23: Determinação do limite de detecção do método clae de uma solução do padrão de referência de paracetamol

Leituras	Tempo de Retenção	Área	SD	S ²
1	1,986	157		
2	1,984	174		
3	1,999	114		
4	1,978	130	23,6	557
5	1,992	136		
Média	1,988	142		

$$\text{LDM } t_{\text{tabelado (6)}} = 3,143 \text{ (t de student)}$$

$$\text{LDM} = 3,143 \times 23,6 = 77,88$$

Devido aos resultados obtidos , o limite de detecção foi calculado aplicando-se a equação da reta $y = 635740x - 41386$ de acordo com a abordagem baseada na teoria de regressão , obtendo-se para método voltamétrico uma concentração $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

7.2.1.4. Limite de Quantificação

O cálculo do limite de quantificação é conforme a equação 3.5, levando em consideração o valor do desvio padrão calculado no limite de detecção. Segue no anexo XII cromatograma do paracetamol para o limite de quantificação.

$$\text{LQM} = 10 \times 23,6 = 236$$

$$\text{LQM} = \mathbf{3,7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}}$$

Aplicando-se a equação da reta $y = 81,296x - 90,145$, obtém-se o limite de quantificação do método na concentração de $3,7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, que significa dizer que este valor obtido pode ser o primeiro ponto da curva e/ ou o primeiro da faixa de trabalho.

E como objetivo desta validação é efetuar a comparação entre os dois métodos validados de espectrofotometria e este de cromatografia em fase líquida, optou-se por trabalhar em concentrações de 10^{-4} mol/L conforme referenciado pelo compêndio oficial.

7.2.1.5. Precisão

Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados sob as mesmas condições operacionais durante um curto intervalo de tempo utilizando-se o mesmo procedimento analítico observador, instrumento de medição e local de análise. O preparo das soluções de trabalho está descrito na parte experimental do método e o cálculo do limite de repetitividade é demonstrado na equação 3.6a.

Tabela 24: Estudo do parâmetro de repetitividade do método clae (fabricante A)

Concentração (10 ⁻⁴ mol/L)	Área Média	SDR (%)	r
5,29	3635384,3	0,07	0,2
6,61	4600843,1	0,05	0,1
9,25	5540584,2	0,48	1,3

Conforme demonstrado na tabela 24, o limite de repetitividade tabelado $r_{\text{tabelado}} (n=2) = 2,8$ para $\alpha=0,05$, comparando com os resultados obtidos dos fabricantes A, B e C, obteve-se limite de repetitividade abaixo do valor tabelado, desta forma pode-se dizer que este método tem uma **repetitividade aceitável** e os valores obtidos estão dentro da faixa de restrição de aceitabilidade da matéria-prima estipulada pelo compêndio oficial (98 a 101%)⁶.

7.3. Espectrofotometria Ultravioleta Visível

7.3.1. Parâmetros de validação do método

7.3.1.1 Linearidade

Este parâmetro é verificado mediante a confecção da curva de calibração, através da preparação de uma solução padrão Paracetamol – USP lote corrente de concentração ($1,3 \times 10^{-3}$ mol/L); efetua-se diluições para as soluções de trabalho, conforme descrito na parte experimental; e conforme as tabelas 25 e 26 determina-se o desvio padrão, desvio padrão relativo, variância e o coeficiente de correlação linear de cada curva.

Curva analítica I:

Tabela 25: Primeira curva de calibração para determinação de paracetamol por espectrofotometria;

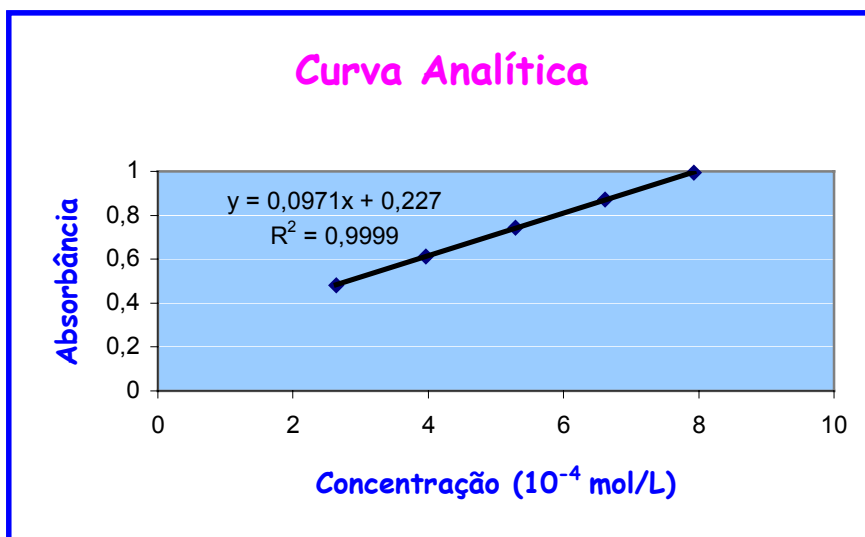
Concentração (10^{-5} mol/L)	Abs			Abs Média	SD	SDR (%)	S ²
	Abs (1)	Abs(2)	Abs(3)				
2,64	0,483	0,482	0,481	0,482	0,001	0,21	0,043
3,96	0,613	0,611	0,611	0,612	0,001	0,19	0,036
5,29	0,743	0,742	0,741	0,742	0,001	0,13	0,017
6,61	0,870	0,870	0,871	0,870	0,001	0,07	0,005
7,93	0,994	0,994	0,995	0,994	0,001	0,06	0,004

Curva analítica II:²⁹

Tabela 26: Segunda curva de calibração para determinação de paracetamol por espectrofotometria;

Concentração (10 ⁻⁵ mol/L)	Abs (1)	Abs (2)	Abs (3)	Abs Média	SD	SDR (%)	S ²
2,64	0,475	0,474	0,473	0,474	0,001	0,21	0,044
3,96	0,599	0,600	0,601	0,601	0,001	0,16	0,026
5,29	0,725	0,726	0,727	0,726	0,001	0,14	0,02
6,61	0,857	0,855	0,856	0,856	0,001	0,12	0,02
7,93	0,984	0,985	0,983	0,984	0,001	0,10	0,01

Figura 8: Primeira curva de calibração obtida para determinação de paracetamol por espectrofotometria.



As curvas mostram um comportamento linear e as equações foram:

Primeira Curva : $y=0,0971x +0,227$; $R^2= 0,9999$ (diluyente água destilada)

Segunda Curva: $y=0,0963x +0,2188$; $R^2= 1,000$ (diluyente ácido clorídrico)

Verifica-se que os dois diluyentes utilizados apresentam comportamento linear e que os coeficientes de correlações são iguais, podendo ser empregado no doseamento do paracetamol.

Observa-se que este método pode ser considerado livre de tendências, pois os cálculos do desvio dos resíduos plotados versus a concentração no gráfico, apresentaram randomicamente uma distribuição normal no eixo zero, e também quando comparados com o $t_{\text{tabelado}} (n=2)=4,303$ (unilateral para $v=n-1$ graus de liberdade), possuem valor $t_{\text{calculado}}=2,62$ menor¹².

E para verificar se o método é homo ou heterocedástico, calculam-se os resultados das variâncias obtidas nas três curvas, através do Teste de Cochran.

1ª Curva Analítica

$$C_{\text{calculado}} = S^2_{\text{maior}} / \Sigma S^2$$

$$C_{\text{calculado}} = 0,043 / 0,104 = \mathbf{0,40}$$

2ª Curva Analítica

$$C_{\text{calculado}} = 0,044 / 0,12 = \mathbf{0,36}$$

O $C_{\text{calculado}}$ é menor que o $C_{\text{tabelado}} =0,686$, mesmo com a utilização de diferentes diluyentes, indica que a concentração da amostra apresenta-se em condição uniforme de variância, e que o método é **homocedástico**.

7.3.1.2 Exatidão-Teor das matérias-primas

É o grau de concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como referência. Para execução dos cálculos foi utilizada a equação da reta **$y=0,0971x +0,227$**

Estes cálculos foram realizados para os três fabricantes (codificados como A, B e C), e os resultados são demonstrados nas tabelas 27, 28 e 29 utilizando uma concentração da solução paracetamol de trabalho de $7,97 \times 10^{-3}$ mol/L e apresenta-se o espectro do fabricante A no anexo XIV.

Fabricante: A

Tabela 27: Determinação do teor da matéria-prima (fabricante A)

Concentração		Concentração		Teor
(10^{-5} mol/L)	Abs Média	Obtida	(curva)	(%)
7,97	1,001	7,97		100,0

Desvio para abs média=0,005

Resultado= (100,0 ± 0,004)% -1ª curva

Resultado= (99,4 ± 0,004)% - 2ª curva

Fabricante: B

Tabela 28: Determinação do teor da matéria-prima (fabricante B)

Concentração (10 ⁻⁵ mol/L)	Abs Média	Concentração Obtida (Curva)	Teor (%)
7,97	0,995	7,91	99,3

Desvio para abs média=0,002

Resultado= (99,3 ± 0,002)% - 1^a curva

Resultado= (98,5 ± 0,002)% - 2^a curva

Fabricante: C

Tabela 29: Determinação do teor da matéria-prima (fabricante C)

Concentração (10 ⁻⁵ mol/L)	Abs Média	Concentração Obtida (Curva)	Teor (%)
7,97	0,994	7,90	99,2

Desvio para abs média=0,002

Resultado= (99,2 ± 0,002)%

Resultado= (99,2 ± 0,002)%

Mediante análise dos resultados, observa-se que o teor de cada matéria-prima estudada está dentro da faixa de restrição de aceitabilidade estipulada pelo compêndio oficial (98 a 101%)⁶.

Para verificar que o método é exato efetua-se a comparação dos resultados obtidos e os encontrados no Estudo Interlaboratorial através do método espectrofotométrico dos fabricantes estudados neste trabalho.

Fabricante A – 99,61 ± 0,77

Fabricante B – 99,79 ± 0,57

7.4. Comparação entre os métodos (Exatidão do método)

Cálculo estatístico através do Teste F

Calculou-se a diferença das variâncias dos métodos a validar voltametria em pulso diferencial e os métodos validados de espectrofotometria e cromatografia em fase líquida, através do **teste F**, utilizando a fórmula abaixo:

$$F_{\text{calculado}} = S^2_{\text{validar}}/S^2_{\text{validado}}$$

Onde:

$F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ – os métodos comparados apresentam diferenças significativas entre si às precisões

$F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ – os métodos comparados não apresentam diferenças significativas entre si às precisões

1- Voltametria e Espectrofotometria

$$F_{\text{calculado}} = S^2_{\text{voltamétrico}}/S^2_{\text{espectrofotométrico}}$$

$$F_{\text{calculado}} = 0,068/0,021=3,23$$

2- Voltametria e Cromatografia

$$F_{\text{calculado}} = S^2_{\text{voltamétrico}}/S^2_{\text{cromatografia}}$$

$$F_{\text{calculado}} = 0,068/0,034=2,00$$

3- Cromatografia e Espectrofotometria

$$F_{\text{calculado}} = S^2_{\text{cromatografia}} / S^2_{\text{espectrofotométrico}}$$

$$F_{\text{calculado}} = 0,034/0,021 = \mathbf{1,62}$$

O $F_{\text{calculado}}$ é menor que o $F_{\text{tabelado}} (4,4) = 9,605$ ($v=n-1$ graus de liberdade para $\alpha=0,05$) para o método proposto a Voltametria de pulso diferencial e os métodos oficiais Espectrofotometria e Cromatografia Líquida, demonstrando que estes métodos **não apresentam diferenças significativas às suas precisões**

Conclui-se que o método.voltamétrico também pode ser utilizado no doseamento da substância paracetamol

Cálculo estatístico através do Teste t (student)

Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos oficiais e o proposto para validação, foi feita através do **teste t**, utilizando a fórmula abaixo:

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{[(S^2_1 + S^2_2) \times (n-1)]^{1/2}} \text{ (Teste de Student)}$$

Onde:

X_1 = média dos resultados do método 1

X_2 = média dos resultados do método 2

S^2_1 = variância do método 1

S^2_2 = variância do método 2

n = número de determinações

1- Voltametria e Espectrofotometria

$$X_1=99,9; S^2_1=0,068$$

$$X_2=100,0; S^2_2=0,021$$

$$t_{\text{calculado}} = \mathbf{0,66}$$

2- Voltametria e Cromatografia

$$X_1=99,9; S^2_1=0,068$$

$$X_2=100,2; S^2_2=0,034$$

$$t_{\text{calculado}} = \mathbf{1,88}$$

3- Cromatografia e Espectrofotometria

$$X_1=100,0; S^2_1=0,034$$

$$X_2=100,2; S^2_2=0,021$$

$$t_{\text{calculado}} = \mathbf{1,66}$$

O $t_{\text{calculado}}$ é menor que o $t_{\text{tabelado}} (8) = 2,306$ ($2=n-1$ graus de liberdade para $\alpha=0,05$) para o método proposto a Voltametria de pulso diferencial e os métodos oficiais Espectrofotometria e Cromatografia Líquida, demonstrando que estes métodos são **estatisticamente iguais**.

Conclui-se que o método de voltametria pode ser utilizado para o doseamento da substância paracetamol.

8. CONCLUSÕES

Pelas considerações apresentadas anteriormente, pode-se concluir que os objetivos propostos de implementação e validação da técnica voltamétrica em regime de pulso diferencial, quando comparada com as técnicas de espectrofotometria e cromatografia líquida para análise do paracetamol como matéria-prima, pela presente dissertação foram atingidos, e podem ser resumidos em:

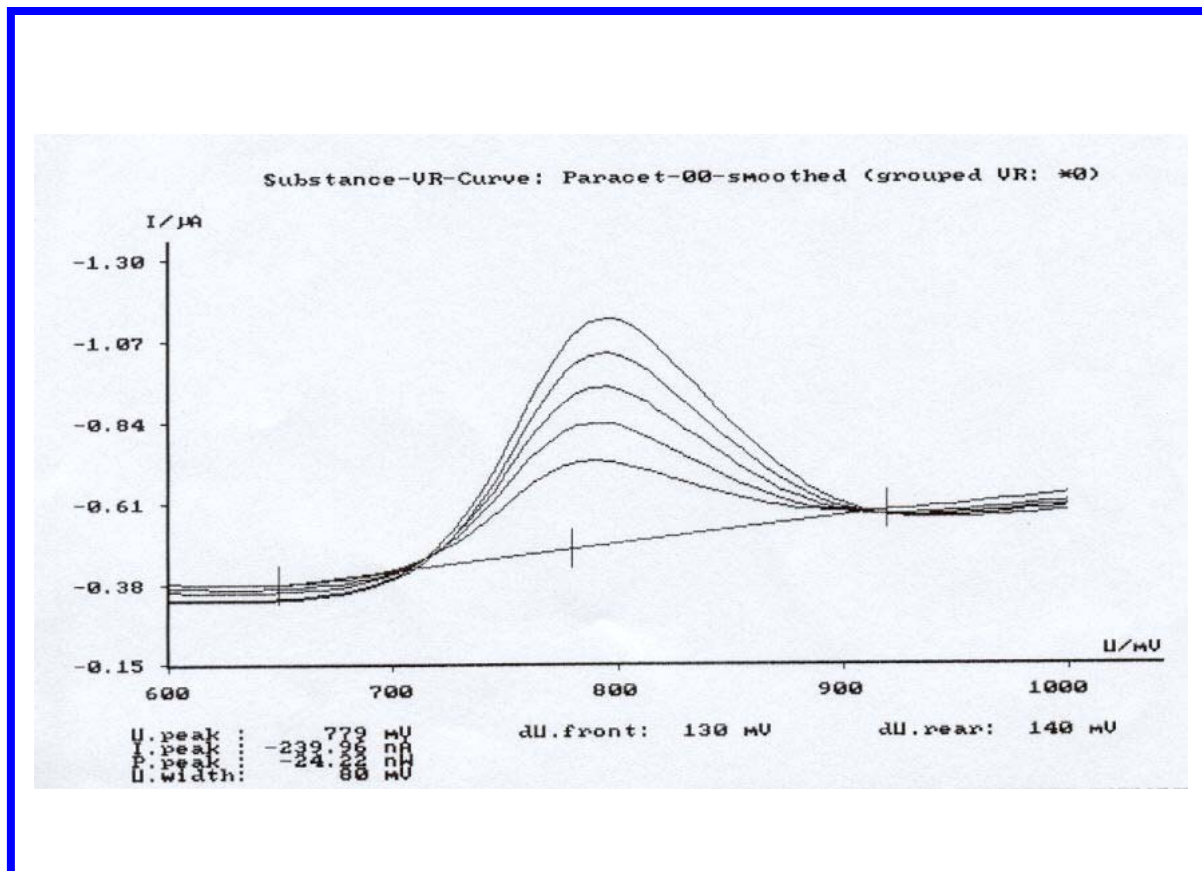
- O método de voltametria em pulso diferencial foi validado conforme o Documento DOQ-CGCRE-008 Inmetro de 2002;
- O paracetamol é uma analito que sofre oxidação e é mais estável em meio ácido (pH=0,6) apresentando uma corrente de pico mais definida, através de uma relação linear com a natureza do eletrólito suporte e o pH;
- Para os parâmetros obtidos na otimização do método, destacam-se: para eletrólito suporte - a solução na proporção de 1:1 de metanol e ácido perclórico; diluente para amostra - metanol; velocidade de varredura de 15mv/s; amplitude de pulso de -50 mv/s; e como eletrodo de trabalho e eletrodo auxiliar o carbono vítreo e o de referência o Ag/AgCl;
- A determinação do paracetamol através do pico de oxidação no potencial é de 780 mV;
- A faixa de trabalho ideal para doseamento do paracetamol na metodologia voltamétrica é de $3,96 \times 10^{-4}$ mol/L a $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L;
- Na metodologia voltamétrica o limite de detecção é $8,5 \times 10^{-7}$ mol/L e o limite de quantificação é $2,7 \times 10^{-6}$ mol/L que são menores que as obtidas nos métodos de espectrofotometria e cromatografia em fase líquida;

- Estas concentrações baixas são de grande utilidade para determinações de inúmeras substâncias farmacêuticas, fluidos biológicos e detecção de impurezas – importante para Estabelecimento de SQR;
- Esta técnica é pouca influenciada por substâncias relacionadas, excipientes, aglutinantes e corantes e outras de substâncias utilizadas nas diversas formas farmacêuticas;
- Técnica que possibilita o estudo dos mecanismos eletródicos de oxidação e redução;
- Os resultados obtidos pela metodologia voltamétrica proposta foram estatisticamente iguais aos encontrados usando as metodologias oficiais para análise do paracetamol em matéria-prima e formulações farmacêuticas. Desta forma a técnica voltamétrica pode ser uma metodologia alternativa útil nestas determinações do paracetamol;
- Mediante análise dos resultados, observa-se que o teor de cada matéria-prima estudada está dentro da faixa de restrição de aceitabilidade estipulada pelo compêndio oficial (98 a 101%)⁶.
- Para verificar que o método é exato efetuou-se a comparação dos resultados obtidos e os encontrados no Estudo Interlaboratorial através do método espectrofotométrico dos fabricantes estudados neste trabalho.
- Na comparação das vantagens e limitações das metodologias abordadas, verifica-se que a voltametria possui menor tempo de análise, sem tempo de estabilização para o equipamento, alta sensibilidade e resolução, resultados quantitativos, pouca quantidade de rejeito e menor custo de mercado, sendo uma técnica viável para quantificação do paracetamol em matéria-prima.

9. ANEXOS

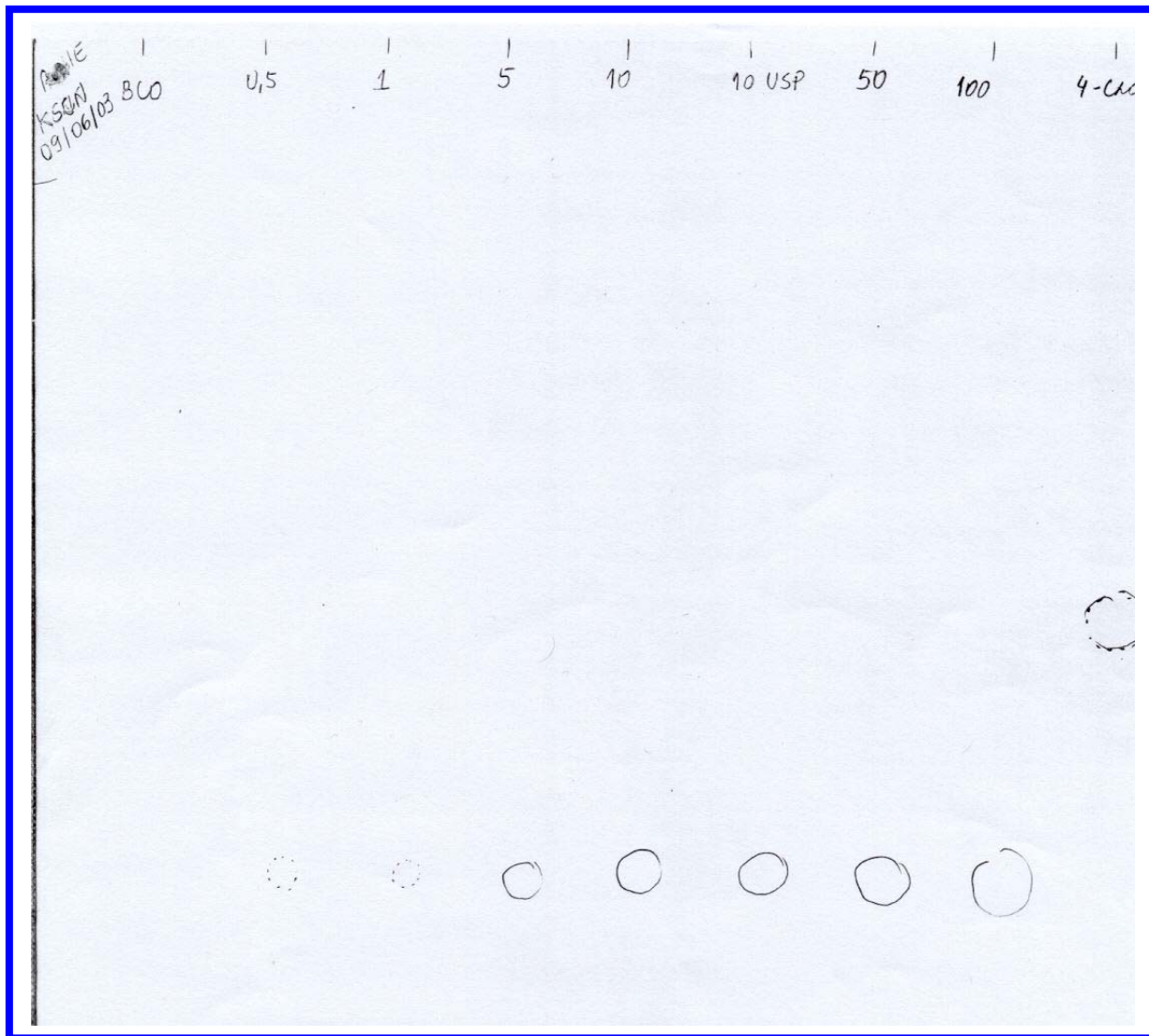
ANEXO I

Curva analítica obtida para determinação do paracetamol por voltametria em pulso diferencial na concentração de $3,96$ a $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L



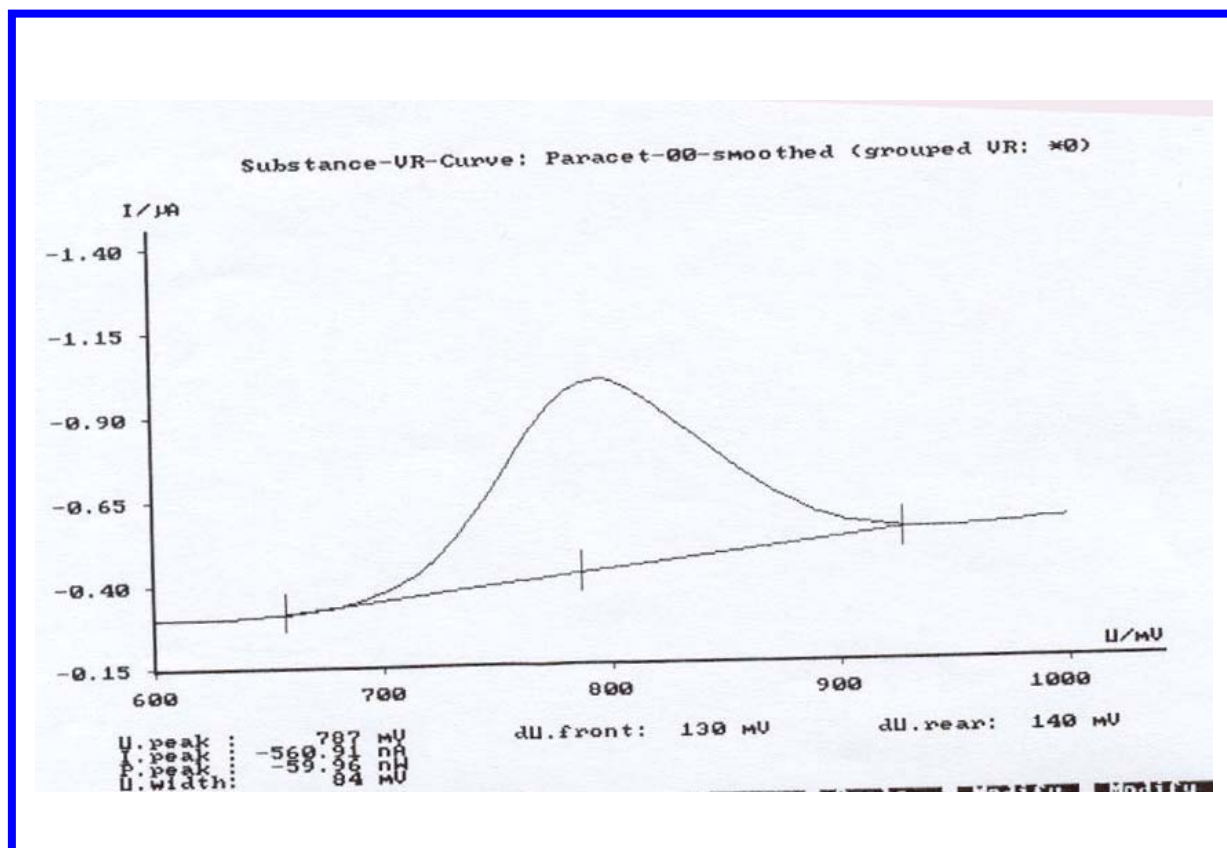
ANEXO II

Cromatografia de camada delgada para determinação de uma possível degradação do paracetamol no teste de estabilidade.



ANEXO III

Voltamograma obtido na solução de paracetamol de concentração $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L -Fabricante A



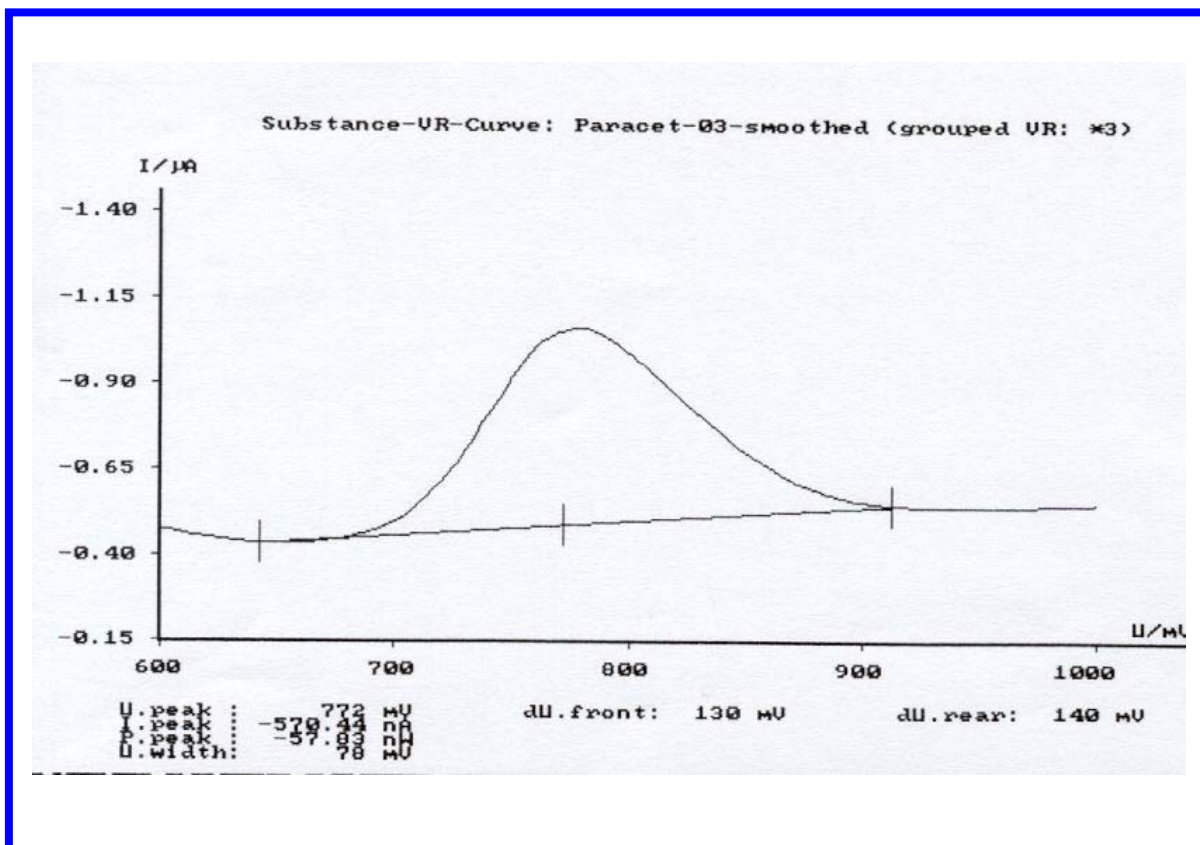
ANEXO IV

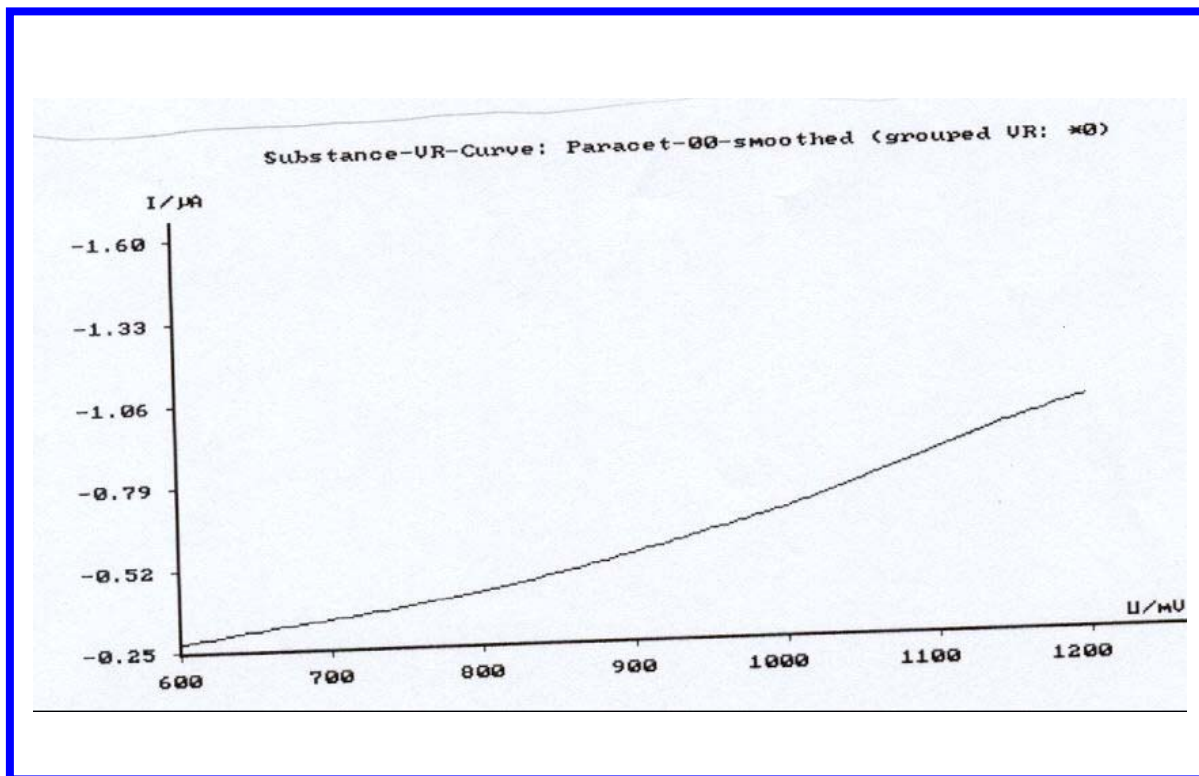
Voltamograma obtido na solução de paracetamol de concentração $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L -Fabricante B



ANEXO V

Voltamograma obtido na solução de paracetamol de concentração $9,25 \times 10^{-4}$ mol/L -Fabricante C



ANEXO VI**Voltamograma do eletrólito de suporte (metanol: ácido perclórico)**

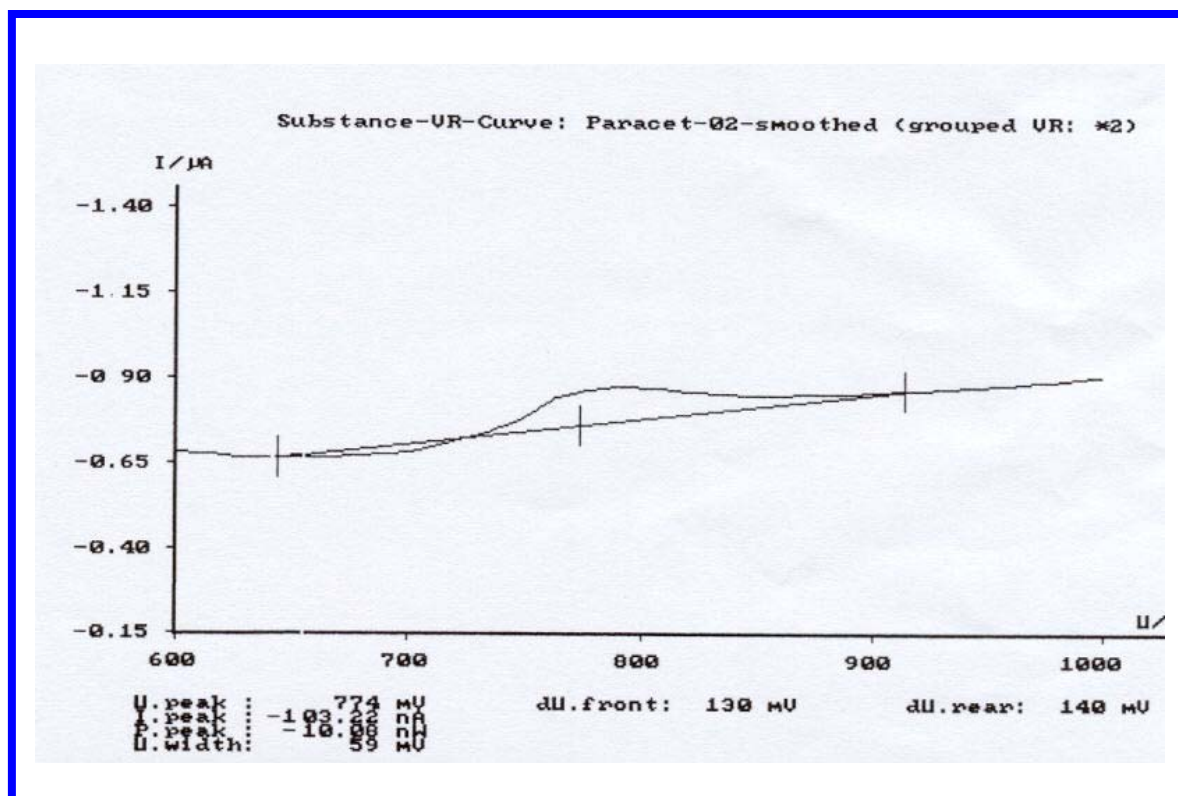
ANEXO VII

Voltamograma obtido na determinação do limite de detecção da solução de paracetamol



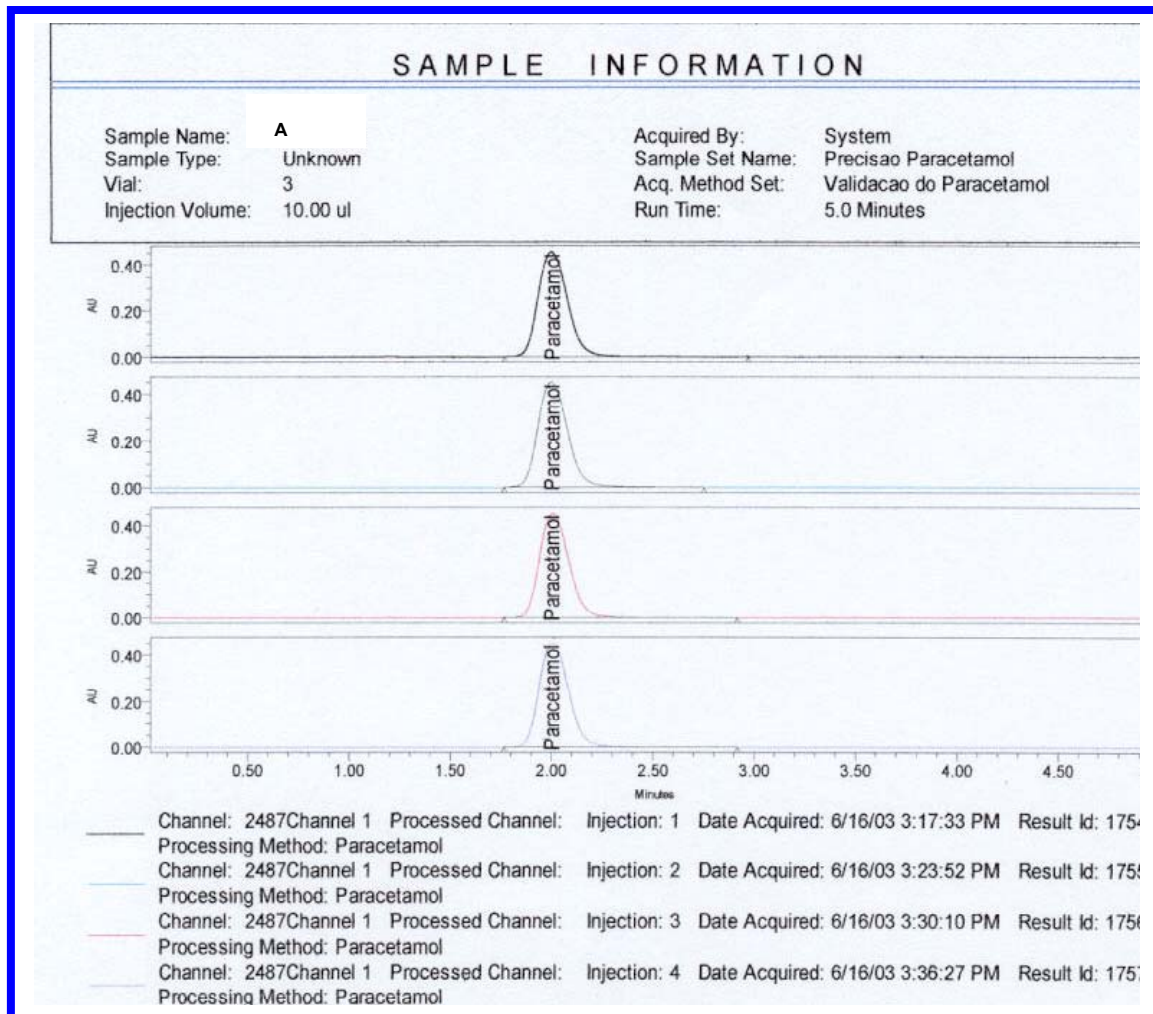
ANEXO VIII

Voltamograma obtido na determinação do limite de quantificação da solução de paracetamol



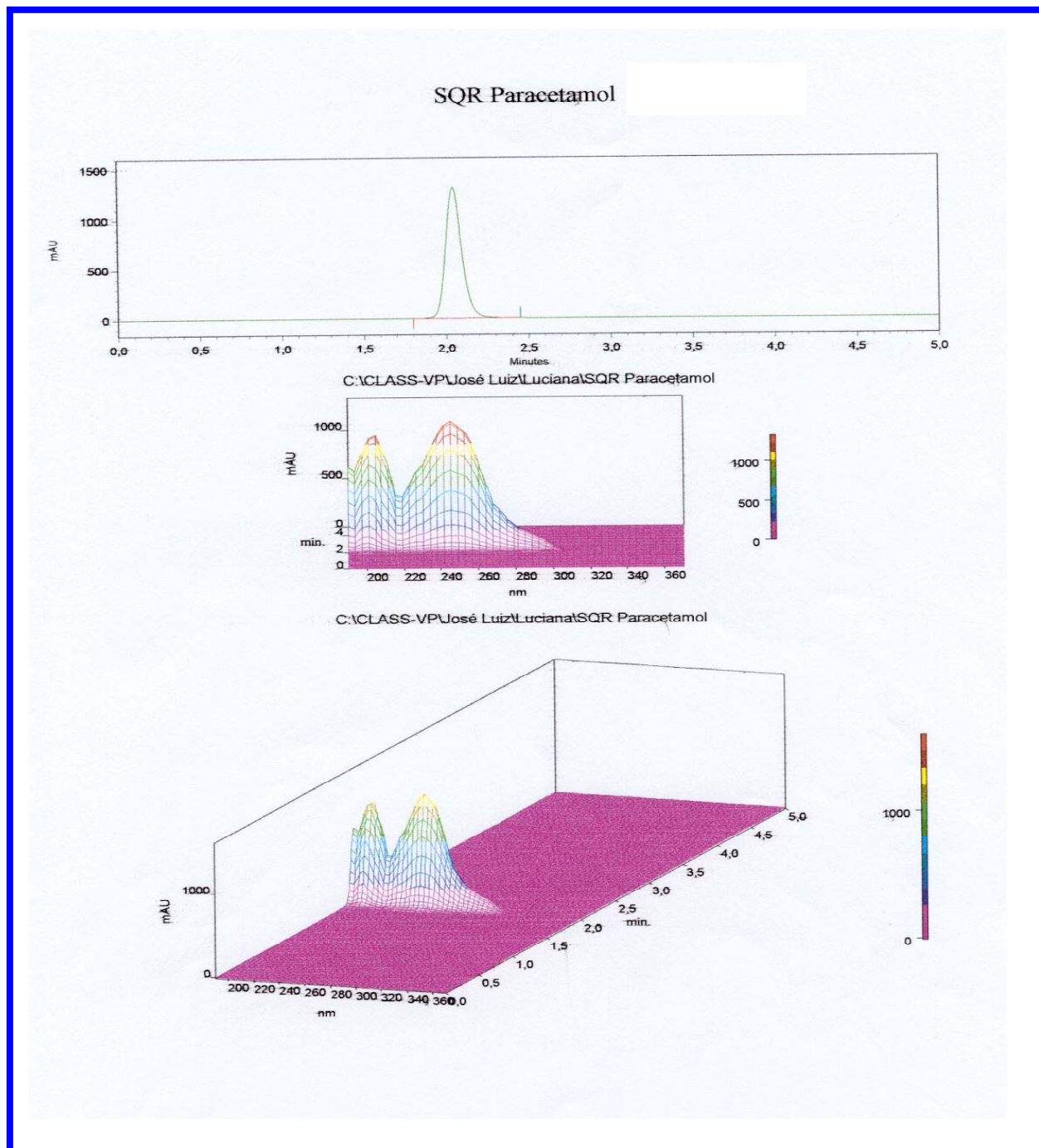
ANEXO IX

Cromatograma obtido na solução de paracetamol de concentração $7,93 \times 10^{-4}$ mol/L -Fabricante A



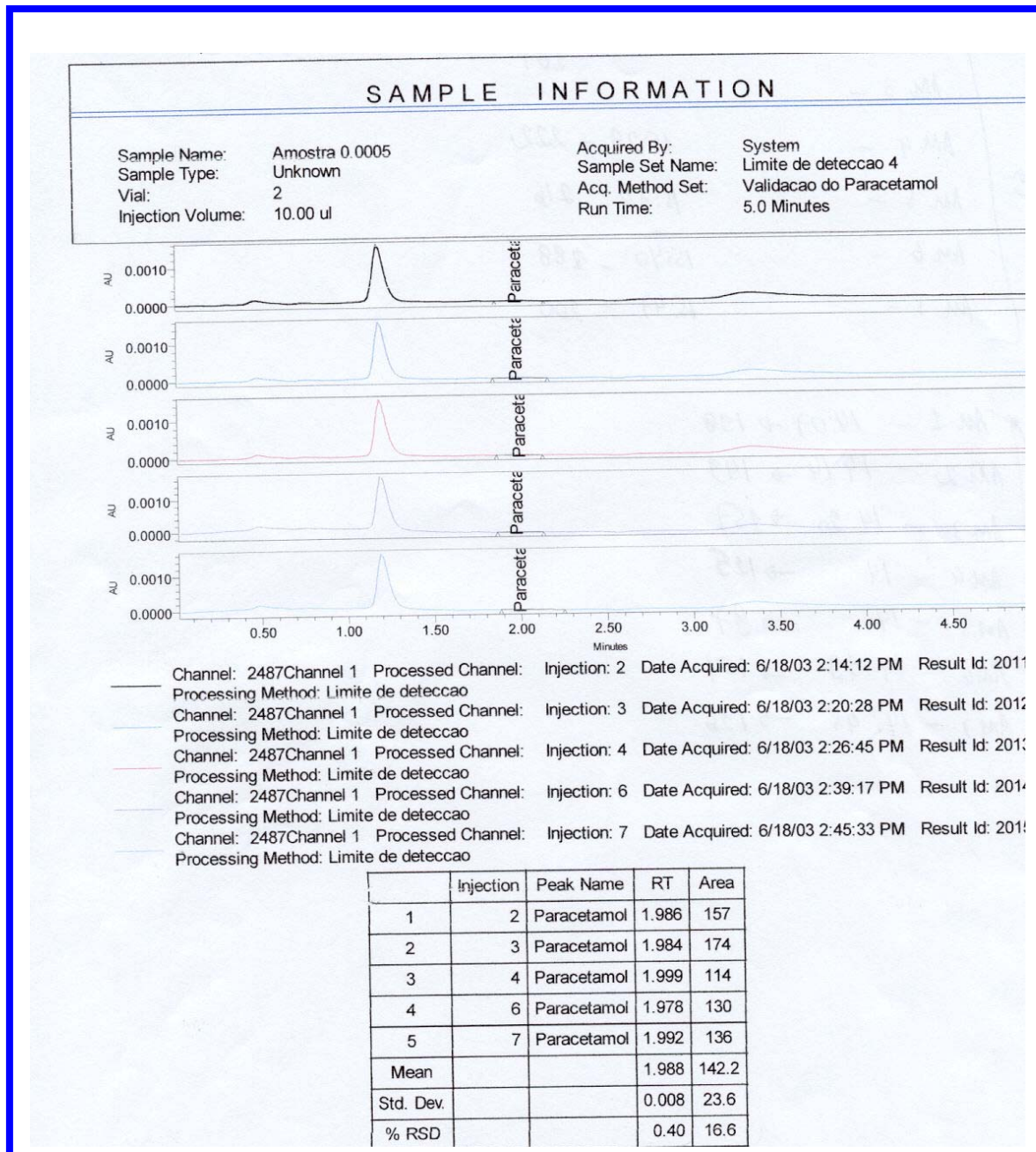
Anexo X

Cromatograma obtido da solução de paracetamol na concentração $6,61 \times 10^{-4}$ mol/L por detector de diode-array



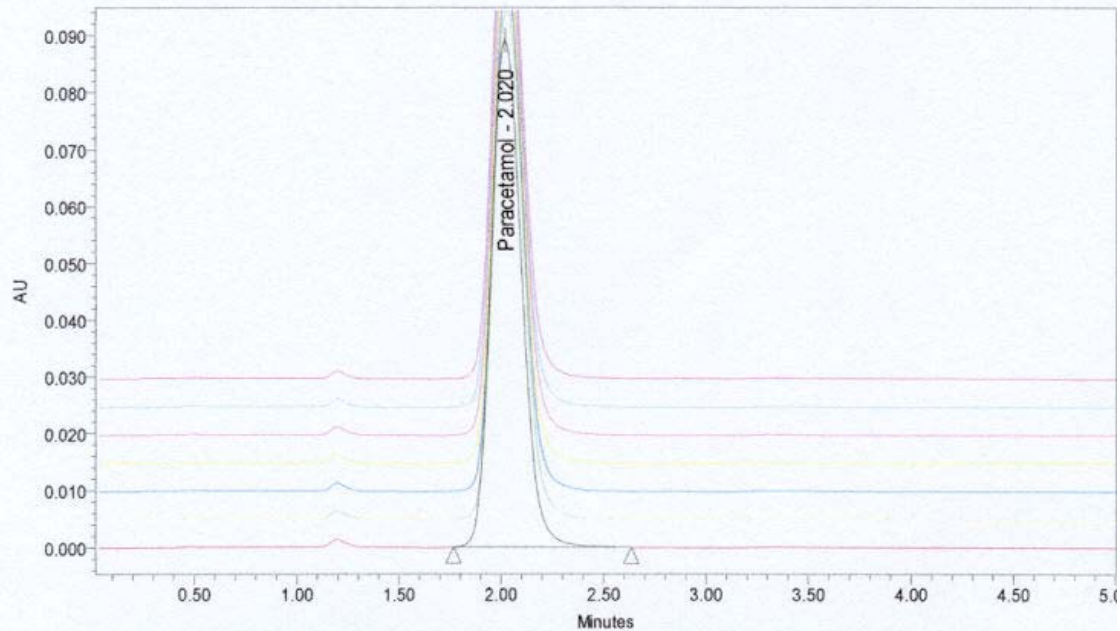
ANEXO XI

Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção da solução de paracetamol



ANEXO XII

Cromatograma obtido na determinação do limite de quantificação da solução de paracetamol



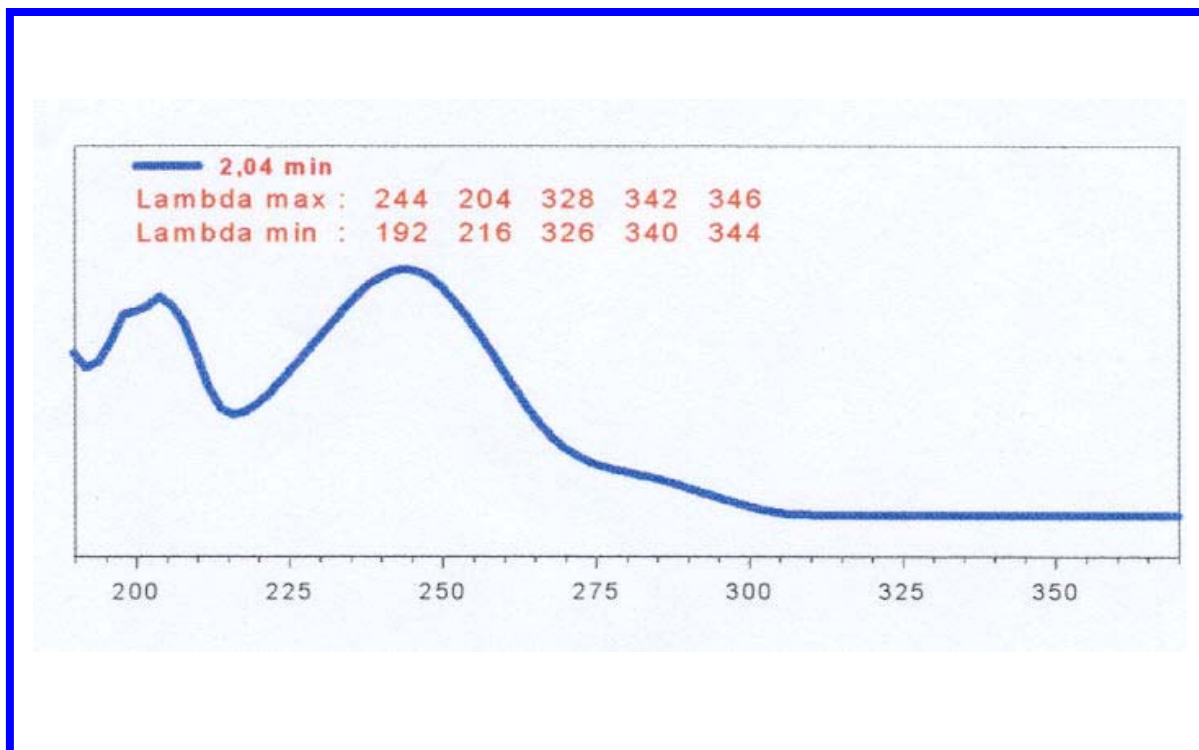
— Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 11:31:31 AM Vial: 3 Injection: 1
 — Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 11:37:48 AM Vial: 3 Injection: 2
 — Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 11:44:04 AM Vial: 3 Injection: 3
 — Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 11:50:20 AM Vial: 3 Injection: 4
 — Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 11:56:36 AM Vial: 3 Injection: 5
 — Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 12:02:53 PM Vial: 3 Injection: 6
 — Sample Name: Amostra 20 Date Acquired: 6/18/03 12:09:11 PM Vial: 3 Injection: 7

Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Name	Retention Time (min)	Area	K Prime	USP Tailing	Tangent	Width @ Tangent
1	Amostra 20	Paracetamol	2.020	929948	1.524729e+000	1.165116e+000	8.858966e+002	2.714396e-001
2	Amostra 20	Paracetamol	2.019	930326	1.523707e+000	1.175254e+000	8.980846e+002	2.694823e-001
3	Amostra 20	Paracetamol	2.018	931814	1.522586e+000	1.173283e+000	8.899088e+002	2.705971e-001
4	Amostra 20	Paracetamol	2.017	931083	1.520991e+000	1.169828e+000	8.949695e+002	2.696604e-001
5	Amostra 20	Paracetamol	2.016	932753	1.520621e+000	1.172054e+000	8.794967e+002	2.719821e-001
6	Amostra 20	Paracetamol	2.014	933374	1.518016e+000	1.174904e+000	8.935342e+002	2.695584e-001
7	Amostra 20	Paracetamol	2.015	934279	1.518591e+000	1.175263e+000	8.920086e+002	2.698505e-001
Mean			2.017	931939.6				
Std. Dev.			0.002	1608.0				
% RSD			0.10	0.2				

ANEXO XIII

Espectro obtido na solução de paracetamol de concentração $6,61 \times 10^{-5}$ mol/L-Fabricante A



10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. HANS HAAS, M.D., History of antipyretic analgesic therapy, **The American Journal of Medicine**, West Germany, Nov.1983.
2. VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O.; FILHO, O.F., Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono, **Química Nova**, Vol.26,2003, p. 39-43
3. SKORPEN, F.; ALM, B.;SKJELBRED, C.; ASS,P.A.;KROKAN,H.E., Paracetamol increases sensitivity to ultraviolet irradiation, delays repair of the UNG-gene and recovery of RNA synthesis in Hacat cells, **Chemico – Biological Interactions**, V. 110, Issues 1-2, p.123-136, March1998;
4. BERGMAN K., MÜLLER L. AND WEBERG TEIGEN, S., The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory ,**Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, V. 349, Issue 2, p. 263-2881, February 1996;
5. SÂNDULESCU,R.; OPREAN,S.M.R.,The development of spectrophotometric and electroanalytical methods for ascorbic acid and acetaminophen and their applications in the analysis of effervescent dosage forms, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,Vol.23, p. 77-87,2000;
6. THE UNITED States Pharmacopeia, 24 ed., 1V.,Rockville, 2000;
7. MINER,D.J.; RICE, J.R; RIGGIN,R.M.; KISSINGER P.T.; Voltammetry of acetaminophen and metabolites, **Analytical Chemistry**, V.53, p.2258-2263, September 1981;

8. NAGARAJA,P.; MURTHY,K.C.S.; RANGAPPA,K.S., Spectrophotometric method for the determination of paracetamol and phenacetin, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**,V.17, p. 501-506,1998;
9. INMETRO DOQ -CGCRE-008, outubro 2002- Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos
10. THE UNITED States Pharmacopeia, 24 ed., 1V.-*Validation of Compendial Methods*, Rockville, p.2149-2159, 2000;
11. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Federal Register, 1996;
12. Disponível em: <http://www.rsc.gov/lap/rsccom/amc>- My calibration is linear, 2000. Acesso em Agosto 2003;
13. MEYERS,I.; ROBERT,A., **Pulse Voltammetry**, **Encyclopedia of analytical chemistry- applications, theory and instrumentation**,V. 11, 2000, p. 10010-10032;
14. BRETT, ANA M. O.; BRETT, CHRISTOPHER, M. A. –**Eletroquímica- Princípios,Métodos e Aplicações**, Livraria Almedina, Coimbra,1996;
15. LAU, O., W.; LUK, S., F.; CHEUNG, Y.M., Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammeter using a glassy carbon electrode, **Analyst**, V.114, September 1989;
16. Sawyer D. T.; Sobkaweak A.; Robert J.L.- **Electrochemistry for chemists** – Second Editon, , edited by John Willey & Sons, Inc., p. 208, USA,1995;

17. Universidade Estadual de Campinas – Voltametria: Conceitos e técnicas
Acesso em: junho/2003 e disponível em:
<http://www.ishtar.iqm.unicamp.br/downloads/chemkeys/voltametria>
18. SANTORO, M, I. M., **Introdução ao Controle de Qualidade de Medicamentos**, p. 3 –23, Atheneu Editora São Paulo, 1988;
19. POP nº 65.3110.015/ INCQS – Estabelecimento de Substância Química de Referência;
20. GONÇALVES, M. L. S. S., **Livros métodos instrumentais para análise de soluções- análise quantitativa**, 3ª edição.
21. REZENDE, M. C., **Determinação de Ácido Fólico em medicamentos por voltametria de pulso**; Rio de Janeiro PUC/RJ, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências) Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Instituto de Pós-Graduação;
22. World Health Organization – General Guideline for the Establishment Maintenance and Distribution of Chemical Reference Substances: Geneva 1996 (WHO/PHARM/96590);
23. Clarke's Isolation and Identification of Drugs (2ª edição), Londres, Editorial Staff, p., 1986;
24. Clarke's Isolation and Identification of Drugs (2ª edição), Londres, Editorial Staff, p. 465-467, 1969;
25. Farmacopéia Britânica, edição internacional, V.I, 1993, p. 483;

26. ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 3: intermediate measures of precision of standard measurement method;

27. ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values