



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

INGRID CRISTINA SOARES LEAL

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE  
QUALIDADE DE FÁRMACOS  
UTILIZANDO A TÉCNICA DE  
HPLC: REVISÃO INTEGRATIVA  
SOBRE O PARACETAMOL**

BRASÍLIA, 2022



INGRID CRISTINA SOARES LEAL

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE  
QUALIDADE DE FÁRMACOS  
UTILIZANDO A TÉCNICA DE  
HPLC: REVISÃO INTEGRATIVA  
SOBRE O PARACETAMOL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Prof. Anderson de Jesus Gomes**

BRASÍLIA, 2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sa Soares Leal, Ingrid Cristina  
AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE DE FÁRMACOS  
UTILIZANDO A TÉCNICA DE HPLC: REVISÃO INTEGRATIVA SOBRE O  
PARACETAMOL / Ingrid Cristina Soares Leal; orientador  
Anderson de Jesus Gomes. -- Brasília, 2022.  
46 p.

Monografia (Graduação - Farmácia ) -- Universidade de  
Brasília, 2022.

1. Controle de qualidade . 2. Paracetamol. 3. Validação  
analítica . 4. Cromatografia líquida de alta eficiência . 5.  
HPLC. I. de Jesus Gomes, Anderson, orient. II. Título.



INGRID CRISTINA SOARES LEAL

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE DE  
QUALIDADE DE FÁRMACOS  
UTILIZANDO A TÉCNICA DE  
HPLC: REVISÃO INTEGRATIVA  
SOBRE O PARACETAMOL**

**BANCA EXAMINADORA**

**Anderson de Jesus Gomes**

---

Orientador(a): Prof(a). Nome e Sobrenome  
(Lotação)

---

Co-Orientador(a): Prof(a). Nome e Sobrenome (se houver)  
(Lotação)

**Vívian da Silva Santos (1069985)**

---

Prof(a). Nome e Sobrenome  
(Lotação)

**Fernanda Lima Subrinho**

---

Prof(a). Nome e Sobrenome  
(Lotação)

BRASÍLIA, 2022

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	8
1.1.	HISTÓRICO DA CROMATOGRAFIA.....	8
1.2.	FÁRMACO PARACETAMOL.....	8
1.3.	MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	9
1.4.	COMPONENTES DO HPLC.....	10
1.5.	TIPOS DE SEPARAÇÃO.....	10
1.6.	TIPOS DE DETECTORES.....	11
1.7.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	12
1.8.	ADEQUABILIDADE DE SISTEMA.....	14
1.9.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.10.	JUSTIFICATIVA.....	22
2.	OBJETIVOS.....	22
3.	METODOLOGIA.....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.	CONCLUSÃO.....	42
6.	CRONOGRAMA DE TRABALHO A SER CUMPRIDO AO LONGO DAS DISCIPLINAS TCC 1 ETCC 2 (10 MESES).....	43
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## Lista de Tabelas

1.	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE INMETRO E ANVISA.....	15
2.	RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS PELO AUTOR CLAUSEN, D. N. ET. AL.....	24
3.	RESULTADO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA DA METODOLOGIA.....	27
4.	RESULTADO DA VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DESENVOLVIDA.....	29
5.	RESULTADOS ENCONTRADOS DOS CRITÉRIOS ANALÍTICOS AVALIADOS EM DECORRÊNCIA DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS SELECIONADAS.....	32
6.	RESULTADOS ENCONTRADOS DOS CRITÉRIOS ANALÍTICOS EM RELAÇÃO AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	34
7.	RESULTADOS ENCONTRADOS REFERENTES AOS CRITÉRIOS ANALÍTICOS AVALIADOS E SUA RELAÇÃO COM AS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	36
8.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DESENVOLVIDA PELO AUTORES E SEUS RESULTADOS COM OS CRITÉRIOS ANALÍTICOS AVALIADOS.....	<b>37</b>
9.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS ESCOLHIDAS PELOS AUTORES E SEUS RESULTADOS PARA OS CRITÉRIOS ANALÍTICOS AVALIADOS.....	40

## Lista de Figuras

Figura 1- Tipos de métodos cromatográficos .....	9
Figura 2 – Esquema do HPLC.....	10
Figura 3 – Seleção da fase estacionária de acordo com a amostra .....	11
Figura 4 – Critérios para a validação de métodos analíticos .....	12
Figura 5 – Parâmetros analisados em cromatogramas .....	15
Figura 6 – Curva analítica concentração vs resposta.....	18
Figura 7 - Demonstração da faixa linear a partir dos dados da curva analítica.....	18
Figura 8 – Comparação entre cromatogramas da solução padrão e amostra .....	24

**Resumo:**

Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa é utilizada como ferramenta para a validação de metodologias com a finalidade de quantificação e detecção do ativo paracetamol. O paracetamol é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas muito consumido pela população, cujo precisa de um controle de qualidade rigoroso. Objetivos: O trabalho em questão tem como objetivo realizar uma revisão integrativa sobre trabalhos que tratam sobre metodologias precisas, exatas, robustas, sensíveis e confiáveis para a detecção e/ou quantificação do paracetamol. Metodologia: O trabalho trata sobre uma revisão integrativa de literatura sobre trabalhos que trazem a detecção ou quantificação do ativo paracetamol e suas condições cromatográficas utilizadas, bem como os resultados dos critérios para validação da metodologia. Resultados/Discussão: A partir dos resultados dos artigos, pôde-se concluir que as condições cromatográficas que apresentam melhores resultados para detectar ou quantificar o paracetamol são fluxo de 1mL/min de fase móvel, sendo a mesma composta por metanol e em condição isocrática, coluna estacionária de especificações C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm, volume de injeção de 20µL, detector do HPLC sendo UV ou PDA e comprimento de onda de 210 a 270nm. Conclusão: Em suma, as condições cromatográficas escolhidas apresentaram melhores resultados quanto aos critérios analíticos avaliados.

Palavras-chaves: Controle de qualidade, paracetamol, validação, HPLC

**Abstract:**

High performance reversed-phase liquid chromatography is used as an tool for validating methodologies for the purpose of quantifying and detecting the active paracetamol. Paracetamol is a drug with analgesic and antipyretic properties widely consumed by the population, which needs strict quality control. Objective: The work in question aims to carry out a integrative review of works dealing with precise, exact, robust, sensitive and reliable methodologies for the detection and/or quantification of paracetamol. Methodology: The work on an integrative literature review on works that deal for a good detection or quantification of used assets, as the results of the criteria for validation of the methodology. Results/Discussion: From the results of the articles, it was possible to conclude that the chromatographic conditions that present the best results to detect or quantify paracetamol are flowof 1mL/min of mobile phase, which is composed of methanol and in isocratic condition, stationary column of specifications C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm, injection volume of

20 $\mu$ L, HPLC detector being UV or PDA and wavelength from 210 to 270nm. Conclusion: In short, the chromatographic conditions chosen showed better results regarding the analytical criteria evaluated.

Keywords: Quality control, paracetamol, validation, HPLC.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO DA CROMATOGRAFIA

A técnica de cromatografia remota desde o ano de 1903, sendo o ano considerado o início do desenvolvimento da técnica. Mikhail Semenovitch Tswett, um estudioso nascido na Itália, é considerado o criador da cromatografia por mencionar em uma palestra uma nova categoria de fenômeno de adsorção e sua aplicação em análises bioquímicas e, posteriormente, no mesmo ano, escreveu um relatório sobre o assunto, que é considerado o marco da criação da cromatografia (PACHECO, Sidney et al, 2015).

Tswett era graduado em botânica e por isso o foco dos seus estudos eram nas plantas, assim, foi publicado dois artigos posteriormente ao relatório, em 1906, sobre a técnica de cromatografia e como ela poderia ser utilizada para o estudo da química da clorofila. Os artigos foram publicados com a finalidade de ter um maior reconhecimento, pois o que havia escrito anteriormente em 1903 era apenas um relatório e por ser escrito em russo, era desconhecido. Nos artigos, Tswett detalha mais sobre a técnica e definitivamente a nomeia como cromatografia, A palavra cromatografia é caracterizada por duas palavras gregas, *chroma* que significa cor e *graphein* que significa escrever, assim, é possível a tradução sendo como a escrita das cores. O nome possivelmente foi dado devido a visualização dos anéis multicoloridos das substâncias encontrados nos extratos da plantas (clorofila e xantofila) e separados pela coluna cromatografica devido a adsorção. Além do detalhamento da técnica nos dois artigos, ele também menciona sobre o aparato desenvolvido para a realização da técnica (Ettre, L. S. M.S, 2003).

Após alguns anos da publicação de Tswett, poucos pesquisadores tentaram reproduzir a sua técnica, dentre eles, se destaca Charles Dhéré e Leroy Sheldon Palmer. Dhéré foi primeiro na Europa a reconhecer a importância do método de Tswett, além disso, foi o primeiro a publicar, em 1943, um artigo com uma discussão detalhada do trabalho científico do Tswett e uma biografia do pai da cromatografia. Já no que diz respeito ao Pálmer, ele utilizou a técnica desenvolvida por Tswett para a realização de seus estudos sobre carotenoide, bem como dá todo o crédito pelo método de separação desenvolvido e apresenta ainda uma bibliografia com 13 publicações de Tswett (Krasnovsky, A. A, 2003).

### 1.2. FÁRMACO PARACETAMOL

Neste trabalho, foi escolhido como composto de interesse o paracetamol, que é um fármaco com propriedades analgésicas, entretanto sem propriedades antiinflamatórias clinicamente significativas. O fármaco tem a característica de não interagir com a maioria dos medicamentos, e por isso, é considerado bastante seguro e bastante utilizado atualmente. O paracetamol apresenta

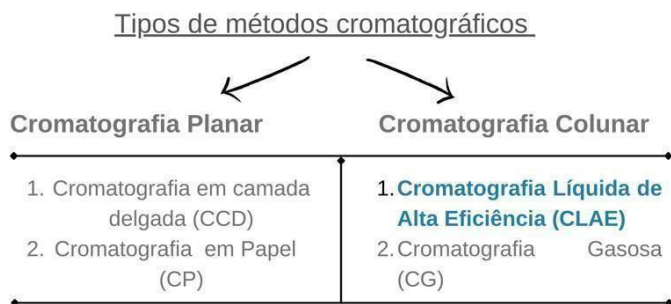
efeitos antipiréticos e atua por inibição da síntese das prostaglandinas, mediadores celulares responsáveis pelo aparecimento da dor (RIBEIRO, N. M; COSTA, J.V.R, 2008).

O paracetamol é composto de um anel de benzênico, contendo um grupamento ativador hidróxi na posição 4 e em sua posição *para* um grupo amida (acetamida ou etanamida). Consequentemente, a molécula de paracetamol constitui um sistema amplamente conjugado, incluindo os pares de elétrons isolados no oxigênio da hidroxila, do átomo de nitrogênio e do oxigênio da carbonila, junto com a nuvem  $\pi$  do anel benzênico e o orbital  $\pi$  no carbono carbonílico. Como resultado da presença de dois grupos doadores de elétrons, o anel aromático do benzeno desse sistema mostra mais reatividade do que o normal, facilitando as interações  $\pi$ - $\pi$ . Em geral, a presença de grupos amida e hidroxila atuam como doadores de ligações de hidrogênio, enquanto os grupos carbonila e hidroxila atuam como aceitadores de ligações de hidrogênio dentro da molécula. Esta propriedade faz com que o fármaco paracetamol apresente uma maior interação com o metanol do que com a água (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021).

### 1.3. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para a realização de análises cromatográficas, são utilizados diversos métodos para a concretização da mesma. Os métodos são divididos em cromatografia planar, no qual são contemplados os métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia em papel (CP). No que se refere a cromatografia colunar, são incluídos a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou em inglês HPLC) cujo é o foco do estudo em questão.

Figura 1- Tipos de métodos cromatográficos

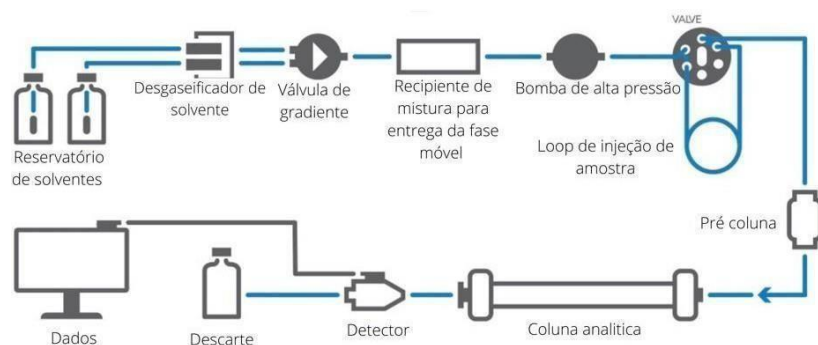


Fonte: Autoria própria

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ou, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), é uma técnica que permite a separação de compostos químicos presentes em uma solução específica, este método pode ser qualitativo, quando o objetivo final é avaliar a presença ou ausência de um determinado ativo, ou seja, identificá-lo; e quantitativo, quando se quer determinar a concentração ou dosagem de um ativo. Trata-se de uma técnica extremamente versátil

sendo utilizado em laboratórios de indústrias farmacêuticas para o controle dos seus insumos e fármacos desenvolvidos (VALÊCIO, 2018). Um esquema do funcionamento do sistema HPLC é exeplicado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema do HPLC



Fonte: Pokhara University: School of Health and Allied Sciences, 2017

#### 1.4. COMPONENTES DO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO

Os cromatógrafos líquidos necessitam de duas fases para o seu funcionamento, a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel é um solvente ou mistura de solventes que deve dissolver a amostra sem interação química, o solvente deve ter elevado grau de pureza para que o sinal não interfira na análise. A fase móvel também requer compatibilidade com o detector e deve possuir polaridade adequada para uma separação de analitos mais eficiente, além, de não decompor ou dissolver a fase estacionária. A fase móvel pode ser eluída de duas formas, a primeira, de forma isocrática, quando a concentração, a composição da fase móvel que passa pelo sistema é uniforme, ou seja, não varia. A segunda, por gradiente, quando há variação da concentração ou da composição da fase móvel que passa pelo sistema. A eluição por gradiente garante uma maior simetria, resolução e detectibilidade dos analitos, além de reduzir o tempo de análise (PFARMA, 2009).

Com relação a fase estacionária, ela é caracterizada por ser sólida ou semirrígida com poros de diferentes diâmetros (PFARMA, 2009). A fase estacionária fica dentro de um dispositivo chamado de coluna cromatográfica, a qual é feita de um material inerte, geralmente de aço inoxidável, cuja sua capacidade é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio da coluna, ou seja, quanto maior a pressão e menores os diâmetros, maior a separação dos analitos na solução amostra (SKOOG, 2004). As colunas geralmente são preenchidas com octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH<sub>2</sub> (amina), onde, as mais utilizadas são as C8 e C18 (PFARMA, 2009).

#### 1.5. TIPOS DE SEPARAÇÃO

Para que seja feita a separação dos diferentes analitos, é necessário que as fases tenham diferentes polaridades. Fase Normal é quando em um sistema, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, sendo a estacionária uma sílica. Por outro lado, a Fase Reversa é quando a fase móvel

é mais polar que a estacionária. A polaridade é importante uma vez que o analito que será carreado é aquele que tiver mais interação com a fase móvel, ou seja, se a análise tem por objetivo a retenção de um analito, este deve ter a mesma polaridade da fase estacionária, caso contrário terá que ter a mesma polaridade que a fase móvel para ser carreado (GAMA, 2019).

Figura 3 – Seleção da fase estacionária de acordo com a amostra



Fonte: Pharmacy Theory, 2021

## 1.6. TIPOS DE DETECTORES

Com relação aos detectores, eles podem ser de diversos tipos e não há nenhum que seja ideal para todas as análises da técnica, portanto vai depender da faixa de aplicação. Podem ser divididos em detectores de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Fluorescência (FL), Índice de Refração (IR), PDA, ELSD e CAD, e o de espectrometria de massa. Com relação ao UV, eles são os mais utilizados pois são os mais baratos e aceitam o uso de gradiente. Ademais, o detector mede a absorção de luz pelo analito em comprimento de onda já programado. O princípio de detecção UV pode ser explicado pela lei de Lambert-Beer, onde  $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ , que relaciona diretamente a concentração da espécie com a sua absorvância (SKOOG, 2004). O detector PDA permite determinar as absorvâncias dos compostos em diferentes faixas de comprimentos de onda (A3 ANALITICA, 2019). Com relação ao detector de FL, eles são muito sensíveis, seletivos e com alta especificidade, podendo ser de 10 a 1000 vezes mais sensíveis que o UV (A3 ANALITICA, 2019). Os detectores FL detectam a emissão de fluorescência da amostra a partir da excitação no comprimento de onda adequado. Neste processo o analito absorve energia no estado fundamental e passa a pular estados energeticamente excitados, que depois, retornam ao estado fundamental liberando fótons, cuja energia é detectada pelo detector. Com relação ao detector IR, ele detecta as mudanças dos índices de refração dos eluentes, assim, quanto maior a diferença do índice de refração na fase móvel do analito, maior o sinal detectado (A3 ANALITICA, 2019). O detector IR é bastante versátil, tem moderada compatibilidade comparada ao UV e é sensível a temperatura. O detector ELSD é usado quando o UV é restrito, assim como o CAD. Por fim, o detector de espectrometria de massa (MS) detecta os fragmentos específicos do analito,

sendo possível a sua identificação (MACCHIONE, E. L. A. et al, 2008). Em suma, um bom detector para o HPLC deve ter algumas características, sendo elas a alta sensibilidade, linearidade, ser pouco sensível às variações de temperatura, ter uma boa reprodutibilidade e ser preciso.

## 1.7. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

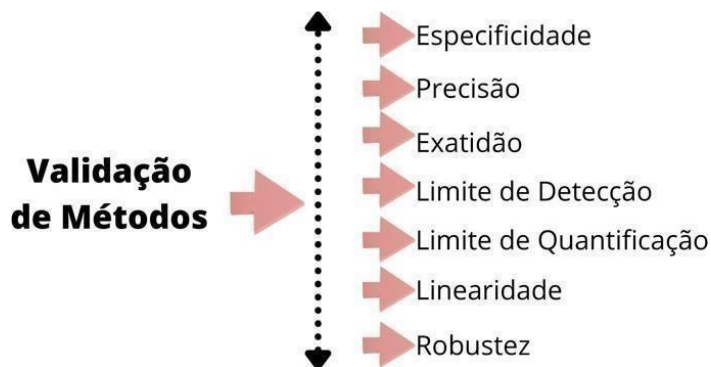
O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação e implementação de um método já normalizado ou descrito na literatura técnica, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório, isto é, avalia se esse método é válido e eficaz em análises de laboratórios a partir de detecção de analitos. A esse processo, habitualmente, denomina-se validação.

O objetivo da validação consiste em demonstrar que um determinado método analítico proposto é adequado ao que se propõe, ou seja, garantir que a metodologia analítica seja exata e precisa, além de estável, reprodutível e flexível para uma faixa específica de uma substância que se espera identificar ou quantificar. Em suma, validar significa garantir que as análises de rotina reproduzam valores consistentes se comparadas a um valor de referência (ANALYTICA, 2020).

Em virtude da importância da validação de um método de análise, o primeiro passo e de todos o mais importante para se ter sucesso é o planejamento do processo de validação do método desenvolvido ou adaptado. Com relação as etapas de validação, elas se referem a: 1) definir o objetivo do método em validação; 2) definição dos critérios de aceitação e dos parâmetros analisados, assim como os valores de referência para serem comparados; 3) definição de quantos e quais serão os testes preliminares realizados para definir a conformidade do sistema, ou seja, verificar as condições cromatográficas do HPLC; 4) definir o plano de validação, bem como os experimentos/testes realizados para a validação do método e; 5) Relatar os resultados dos critérios avaliados com todos os detalhes (ANALYTICA, 2020). Segundo o INMETRO (2010), depois de realizado as etapas de validação, é necessário que o laboratório e ou/indústrias farmacêuticas implementem um procedimento operacional padrão (POP) para que o método seja aplicado de maneira mais simples e sem causar ambiguidade quanto à sua aplicação.

Para um método ser considerado confiável para a detecção de um analito, é imprescindível que o método utilizado para essa finalidade seja validado de acordo com diretrizes de agências reguladoras. No Brasil, duas agências são credenciadas para verificar a competência de laboratórios e indústrias e ensaios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade industrial (INMETRO). Esses órgãos disponibilizam de guias para o procedimento de validação de metodologias analíticas, sendo a Resolução ANVISA RE n 166 de 2017 e o INMETRO-DOQ-CQCRE-008 de 2010, respectivamente.

Figura 4 – Critérios para a validação de métodos analíticos



Fonte: Autoria própria

Com relação à validação do método, ou seja, a segurança da confiabilidade do método, são analisados os limites de detecção e limite de quantificação, especificidade e seletividade, precisão e exatidão e a linearidade, que estão de acordo com o ICH Q2 R1 de 2005. A sensibilidade é definida como a detecção e quantificação do analito utilizando a concentração mínima dele e, para ser sensível, as mínimas variações de concentrações devem emitir um sinal satisfatório (FRANCISCO, 2008). Em contrapartida, o limite de detecção (LD) é quando a mínima concentração do analito pode ser detectada, mas não quantificado. Com relação ao limite de quantificação (LQ) é a quantidade mais baixa do analito que pode ser quantificado com exatidão e precisão a partir da curva de calibração. No que diz respeito à especificidade e a seletividade, a especificidade é definida como a capacidade de avaliar um analito em uma amostra que tenha interferentes, mas a detecção tem que ser inequívoca, ou seja, a detecção é específica para aquele analito, isto é, é a capacidade de um método detectar um analito em presença de outros, e em métodos cromatográficos, para realizar a análise de sensibilidade, deve-se ter precaução quanto a pureza do pico através de detector do HPLC, como o detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massa (ANVISA, 2003). Já a seletividade é definida como a capacidade de detectar diferentes analitos simultaneamente de uma amostra (BRESSOLLE et al, 1996). Ademais, a precisão e a exatidão são parâmetros importantes, visto que determinam a aceitação da análise. A precisão é uma medida de dispersão que caracteriza os valores ao redor da média, no qual pode ser avaliada por repetitividade e reprodutibilidade (EMEA, 1995). A repetitividade é a análise sob as mesmas condições para avaliar o resultado esperado. Por sua vez, a reprodutibilidade, segundo a ISO, é o grau de concordância entre os valores obtidos pela mesma amostra e pelo mesmo método, porém em condições diferentes, como operador e maquinário, para um mesmo resultado esperado (HARTMANN et al., 1994). Em contrapartida, a exatidão é a capacidade de um resultado ser o mais próximo possível do valor real. Outro fator importante é a linearidade, que é definido como a capacidade de obter resultados linearmente proporcionais a concentração de analito na amostra dentro de um intervalo determinado, e essa é pode ser considerada a menor concentração do analito que é detectado, não necessariamente sendo quantificado, além disso, a concentração deve ser suficientemente distinguida do sinal-ruído

(INMETRO, 2010).

Sendo assim, no que diz respeito ao controle de qualidade de fármacos utilizando a técnica de HPLC, os cromatógrafos são utilizados para avaliar se os produtos estão em conformidade com o preconizado pelas normas estipuladas pela farmacopeia e pelos órgãos reguladores, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), justamente por ser uma técnica caracterizada pela alta versatilidade, sensibilidade e reprodutibilidade, além de obter resultados confiáveis de acordo com os parâmetros analíticos analisados.

## 1.8. ADEQUABILIDADE DE SISTEMA

A resolução, um parâmetro que deve ser levado em consideração em análises e é caracterizado por ser de adequabilidade de sistema, é a capacidade da coluna cromatográfica em separar os picos de interesse com a linha de base. Além disso, a resolução pode ser influenciado por três fatores, que incluem a retenção ( $k$ ), seletividade ( $a$ ) e a eficiência ( $N$ ). Sendo assim, a resolução pode ser melhorada quando se aperfeiçoa esses fatores (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

Ademais, a retenção tem uma influência significativa em valores  $k$  pequenos e é caracterizada pelo tempo que o soluto que tem o analito de interesse passa nas fases estacionária e móvel; a seletividade impacta muito a resolução, uma vez que mudanças pequenas na seletividade geram grandes impactos na resolução, além disso, pode ser definido como o tempo ou a distância entre dois picos; e a eficiência, ou também chamada de pratos teóricos tem como característica o poder de separação dos picos de interesse no que diz respeito à coluna, bem como sinalizam o desempenho de diferentes colunas (NETO, A.J, 2010)

Com relação aos fatores, eles podem ser alterados para o aperfeiçoamento da resolução. O valor de retenção pode ser influenciado pela alteração da fase móvel, já com relação a seletividade, ela pode ser impactada quando se altera a fase móvel, estacionária ou temperatura, entretanto, a eficiência é influenciado pelo comprimento da coluna cromatográfica e pelo tamanho da partícula (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016). De acordo com Neto (NETO, A.J, 2010), a equação 1 descreve os fatores que influenciam na resolução.

Equação 1 – Fórmula para obtenção da resolução

$$R_s = \frac{k}{k+1} \times \frac{a-1}{a} \times \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Retenção    Seletividade    Eficiência

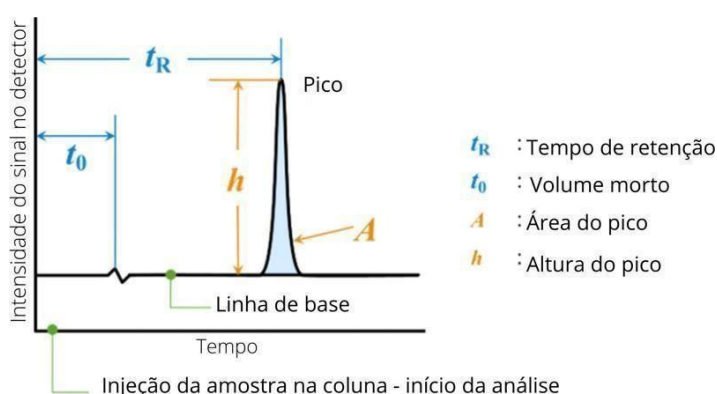
## 1.9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após extensa busca bibliográfica acerca do tema, foi verificado o quão importante é o controle de qualidade de fármacos, uma vez que o mesmo afeta diretamente a saúde do usuário, além disso,

com a não qualidade de fármacos através de técnicas não validadas ou de critérios analíticos não atendidos, pode ocasionar resultados desastrosos e perdas financeiras irreparáveis para o fabricante (RIBANI, Marcelo, et al, 2004). O tema explorado é de extrema relevância pois o paracetamol é um medicamento isento de prescrição médica, sendo considerado um MIP, portanto, a sua compra é de livre acesso e por isso o seu uso pode ser feito indiscriminado, e afetando conseqüentemente as águas e solos, visto que causa a sua poluição (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021), bem como o uso constante do medicamento contendo o ativo paracetamol pouco acima do recomendado leva a lesão severa do fígado (LOPES, 2011, p.1). Sendo assim, os parâmetros analíticos do HPLC devem estar validados a fim de exercer o controle de qualidade da forma mais fiel.

Para a quantificação do fármaco paracetamol de metodologia em validação, ela pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição de padrão. Entretanto, o mais utilizado para a quantificação do paracetamol é a padronização externa. O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Além disso, essa comparação de áreas é realizada em diferentes concentrações do padrão e da amostra de paracetamol a ser analisada e, posteriormente, é obtido o cromatograma equivalente a cada concentração. A partir da área, é calculado a concentração do ativo na amostra. Este método é sensível a erros de preparo das amostras e dos padrões e de injeção das soluções padrão e das amostras e por isso devem ser feitas em replicatas de cada análise cromatográfica (RIBEIRO, N. M; COSTA, J.V.R, 2008).

Figura 5 – Parâmetros analisados em cromatogramas



Fonte: Trindade, M.A.G, et al, 2010.

Para a análise por HPLC com finalidade de determinação de paracetamol, utiliza-se os seguintes parâmetros, mais comumente: coluna com fase estacionária de octadecilsilano, metanol como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min, comprimento de onda de detecção no UV de 210 a 270 nm e tempo da corrida de 10 minutos (RIBEIRO, N. M; COSTA, J.V.R, 2008).

Com a metodologia desenvolvida para a quantificação do ativo paracetamol, os parâmetros



analíticos devem ser avaliados e devem estar de acordo com a especificação para a garantia da qualidade da técnica. Para o Euracham Working Group, a validação é conceituada como "é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer", assim, para o WHO ela é definida como "Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado".

A validação de técnicas pode ser feita através de duas formas, podendo ser a validação no laboratório (validation in house) ou validação completa (full validation). A validação no laboratório tem como objetivo a validação de uma técnica desenvolvida localmente ou para verificar que um método adotado de outra origem, ou seja, de outro local, pode ser aplicado. Na validação no laboratório são avaliados todos os critérios analíticos, exceto a reprodutibilidade. No que se refere a validação total, ela é avaliada em diferentes contextos e em diferentes laboratórios com a mesma finalidade, assim, a metodologia só é aceita como oficial quando os critérios da validação forem atendidos em todos os contextos e em diferentes laboratórios, além disso, diferente da validação no laboratório, a reprodutibilidade deve ser avaliada para garantir a confiança do método. Entretanto, de acordo com a ISO ("International Standard Organization"), são necessárias quantidades mínimas de laboratórios e de testes para a validação da técnica analítica (Thompson, M. et al, 2002).

Com isso, autoridades nacionais devem fazer a inspeção aos laboratórios credenciados, assim como autorizá-los para validar uma técnica, e dentro do cenário Brasileiro, as duas autoridades responsáveis por essa função é a ANVISA e o INMETRO. Ambas autoridades disponibilizam documentos que constam os testes que devem ser avaliados na validação analítica de alguma técnica, evidenciados na Resolução ANVISA RE nº 166 de 2017 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2010.

Tabela 1 – Parâmetros de Validação do INMETRO e ANVISA

**Parâmetros de Validação do INMETRO e ANVISA**

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
Limite de Detecção	Curva de calibração
Limite de Quantificação	Limite de Detecção
Sensibilidade	Limite de Quantificação
Exatidão	Exatidão
Precisão <ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetitividade</li> <li>• Precisão intermediária</li> <li>• Reprodutibilidade</li> </ul>	Precisão <ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetitividade (intracorrída)</li> <li>• Precisão intermediária (intercorrída)</li> <li>• Reprodutibilidade (inter-laboratorial)</li> </ul>
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (EMANUELLI T., SCANDIUZZI M, 2000). Seletividade/especificidade é o primeiro critério analítico que deve ser avaliado para determinada análise, pois o mesmo, se não contemplado em uma metodologia, fará com que os outros critérios analíticos fiquem comprometidos no que diz respeito ao seu resultado, visto que se não há seletividade na metodologia, os parâmetros subsequentes terão um resultado discrepante do preconizado (RIBANI, Marcelo et al, 2004).

A seletividade consegue quantificar ou identificar o analito de interesse mesmo com a presença de interferentes, como diluente e excipientes, entretanto, consegue também identificar outros componentes além do componente de interesse, mas consegue distinguir entre os dois. Ademais, quando o método leva em consideração apenas a resposta do analito de interesse, sem quantificar outros componentes ou interferentes, denomina-se o parâmetro como especificidade, pois o método é específico apenas para aquele analito de interesse. A seletividade do método para a determinação de paracetamol é demonstrado pela boa resolução do pico do ativo paracetamol (ACHEAMPONG, Akwasi et al, 2016). Devido ao fato de poucos métodos terem respostas apenas específicas e por haver muitas confusões com os termos especificidade e seletividade, a IUPAC recomenda a utilização do termo seletividade. (RIBANI et al., 2004). A seletividade pode ser obtida por meio de diferentes vertentes: comparando o princípio ativo do componente de interesse com um padrão considerado puro, comparando o princípio ativo sem a matriz de interesse ou com a adição do padrão, sendo que para a verificação da seletividade em análises que envolvem o paracetamol, o mesmo é feito a partir da comparação entre um padrão puro (CHANDRA, Preeti et al, 2012). ). A fórmula para avaliar a recuperação do ativo na amostra é calculado pela equação 2:

Equação 2 – cálculo para recuperação

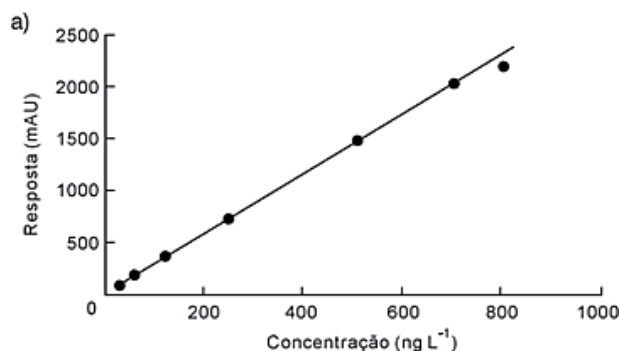
$$\%Recuperação = \frac{[AF] - [A]}{[P]} \times 100$$

Onde  $[AF]$  é a concentração da amostra com padrão;  $[A]$  a concentração da amostra;  $[P]$  o incremento da concentração esperado pela adição do padrão.

Com relação ao parâmetro de linearidade, ele é caracterizado como o critério que correlaciona os resultados encontrados com a concentração do composto analisado, ou seja, os resultados encontrados devem ser diretamente proporcionais a concentração do composto ou princípio ativo na solução. Os resultados em análises de paracetamol que são encontrados e que são levados em consideração é a altura ou a área do pico de interesse que sai no cromatograma, assim a leitura é realizada em triplicata sob diferentes concentrações do analito paracetamol, no qual é criado

uma linha de calibração levando em consideração a área do pico e a sua concentração, cujo é definitivo o coeficiente de relação R (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021). A relação matemática é caracterizada na curva analítica, como a de exemplo a seguir:

Figura 6 – Curva analítica concentração vs resposta



Fonte: RIBANI, Marcelo et al, 2004.

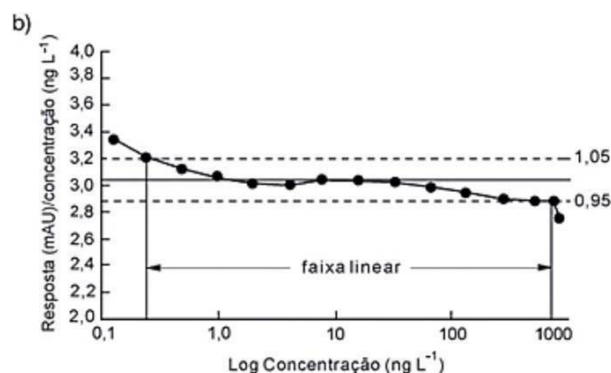
Para a realização da curva analítica, devem ser levados em consideração diferentes concentrações do analito paracetamol e seu respectivo resultado com relação a área. As diretrizes da ICH e da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados, e o desvio padrão entre as injeção não deve ser maior que 5%. A equação da curva pode ser expresso como a equação 3.

Equação 3 – equação da curva

$$y = a + bx$$

Onde y é a resposta medida de acordo com a finalidade do método; x a concentração; a, a interseção com o eixo y, b é o declive da curva analítica. O coeficiente de relação (R) é dado a partir da relação do sinal obtido e as concentrações, e trás a informação da qualidade da curva analítica obtida. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a *faixa linear dinâmica*.

Figura 7 - Demonstração da faixa linear a partir dos dados da curva analítica



Fonte: RIBANI, Marcelo et al, 2004.

Segundo o INMETRO e ICH, a precisão é quando os resultados encontrados com diferentes análises, seja por mesmas amostras de paracetamol em diferentes contextos, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas em uma método específico resultam em valores muito próximos de um valor central, ou seja, representam a dispersão dos resultados. A precisão da análise de paracetamol pode ser avaliada através do desvio padrão relativo (CHANDRA, Preeti et al, 2012). Sendo assim, a precisão pode ser avaliada a partir de três parâmetros diferentes, sendo a repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

No que diz respeito a repetitividade, ela é caracterizada como a análise feita pelo mesmo laboratório, mesmo profissional, sob mesmas condições e utilizando os mesmos equipamentos e, assim, representa a concordância entre os resultados. A ANVISA reconhece esse conceito como repetibilidade. A repetitividade é utilizada a mesma amostra em análises consecutivas para analisar o seu desvio padrão relativo. Além disso, há a precisão instrumental, o que difere esse parâmetro da repetitividade, é que a repetitividade faz novas análises a partir da mesma amostra, e a precisão instrumental utiliza da ferramenta inserção de várias injeções da mesma amostra já pronta para avaliar seu desvio padrão (RIBANI, Marcelo et al, 2004).

Para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão (INMETRO, 2003). A ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado. Assim, a avaliação da precisão levando em consideração a repetitividade é feita através de 6 repetições de análises intradia, ou seja, no mesmo dia (CHANDRA, Preeti et al, 2012).

Já com relação a precisão intermediária, ela é reconhecida como a mais verídica no que diz respeito às variações das análises, pois a mesma é caracterizada por ser feita em diferentes dias, diferentes contextos com diferentes analistas, porém, no mesmo laboratório (RIBANI, Marcelo et al, 2004), também podendo ser chamada de interdia (CHANDRA, Preeti et al, 2012). A precisão intermediária tem como objetivo verificar as discrepâncias de um método feito pelo mesmo laboratório, assim, avalia se o mesmo método dará em resultados semelhantes. O número de ensaios para avaliar a precisão intermediária segue os mesmos critérios da repetitividade (ICH, 1996).

Por fim, e não menos importante, a precisão pode ser avaliada pela reprodutibilidade. A reprodutibilidade é a capacidade do resultado se repetir em diferentes condições e por diferentes laboratórios. A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual. Além disso, a precisão está intimamente relacionada com erros laboratoriais.

Outro critério analítico que deve ser avaliado é a exatidão. A exatidão de um método analítico deve ser obtido por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método analítico

em estudo com um valor dito de referência e aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). Ademais, ela deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou sejam 3 (três) concentrações, sendo baixa, média e alta com 3 (três) réplicas de cada nível (INMETRO, 2003). Dessa forma, a exatidão de métodos para a determinação de paracetamol é avaliada usando um mínimo de nove determinações, realizando estudos de recuperação pelo método de adição padrão, em três níveis de concentração cobrindo a faixa especificada, sendo que a recuperação resultante deve dar um valor entre 98% a 102% (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021), a ANVISA estipula que a recuperação de ativos devem ser de 95% a 105%. Para se quantificar a exatidão, ela é dada pela relação entre a concentração média experimental com a concentração teórica, dado pela equação 4:

Equação 4 – cálculo para obtenção da exatidão

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental}{Concentração\ teórica} \times 100$$

O limite de detecção (LD), outro critério analítico, é representado como a menor quantidade do analito de interesse que pode ser qualificado, ou seja, detectado, mas não necessariamente quantificado, sendo que devem ser detectados com exatidão e precisão (INMETRO, 2003). Para se calcular o limite de detecção de um método que tem como finalidade a determinação do fármaco paracetamol, é utilizado o método de cálculo baseado em parâmetros da curva analítica. Ademais, em métodos que utilizam da detecção do ativo paracetamol, o limite de detecção é considerado aquele que deve ser 3 vezes maior que o ruído (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021). O método baseado nos parâmetros da curva analítica utiliza da equação a seguir, no qual o DP é representado como o desvio padrão da resposta que se tem é o IC é a inclinação da curva, ou seja, o coeficiente angular da reta (RIBANI, Marcelo et al, 2004). A equação 5 descreve como é encontrado o limite de detecção.

Equação 5: Cálculo para o limite de detecção

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Diferente do limite de detecção, o limite de quantificação é a menor concentração do analito de interesse que pode ser quantificada, utilizando também dos parâmetros de exatidão e precisão.

Com isso, tem-se que os critérios de limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão estão intimamente relacionados e um critério influencia o outro, ou seja, quando precisa aumentar o nível de exatidão, deve-se aumentar a concentração mínima para o LQ, ou, da mesma forma que diminui a concentração do LQ, a precisão do método em questão decai proporcionalmente (INMETRO, 2003).

Com a finalidade de se calcular o LQ do paracetamol, utiliza-se também de métodos baseado em critérios analíticos da curva. Ademais, o limite de detecção é considerado aquele em que é 10

vezes maior que o ruído do paracetamol (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021). A fórmula para avaliar o limite de quantificação é apresentado a seguir pela equação 6 (RIBANI, Marcelo et al, 2004).

Equação 6 – Cálculo para o limite de Quantificação

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Para a determinação do LQ e LD do paracetamol, o método baseado nos critérios analíticos é o mais confiável, uma vez que se baseia em dados estatísticos e por isso, mais seguros. O método sinal-ruído não é muito utilizado em técnicas de separação, como as utilizadas no HPLC, uma vez que o método é subjetivo, já que a curva analítica é construída a partir da área do pico de interesse, e não somente com o sinal do detector. Além disso, picos maiores resultam em menores LQ e LD (RIBANI, Marcelo et al, 2004).

Por fim, o critério analítico, a robustez, é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico (INMETRO, 2003). Ademais, A robustez para métodos para a determinação do ativo paracetamol é a capacidade de permanecer inalterado pelas variações deliberadas nos parâmetros do método, como temperatura da coluna, comprimento de onda analítico, taxa de fluxo e composição da fase móvel (% Metanol, pH, concentração de fosfato). Mudanças nesses parâmetros em torno de 10% de seu valor ótimo não afetam (< 5,0%) o sinal analítico (área do pico) fornecido pelo detector (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021). Com relação ao HPLC, as variações que podem ocorrer e que o método deve suportar para garantir o controle de qualidade são as variações do pH da fase móvel, variações na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperaturas de coluna e fluxo da fase móvel. Entretanto, a robustez do método de determinação do paracetamol pode ser avaliado alterando esses critérios, como alterar o comprimento de onda para 250 nm, alterar a taxa de fluxo entre 0,8 e 1,2 mL/min, bem como alterando a composição da fase móvel, isto é, aumentando ou diminuindo a concentração de metanol ou outro reagente que componha a fase móvel (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021). Além disso, o tipo de detector também pode ser alterado para verificar a robustez, como a exemplo alterando para o detector PDA. Em suma, mudanças no pH da fase móvel ( $\pm 0,2$  unidades de pH), composição do metanol na fase móvel ( $\pm 2,0\%$ ), comprimento de onda ( $\pm 2,0$  nm) e temperatura ( $\pm 3,0$  °C) são parâmetros alterados para verificar a robustez do método desenvolvido para a determinação do paracetamol e, caso o resultado não seja divergente do método original desenvolvido, significa que o método desenvolvido mostrou um alto nível de robustez (ACHEAMPONG, Akwasi et al, 2016). Para métodos quantitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado com o mesmo critério descrito na exatidão, e para métodos qualitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado em sua interferência na resposta analítica (RDC n 166, 2017).

Para determinar a robustez de um método, o INMETRO determina que se faça o teste de Youden (INMETRO, 2003). O teste não só avalia a robustez do método, como também indica a ordem dos fatores que influenciam no resultado final. O teste é feito com 8 ensaios com combinações dos efeitos que podem influenciar, e assim, é verificado a ordem de influência e se realmente a variação é reflexo dos fatores.

## **1.10. JUSTIFICATIVA**

A técnica de HPLC é empregada tanto para a identificação de um ativo quanto para sua quantificação, por isso, o HPLC está sempre associado ao controle de qualidade de fármacos, devido a sua excelente acurácia, elevada detectabilidade dos analitos e reduzido tempo de análise. Para isso, os critérios analíticos que envolvem os métodos precisam estar validados, para assim, ter um controle de qualidade confiável para os resultados das análises que são requeridas em uma indústria farmacêutica.

Outrora, em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde o desafio de possuir medicamentos de qualidade inferior e a falsificação de medicamento é enorme, há a necessidade de métodos que sejam precisos, econômicos, fáceis de colocar em prática, rápidos e que exijam o uso de equipamentos não muito sofisticados para facilitar a identificação e quantificação dos componentes de um medicamento, e que mesmo seguindo esses critérios, tenham segurança e confiabilidade perante seus resultados (ACHEAMPONG, Akwasi et al, 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

Realizar uma revisão bibliográfica integrativa sobre a utilização da técnica de HPLC para o controle de qualidade do fármaco paracetamol com metodologias desenvolvidas e validadas por diferentes autores.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- 2.2.1 Discutir sobre a importância de se fazer o controle de qualidade dos fármacos.
- 2.2.2 Apresentar os motivos da utilização da técnica de HPLC.
- 2.2.3 Apresentar detalhadamente sobre como é feito o controle de qualidade propriamente dito e quais são as condições cromatográficas necessárias para avaliar os critérios analíticos utilizados para a validação e aceitação de métodos que envolvem a detecção e/ou a quantificação do ativo paracetamol.

## **3. METODOLOGIA**

No presente trabalho, será feito uma revisão integrativa bibliográfica por meio do software VOS

viewer 1.6.15. Os dados foram extraídos da plataforma Scopus e Microsoft academic. Os resultados serão coletados para classificar os termos com maior taxa de ocorrência, datas de publicação e autores com mais estudos na área. O período escolhido para a pesquisa irá compreender o período de 2005 a 2022, usando as palavras chave HPLC, drug, quality control, paracetamol, acetaminofeno, analytical and validation. O software VOS viewer irá gerar um mapa multidimensional que agrupará metadados bibliométricos em clusters intimamente relacionados. Ademais, foram gerados 124 artigos, entretanto, os artigos selecionados foram aqueles que trazem a identificação do ativo paracetamol diante de um desenvolvimento de método e os resultados da sua validação analítica por meio do cromatógrafo líquido de alta eficiência, restando 8 artigos, não sendo excluídos os artigos que trabalham com medicamentos mistos, ou seja, que possuem mais de um ativo em sua formulação, em virtude do paracetamol ser feito em formulações com combinações, como exemplo, combinado à cafeína, maleato de clorfeniramina, aceclofenaco e etc.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Após extensa busca bibliográfica acerca do tema, foram coletados trabalhos na área que tratam da validação de métodos e seus critérios analíticos para a quantificação ou a detecção do ativo paracetamol em medicamentos, sendo que a maior parte dos artigos encontrados foram de trabalhos que trazem medicamentos que possuem além do paracetamol, outro ativo em sua composição, ou seja, medicamentos mistos, uma vez que o paracetamol é um ativo que é bastante combinado a outro ativo, como a cafeína, por exemplo, por isso, são encontrados vários estudos com metodologias de separação para ambos. A maioria das formulações de medicamentos multicomponentes geralmente contém dois ou mais ingredientes ativos que são responsáveis por uma atividade terapêutica combinada do medicamento. Este conceito é benéfico quando os agentes seletivos possuem diferentes mecanismos de ação que proporcionam eficácia aditiva ou sinérgica (Li et al. 2010). Há um aumento na produção de formulação de medicamentos multicomponentes devido ao aumento da eficácia, aumento da resistência de microrganismos a formulações de componentes únicos e dependência e/ou tolerância, e isso levou ainda ao aumento da falsificação e adulteração de medicamentos (Mackey e Liang 2011; Newton et al. 2006).

Dentre os artigos selecionados, destacaram-se 8 trabalhos que propuseram uma metodologia mais completa e com resultados concretos. Os autores dos textos, com a finalidade de escolher a melhor metodologia que atendesse o objetivo principal do seu trabalho, que seria a identificação do ativo, utilizaram de diversos insumos e condições cromatográficas para a realização do mesmo.

Com relação ao artigo dos autores Clausen, D. N. et al. com o trabalho intitulado Desenvolvimento de Método por CLAE para Quantificação de Orfenadrina, Paracetamol e Cafeína em Formulações Farmacêuticas, o trabalho traz um método para a separação dos ativos em dois



medicamentos de marcas não citadas com os 3 ativos em sua composição. Diante disso, são selecionados vários critérios para identificar e separar os ativos com a melhor resolução entre os picos. O artigo teve como proposta a metodologia uma vez que em alguns casos a Farmacopeia não possui um procedimento padrão para a determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas. O método utilizou as especificações analíticas a seguir para a sua validação: Coluna C18 com temperatura de 25 °C, dimensões 250 mm × 4,6 mm × 5,0 µm, comprimento de onda de detecção de 215 nm, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,2 mL/min e detector DAD com faixa de varredura entre 190 a 800 nm, sendo o tempo de análise de 7 minutos e retenção do ativo paracetamol no tempo 3,85 minutos. A fase móvel escolhida foi a mistura de água e acetonitrila, na proporção 80:20 e pH ajustado para 2,5.

Com relação aos critérios analíticos e seus resultados a partir das especificações usadas, têm-se que: o critério analítico de linearidade foi desenvolvido através da curva analítica, sendo que a mesma foi montada a partir da intercessão entre a área do pico observado no cromatograma com a sua concentração real. Teve resposta de linearidade até uma concentração de 200 mg/L de paracetamol. A equação da reta encontrada resultou em  $\text{mAU} = 31,4 \times 10^3 [\text{PAR}/\text{mg L}^{-1}] - 17,2 \times 10^3$  e  $R^2 = 0,997$ .

O parâmetro de especificidade foi determinado através da comparação da amostra com uma solução padrão injetada e com uma solução placebo preparada com os excipientes do medicamento, sendo comparado as áreas e os picos característicos. Observou-se um resultado específico para o ativo paracetamol, em virtude de que os outros picos não interferiram na detecção do pico do analito. Em termos numéricos ocorreu uma variação de 0,3% nas áreas dos picos, este resultado pode ser observado na figura 8 onde temos a solução padrão (A) e a amostra real do medicamento (B).

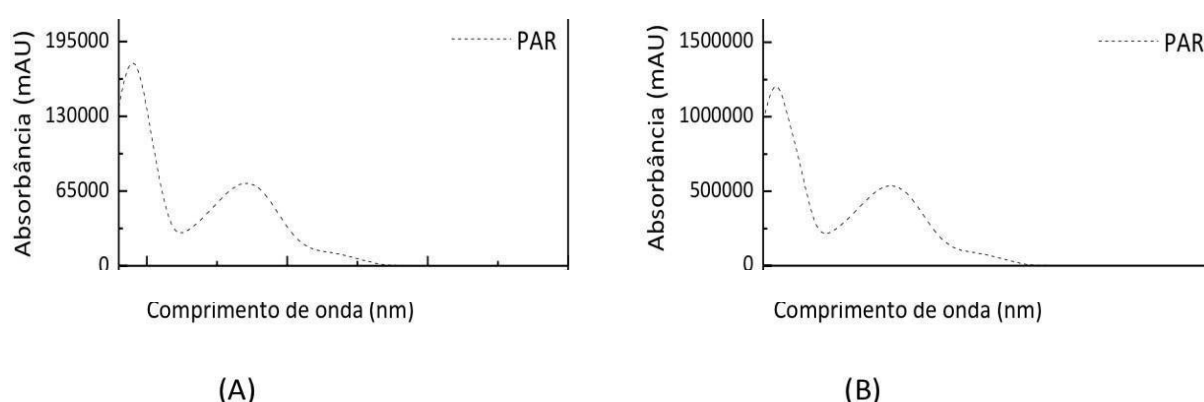


Figura 8 – Comparação entre cromatogramas da solução padrão e amostra

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados a partir do cromatograma e levando em consideração a relação sinal / ruído, sendo que o LD é considerado 3× e LQ 10× o sinal ruído, os resultados encontrados para LD e LQ são 0,05 e 0,17 mg/L.

Como mencionado, a precisão pode ser avaliada a partir do intra dia e inter dia. O Intra dia

foi avaliado com 2 concentrações diferentes de paracetamol, as quais foram 5,0 mg/L e 100 mg/L. A repetibilidade foi feita a partir de 10 injeções, assim, o desvio padrão para a concentração de 5,0 mg/L foi de 4,02%, e o DPR para a concentração de 100 mg/L foi de 0,22%. Com relação ao inter dia, as mesmas concentrações foram utilizadas e o DPR encontrado foram de 0,32% e 0,49%, respectivamente.

Para avaliar a exatidão do método o trabalho utilizou a técnica de padronização externa. O critério de exatidão do método foi observado a partir da adição de padrão, sendo avaliado a taxa de recuperação do mesmo padrão, ou seja, é feito o cálculo para saber o que foi encontrado na amostra em relação ao teórico adicionado. Assim os valores de recuperação variaram de 98,0 a 100,4% para o Medicamento A e de 98,2 a 101,8% para o Medicamento B.

Os critérios que foram alterados para avaliar o nível de robustez do método foram as variações de pH da fase móvel em 10%, que está intimamente ligado ao tempo de retenção, assim, observou-se que mudando o pH da fase móvel, o tempo de retenção também foi alterado, entretanto a área do pico de paracetamol continuou constante. Outra alteração no método foi com relação à concentração do solvente orgânico na fase móvel. Observou-se que aumentando a concentração da acetonitrila na fase móvel, promovia uma menor interação do paracetamol com a fase estacionária, e conseqüentemente o tempo de retenção aumentava.

Os resultados encontrados para com os critérios analíticos avaliados com relação as condições cromatográficas do método desenvolvido pelos autores se encontram abaixo na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo dos resultados encontrados pelo autor Clausen, D. N. et al.

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: Clausen, D. N. et al (Clausen, D. N. et al, 2015)	
Detector:	DAD (190-800nm)
Coluna:	C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	25 °C
Fase móvel:	Água: Acetonitrila (80:20)
Comprimento de onda:	215 nm
Volume de injeção:	20 µL
Fluxo:	1,2 mL/min
Tempo de retenção:	~ 3,8 minutos
Critérios analíticos avaliados	

Linearidade:	$mAU = 31,4 \times 10^3 [PAR/mg L^{-1}] - 17,2 \times 10^3$ e $R^2 : 0,997$
Robustez	De acordo
Precisão	Intra dia: 4.02% e 0,22% e Inter dia: 0,32% e 0,49%
Exatidão (Recuperação)	Medicamento A: 98,0% - 100,4% Medicamento B: 98,2% - 101,8%
LD	0,05mg/L
LQ	0,17mg/L
Especificidade	De acordo
Observação: O método proposto por Clausen, D. N. et al se mostrou preciso, rápido, específico e exato.	

Sendo assim, o método desenvolvido pelos autores Clausen, D. N. et al condiz com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira, uma vez que as variações da concentração de Paracetamol devem estar dentro da faixa de 95% a 105%. Além disso, o método trouxe bons resultados para determinar o ativo do paracetamol, visto que o teor ficou dentro das especificações exigidas pela farmacopeia. Entretanto, o método desenvolvido não traz muitas alterações para avaliar a robustez com clareza e confiabilidade, assim como não trouxe resultados de adequabilidade de sistema avaliados, além de não trazer muitos detalhes sobre as preparações das soluções, equipamento utilizado, bem como o detector, sendo considerado um artigo superficial.

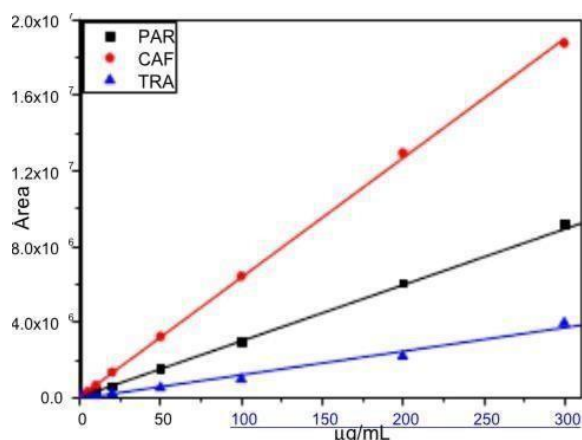
Outrora, divergente do mencionado acima, demais artigos trazem mais detalhes com relação aos resultados encontrados e maiores variações da análise para avaliar a robustez com maior precisão. O autor PEREIRA, Fernando J. et al (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021) desenvolveu uma metodologia com diferentes aspectos de análise, sendo o trabalho intitulado *Development and Validation of an RP-HPLC-PDA Method for Determination of Paracetamol, Caffeine and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations*. O trabalho em questão utilizou para a validação do método os seguintes instrumentos, com base na estratégia *one-variable-at-a-time*: HPLC com detector PDA, coluna C18 de especificação 4,6 mm × 250 mm × 5,0 μm e fase móvel composta por metanol em pH ácido 4,5, porém, faz testes com metanol compondo a fase móvel uma vez que não se tem entendimento por completo perante a interpretação do seu comportamento, ademais, o fluxo foi de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 20 μL e a faixa de detecção do comprimento de onda é de apenas 210 nm, uma vez que o PDA não permite a seleção do melhor comprimento de onda simultaneamente na mesma amostra. Ainda sobre a fase móvel, foram utilizados metanol e tampão fosfato em diferentes frações, sendo os melhores resultados obtidos com a proporção 40:60. Foi verificado que a eluição do paracetamol foi rápida, com cerca de 3 minutos, diante do fato da estrutura do ativo ser estruturalmente curta e com poucas ligações livres, além disso, a altura do pico cresceu

relativamente pouco com o aumento da concentração de metanol na fase, assim como a largura do pico diminuiu, contudo, a área continuou constante. Já com relação ao fosfato, tem como objetivo aumentar força iônica da fase móvel. No que diz respeito ao fluxo, é um fato importante pois interfere no tempo de retenção, posto que a área do pico cresce mais rápido que a altura.

No que concerne ao fator de resolução, verificou-se que o K' diminuiu a medida que a área do pico aumentava, tendo relação com a concentração, todavia, não apresentou alteração com a variação de pH, fato que altera o tempo de retenção do pico. Além disso, não só a resolução como a adequação do sistema também foi verificada, dado que foram observados picos simétricos com fator de simetria dentro da especificação. Contudo, o fator de simetria diminuiu com o aumento da concentração de fosfato, pH e metanol.

No que diz respeito aos critérios analíticos para a validação em si do método, eles foram analisados e os resultados reportados. A linearidade foi traçada mediante a concentração do ativo e sua área do pico, e encontrou-se que a curva analítica fica melhor representada quando em pHs ácidos. Foram usadas 9 amostras para traçar a curva analítica em 3 diferentes concentrações, sendo realizada a análise em triplicata (Figura 9).

Figura 9 – Intercessão entre as áreas dos picos vs sua concentração



Referente ao critério de exatidão, foram feitas 9 determinações para avaliar a recuperação pela adição de padrão, sendo considerada a padronização externa. Os resultados de recuperação obtidos ficaram entre 98,47 e 101,10% e DPR inferior a 4%. Quanto ao limite de detecção e limite de quantificação, o trabalho exposto utilizou recomendações da IUPAC de cálculos para o LD (equação 7) e LQ (equação 8), sendo mostrados a seguir:

Equação 7 – Cálculo para o limite de detecção

$$LOD = \frac{3.29 S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{x/x}}}$$

Equação 8 – Cálculo para o limite de quantificação

$$LOQ = \frac{10 S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{x/x}}}$$

A robustez apresentou variações no comprimento de onda, sendo de 210 nm a 220 nm, assim como variações no fluxo, de 0,8 a 1,2 ambos com 3,0 injeções de concentração do paracetamol 100% e o DPR relatado, assim como composições diferentes da fase móvel, bem como diferentes concentrações do tampão fosfato e o pH. Verificou-se que o pico diminuiu com a vazão, ou seja, ele cresce linearmente com o inverso da razão. Para a especificidade, ela foi avaliada comparando linhas de calibração usando padrão do paracetamol, os quais foram colocados sob efeito da luz com a finalidade de degradação do mesmo, e mesmo assim, o método conseguiu detectar o ativo diante de outros interferentes que poderiam conter da degradação. A tabela abaixo traz os resultados encontrados com relação aos critérios de validação e as condições cromatográficas utilizadas pelos autores.

Tabela 3 – Resultados da validação analítica da metodologia

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: PEREIRA, Fernando J. et al (PEREIRA, Fernando J. et al, 2021)	
Detector:	PDA
Coluna:	C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	25 °C
Fase móvel:	Metanol : Tampão fosfato pH 4,5 (40:60)
Comprimento de onda:	210 nm
Volume de injeção:	20 µL
Fluxo:	1,0 mL/min
Tempo de retenção:	~ 3 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	$r^2 = 0,9987$
Robustez	De acordo
Precisão	DPR: 3,45%
Exatidão (Recuperação)	98,47% - 99,85%
LD	0,2 µg/mL
LQ	0,8 µg/mL
Especificidade	De acordo

Observação: O método proposto por PEREIRA, Fernando J. et al, se mostrou preciso, rápido e com resultados consistentes, entretanto, o autor não relata sobre adequabilidade de sistema e sobre a equação da reta encontrada.

Diante dos resultados encontrados relatados pelo autor PEREIRA, Fernando J. et al ( PEREIRA, Fernando J. et al, 2021), fica notório que o artigo é completo, com características de análise rápida e precisa, por ter um tempo de retenção curto (aproximadamente 3 minutos). Os dados do artigo foram consistentes e bem detalhados.

Em seu trabalho CHANDRA, Preeti et al., (CHANDRA, Preeti et al, 2012) traz um método de separação aceclofenaco, paracetamol e cloridrato de tramadol de formulações farmacêuticas, buscando os melhores critérios utilizados para detecção. Para a realização do trabalho, os autores utilizaram coluna C18 com especificações de 250 mm × 4,6 mm, 5,0 µm e temperatura de coluna ambiente. Os reagentes que compunham a fase móvel são tampão fosfato pH 6,0 e metanol, na proporção de 40:60 e fluxo de 1,0 mL/min passando pelo sistema HPLC, o comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e o volume da injeção foi de 20 µL. Com essas condições, o pico do paracetamol eluiu rápido, sendo o tempo de retenção encontrado de 3,0 minutos.

Com relação a precisão, o critério foi avaliado através da comparação entre o padrão e a amostra real preparada em três diferentes concentrações, isto é, de 130, 325 e 520 µg/mL. O método conseguiu alcançar a repetibilidade dado que o mesmo teste para a quantificação do ativo paracetamol foi realizado 6 vezes no mesmo dia, representando a precisão intra dia. A precisão inter dia também foi avaliada sob mesmas condições e em diferentes dias, tanto os resultados do intra dia quanto os resultados do inter dia foram avaliados através do DPR e do erro padrão (SE), sendo os resultados de DPR para intra dia e inter dia de 0,96% para ambos. Para a avaliação da robustez, as variações feitas pelos autores foram para com às variações de fluxo, composição da fase móvel e do pH do tampão e diferentes concentrações de amostras, além disso, foram utilizadas colunas de diferentes marcas, porém com mesmas especificações, os quais não obtiveram diferenças significantes com os resultados encontrados para as duas colunas de marcas distintas. Os outros critérios avaliados foram variados em três níveis, -1, 0 e 1, isto é, cada critério alterado seria variado em 1,0 unidade para verificar seus resultados e encontrar o melhor. Diante do comprimento de onda, o mesmo não foi alterado, porquanto que o comprimento de onda foi escolhido através da absorbância do paracetamol, e os autores consideraram que o melhor seria o de 270 nm. Ademais, o pH da fase móvel foi aumentado com a finalidade de aumentar o tempo de retenção, pois para alterar o pH, deve-se levar em consideração o pKa do ativo, que no caso é de 9,5. Além disso, foram testados tampões de acetato, citrato e fosfato e, posteriormente, após a análise dos cromatogramas obtidos com as diferentes composições da fase móvel, verificou-se que a composição dotada do tampão fosfato era a melhor, visto que apresentava picos mais simétricos. Outrora, ainda com relação a fase móvel, foi

aquela considerada a melhor a de pH 6,0 e em proporção 40:60 PBS:Metanol.

Ainda sobre a validação do método, o limite de Quantificação e de Detecção foram avaliados através da curva de calibração, utilizando as equações desenvolvidas a partir da mesma, seus resultados foram de 1,74 µg/mL e 0,57 µg/mL, respectivamente. Já a especificidade, a qual tem como finalidade avaliar inequivocamente um analito em presença de outros, foi interpretada e avaliada a partir da comparação da amostra com as soluções padrões e placebo, cujo detém de excipientes que poderiam interferir na detecção do paracetamol. Os cromatogramas resultantes foram avaliados nos quesitos retenção, resolução e fator de cauda e foi verificado que o pico de paracetamol não sofreu interferência do pico do branco e do placebo na amostra real, ou seja, o método desenvolvido pelos autores soube separar e detectar bem, tendo como tempo de retenção 3 minutos aproximadamente.

A validação da metodologia desenvolvida pelo autor CHANDRA, Preeti et al. seguiu os requisitos da ICH Q2 R1 de 2005, sendo seus resultados mostrados a seguir na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da validação de metodologia desenvolvida

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: CHANDRA, Preeti et al., (CHANDRA, Preeti et al, 2012)	
Detector:	PDA
Coluna:	C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	Ambiente
Fase móvel:	Metanol : Tampão fosfato pH 4,5 (40:60)
Comprimento de onda:	210 nm
Volume de injeção:	20 µL
Fluxo:	1,0 mL/min
Tempo de retenção:	~ 3 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	$Y = 16544x + 2993979$ e $r^2 = 0,9987$
Robustez	De acordo (-1, 0, +1)
Precisão	DPR: 0,96%
Exatidão (Recuperação)	99,57% ±0,37
LD	0,57µg/mL
LQ	1,74 µg/mL
Especificidade	De acordo

Adequabilidade de sistema	
Fator de capacidade (K')	1 < K < 10
Pratos teóricos	10375,86
Simetria	1,07
Seletividade	2,31
Observação: O método proposto por CHANDRA, Preeti et al. se mostrou preciso, rápido e com resultados confiáveis, uma vez que é verificado a adequação de sistema.	

Para que os dados sejam confiáveis, os autores utilizaram também da adequabilidade de sistema, os quais foram avaliados os critérios de pratos teóricos, simetria, fator de capacidade (K'), seletividade, HETP e resolução. Os resultados encontrados para a adequabilidade se encontram especificados na tabela 4.

Com relação a exatidão, ela foi mensurada através da padronização externa também, ou seja, injetou-se padrão e avaliou a sua recuperação, os resultados da recuperação foram de 99,57% variando de  $\pm 0,37$ , sendo interpretado como um dos melhores resultados de recuperação, de acordo com preconizado e em concordância com as alegações feitas no rótulo do medicamento. Por fim, a linearidade apresentou resultados satisfatórios quanto às concentrações de 130-520  $\mu\text{g/mL}$ , com a equação representada por  $y = 16544x + 2993979$  e  $R^2$  de 0,9987. Assim como os outros trabalhos, a linearidade foi desenvolvida com a intercessão entre área do pico e suas concentrações respectivas.

Portanto, os resultados apresentados pelos autores CHANDRA, Preeti et al. (CHANDRA, Preeti et al, 2012) deixam claro a precisão da técnica, assim como a mesma se apresenta específica, robusta e exata. As análises estatísticas comprovam que o método é adequado para análises de rotina, visto que é simples de executar. Ademais os autores apresentaram resultados concisos e com confiabilidade.

ACHEAMPONG, Akwasi et al (ACHEAMPONG, Akwasi et al, 2016) desenvolveram o trabalho que traz a validação de um método para a separação e detecção dos analitos de maleato de clorfeniramina, paracetamol e cafeína, visto que formulação de comprimidos de desses três ativos é um dos medicamentos de venda livre comuns usados para o tratamento de resfriado e tosse. Com relação à metodologia desenvolvida, suas especificações foram: coluna C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5,0  $\mu\text{m}$ ) com uma mistura isocrática de metanol e tampão fosfato dibásico 0,05 M em pH 4,0 na razão de 30:70 (v/v) para a fase móvel. Além disso, a temperatura da coluna foi mantida a 30 °C. A vazão foi de 1,0 mL/min e a detecção foi realizada por meio de um detector de UV no comprimento de onda de 215 nm. No que se refere ao tempo de retenção do paracetamol, o mesmo apresentou um valor de



aproximadamente 4 minutos, sendo considerado relativamente rápido.

Dessa forma, quanto à fase móvel desenvolvida, os autores selecionaram àquela com menor custo, com polaridade do solvente semelhante à do paracetamol e sendo solúvel no mesmo. Sendo assim, testaram reagentes como metanol, álcool isopropílico e clorofórmio na composição da fase móvel, além do mais, tampões fosfato em diferentes pHs foram testados. Com isso, os resultados encontrados pelos autores da melhor composição de fase móvel foram com metanol e fosfato dibásico 0,05M pH 4,0 nas proporções 30:70, pois, assim como o autores do artigo *Application of HPLC for the simultaneous determination of aceclofenac, paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical dosage form*, a fase móvel com metanol e tampão obteve cromatogramas com melhores resoluções de pico e simetria, além de ter o menor tempo de retenção para o paracetamol. Com relação a fase estacionária, que no caso é a coluna, a escolha foi feita através da polaridade da mesma, isto é, por motivos do paracetamol ser um ativo com características polares, o sistema no caso, deve ser em fase reversa, assim como os reagentes utilizados, assim, a escolha foi com a finalidade de reduzir o tempo de interação entre o analito e a fase estacionária, a fim de reduzir o tempo de análise.

Com relação aos critérios avaliados para a validação, a linearidade apresentou um resultado satisfatório com a metodologia criada, e seguiu o mesmo modo de criação dos outros autores, sendo a partir da intercessão entre a área do pico e suas diferentes concentrações. O coeficiente de correlação apresentou resultado  $R^2$  de 0,9997, sendo detectado faixas de concentração de 1,0 a 500  $\mu\text{g/mL}$ . No que se refere a exatidão, a recuperação encontrada foi de 98,66%, podendo variar em  $\pm 1,72$ , sendo que, o resultado encontrado foi a partir da recuperação de 3,0 concentrações diferentes e em triplicata, ou seja,  $n = 9$ . A precisão, também avaliada intra dia e inter dia foi avaliada com o DPR encontrado nas análises das duas modalidades, utilizando de 3,0 concentrações de paracetamol diferentes, sendo 10, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . No intra dia, 3,0 injeções replicadas foram realizadas para cada amostra dentro de 1,0 dia e as concentrações médias foram determinadas, assim, o DPR encontrado foi de 0,31%. Para o inter dia, as análises foram feitas em 3,0 dias consecutivos, obtendo um número de injeções  $n = 18$ , utilizando das mesmas concentrações intra dia, logo, seus resultados foram de DPR: 0,11%. Para a seletividade, não houve picos de interferência dos excipientes do comprimido, entretanto, não foram injetadas soluções de placebo e branco para comparar, contudo, o método se mostrou seletivo porque não foram encontrados outros picos no cromatograma, além dos outros ativos que também foram analisados – maleato de clorfeniramina e cafeína. No que diz respeito ao limite de detecção e o de quantificação, foram encontrados os resultados baseados na sensibilidade do método, sendo LD de  $1,415 \times 10^{-4}$ , encontrado através da relação sinal ruído de 10, e LQ de  $4,289 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ , sendo o sinal ruído de 3,0. Outro critério, a robustez, foi avaliado posteriormente da seleção da melhor composição da fase móvel assim, depois de escolhida, foram avaliados através

de mudanças de pH da fase móvel em  $\pm 0,2$  unidades de pH, composição do metanol variado em 2,0%, comprimento de onda em  $\pm 2,0$  nm e temperatura em  $\pm 2,0$  °C. O método foi bastante perspicaz em avaliar os resultados em pequenas variações, além disso, foi avaliado estatisticamente por meio da análise de variância (Teste ANOVA). Por fim, a especificidade encontrada ficou dentro da especificação, pois picos de pureza superiores a 99% foram obtidos nos cromatogramas de soluções da amostra, além disso, não houve a presença de interferentes, sendo que este último foi comparado com a injeção do padrão para verificar ou não a sua presença.

Os resultados da metodologia desenvolvida pelos autores foram resumidos na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados encontrados dos critérios analíticos avaliados em decorrência das condições cromatográficas selecionadas.

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: ACHEAMPONG, Akwasi et al (ACHEAMPONG, Akwasi et al, 2016)	
Detector:	UV
Coluna:	Luna C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	30 °C
Fase móvel:	Metanol : Tampão fosfato dibásico 0,05 M pH 4,0 (30:70)
Comprimento de onda:	215 nm
Volume de injeção:	20 µL
Fluxo:	1,0 mL/min
Tempo de retenção:	~ 4,0 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	$Y = 0,5829x + 5,985$ e $r^2 = 0,9997$
Robustez	De acordo ( $\pm 2$ unidades)
Precisão	Intra dia: 0,31% e Inter dia: 0,11%
Exatidão (Recuperação)	100,7-101,4%
LD	$1,415 \times 10^{-4}$ µg/mL
LQ	$4,289 \times 10^{-4}$ µg/mL
Especificidade	De acordo
Observação: O método proposto por ACHEAMPONG, Akwasi et al se mostrou preciso, relativamente rápido e com resultados consistentes, mas os autores não relatam avaliação da adequabilidade de sistema	

Em suma, tem-se que o método também foi rápido, eficiente e conveniente, apresentando resultados satisfatórios e dentro das especificações, assim, segue de acordo sua validação ser conforme a ICH Q2 R1 de 2005.

Outro trabalho que trata da determinação de paracetamol por HPLC em meio a outros analitos foi realizado por SHAIKH, K. A.; PATIL, S. D.; DEVKHILE, A. B (SHAIKH, K. A.; PATIL, S. D.; DEVKHILE, A. B, 2008). A metodologia requer como fase estacionária a coluna Zorbax SB C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm, sendo sua temperatura de 25 °C, a fase móvel é composta por acetonitrila e tampão fosfato contendo ácido ortofosfórico 50 mM em proporções 40:60, respectivamente, além disso, o pH é ajustado com hidróxido de sódio 10% para o valor de 6,0. Com relação ao sistema HPLC, ele é composto por detecção de arranjo de fotodiodos (PDA), assim como a maioria dos outros trabalhos, realizando a leitura no comprimento de onda de 270 nm. O volume de injeção do método desenvolvido foi de 10 µL e fluxo de 1,0 mL/min. As condições cromatográficas desenvolvida, antes de serem selecionadas, elas foram otimizadas alterando o pH da fase móvel e, com isso, foi verificado a alteração do tempo de retenção, que, em pH 6,0 era de 2,83 minutos, e quando alterado para pH 5,0, 2,85 min para a retenção do ativo paracetamol. O tempo de análise considerado foi inferior a 10 minutos, sendo considerado relativamente rápido.

Para a validação da metodologia, os critérios analíticos avaliados deveriam estar de acordo com a especificação da ICH de 2005. O critério de linearidade foi testada com diferentes níveis de concentração do ensaio para o paracetamol, e obteve-se que a concentração considerada linear foi a de 12,5 a 75 µg/mL. A equação linear obtida é representada por  $Y = 193152x + 44549$  e seu coeficiente de correlação de 0,9981. No que diz respeito à especificidade, ela foi avaliada através do nível de pureza do cromatograma e seu pico, assim, foi observado que não havia interferente de analito e excipiente. Já com a precisão e a exatidão, as mesmas foram avaliadas através da reprodutibilidade (DPR) e da taxa de recuperação. Para a reprodutibilidade, observada através da precisão intra dia, foi feita através da determinação das concentrações dos comprimidos a partir de 6,0 injeções, encontrando um DPR menos que 2,0%, sendo de 1,21%. Para a precisão intermediária, ou seja, inter dia, foi observada através das mesmas concentrações analisadas, entretanto, por analistas, sistema e colunas de diferentes marcas, sendo o DPR encontrado menor que 2,0% também. Além disso, para a recuperação com a finalidade de verificar a exatidão, a mesma foi realizada em três níveis diferentes, sendo 80, 100 e 120% da concentração declarada no rótulo do medicamento (500 mg de paracetamol), logo, três amostras foram preparadas para cada nível e sua recuperação foi resultante de 100,7-101,4%. Com a finalidade de verificar sua concentração mínima para a detecção e sua quantificação, seus valores encontrados para LD e LQ são, respectivamente, 0,027 µg/mL e 0,081 µg/mL. Para a robustez, o critério foi avaliado pela alteração do pH da fase móvel.

Com relação às amostras preparadas, elas se mostraram estáveis por um período de apenas 48 horas. Sua estabilidade foi comprovada a partir do seu DPR. Além do mais, a metodologia em questão fez estudos também para a adequação de sistema. A adequação do sistema foi avaliada a partir do DPR da área do pico, pratos teóricos, resolução entre os picos, por se tratar de um medicamento composto por 3,0 ativos, e fator de cauda. Os resultados são mostrados a seguir na tabela 6, tanto das condições cromatográficas, quanto dos critérios analíticos e adequabilidade de sistema avaliadas.

Tabela 6 – Resultados encontrados dos critérios analíticos em relação as condições cromatográficas.

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: SHAIKH, K. A.; PATIL, S. D.; DEVKHILE, A. B (SHAIKH, K. A.; PATIL, S. D.; DEVKHILE, A. B, 2008)	
Detector:	PDA
Coluna:	Zorbax SB C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	25 °C
Fase móvel:	Acetonitrila : tampão fosfato contendo ácido ortofosfórico 50 mM (40:60), pH = 6,0
Comprimento de onda:	270 nm
Volume de injeção:	10 µL
Fluxo:	1,0 mL/min
Tempo de retenção:	2,83 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	12,5 a 75 µg/mL ( $Y = 193152x + 44549$ , $r^2 = 0,9981$ )
Robustez	De acordo
Precisão	Intra dia: 1,21% e Inter dia: < 2,0%
Exatidão (Recuperação)	100,7-101,4%
Reprodutibilidade (DPR)	<2,0%
LD	0,027µg/mL
LQ	0,081µg/mL
Especificidade	De acordo
Adequabilidade de sistema	

Fator de cauda	1,50
Pratos teóricos	5069
%RSD	1,21
Observação: O método proposto por K.A. Shaikh e A.B. Devkhile, se mostrou preciso, rápido e com resultados confiáveis, uma vez que é verificado a adequação de sistema.	

Sendo assim, o método proposto por K.A. Shaikh e A.B. Devkhile, se mostrou preciso, rápido e com resultados confiáveis, uma vez que é verificado a adequação de sistema.

Outro artigo selecionado, intitulado *Simultaneous Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Chlorzoxazone by HPLC in Tablet Dose Form* e desenvolvido pelos autores ABHIJIT V.NAIK et al., é semelhante ao artigo mencionado anteriormente, uma vez que trata da determinação de aceclofenaco, paracetamol e clorzoxazona, contudo, apresentam condições cromatográficas diferentes. Quanto à fase estacionária, ela é composta pela Intersil C18 coluna (250 mm×4,6 mm×5,0 µm), já com relação à fase móvel, ela é caracterizada por ser composta de 10 mM de potássio di-hidrogenofosfato em pH ajustado para 5,55 com amônia e acetonitrila, em proporção 60:40. o HPLC selecionado é característico do seu detector UV, com comprimento de onda selecionado de 205 nm, seu fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de coluna ambiente, volume de injeção 10 µL, tempo de análise de 25 minutos e tempo de retenção do ativo paracetamol em 3,4 minutos. A corrida, em comparação à anterior, é considerada mais demorada.

Quanto à validação da metodologia, a linearidade foi feita através de 3 réplicas de cada concentração analisada, e, obteve-se que a mesma foi obtida através da concentração de 25 a 75 µg/mL, sendo sua equação da reta  $y = 139836.7x + (-620986)$ . Para a robustez, foram feitas variações de fase móvel, contendo metanol, diferentes proporções de água e acetonitrila e diferentes tampões em diferentes proporções, além disso, alterações nas dimensões de coluna. Com isso, finalmente encontrou-se a fase móvel para proporcionar o melhor tempo de retenção e a coluna para beneficiar melhor a simetria do pico e a sua nitidez. Ademais, sua detecção e sua quantificação foram realizadas através da relação sinal-ruído, sendo que para o LD seu valor foi de 22 ng/mL e para o LQ de 65 ng/mL. Além disso, a sensibilidade do método é comprovada a partir da sua detecção e quantificação, não encontrando nenhum outro pico além do ativo. Na exatidão, foi avaliado sua recuperação, sendo a recuperação feita pela adição de padrão. Com isso, os resultados encontrados para a recuperação foram de 101,04%, o que mostra que o cromatograma está livre de interferentes e excipientes, sendo avaliada em três níveis diferentes, de 120, 140 e 160% do estipulado pelo rótulo. Os baixos valores de desvio padrão na avaliação da precisão, considerados menor que 2,0%, e o coeficiente de variação em cada nível do experimento de recuperação indicam alta precisão do método.

Os resultados referentes aos critérios analíticos avaliados para a validação da metrologia se encontra abaixo na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados encontrados referentes aos critérios analíticos avaliados e sua relação com as condições cromatográficas.

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: ABHIJIT V.NAIK et al. (ABHIJIT V.NAIK et al., 2008)	
Detector:	UV
Coluna:	Intersil C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	25 °C
Fase móvel:	Potássio di-hidrogenofosfato 10 mM pH 5,55 : Acetonitrila (60:40)
Comprimento de onda:	205 nm
Volume de injeção:	10 µL
Fluxo:	1,0 mL/min
Tempo de retenção:	3,4 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	$y = 139836,7x + (-620986)$ e $r^2 = 0,9988$
Robustez	De acordo
Precisão	DPR < 2,0%
Exatidão (Recuperação)	101,04%
LD	22 ng/mL
LQ	65 ng/mL
Especificidade	De acordo
Observação: O método proposto por ABHIJIT V.NAIK et al se mostrou preciso, exato, rápido e seletivo.	

O método em questão, diferente do anterior, não relata a adequação de sistema para a metodologia, assim como não detalha sobre os resultados de precisão - intra dia e inter dia.

Outro artigo nomeado de *Simultaneous RP HPLC Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Tizanidine in Pharmaceutical Preparations* pelos autores V. V. Vaidya et al., descreve um método para a determinação dos ativos de um medicamento de ativo combinado através de critérios cromatográficos descritos a seguir. Sendo a coluna Hypersil C18 coluna (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por tampão fosfato pH 7,0 e acetonitrila nas proporções de 40:60; fluxo de

0,7 mL/min, 5,0 µL de volume de injeção e HPLC com detector UV e detector de fotodiodos e comprimento de onda a 230nm. Os espectros observados pelo detector UV do ativo paracetamol foram digitalizados no detector PDA a fim de selecionar o comprimento de onda mais adequado, sendo encontrado o de 230nm.

Nesse contexto, para a validação da metodologia, a faixa de concentração aceitável pelo método para o paracetamol é de 500 a 1500µg/mL para os critérios de linearidade, exatidão e precisão. Para a robustez, diferentes fases móveis foram testadas e, para a seleção da melhor fase móvel, a mesma foi feita através de critérios que envolviam o custo, tempo necessário para a análise e melhor separação dos ativos, visto que a análise foi feita em um comprimido de dosagem combinada.

Com relação aos critérios analíticos, a linearidade foi adequada em concentrações de 500 a 1500 µg/mL com 7 injeções e seu coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9999, se mostrando ser um método bastante linear. Sua equação da reta não foi demonstrada. Para seu limite de detecção e o limite de quantificação, os mesmos foram analisados através da relação sinal-ruído com 6 injeções da amostra, sendo seu LD e LQ, 0,3 µg/mL e 1,0 g/mL, respectivamente. Assim, a robustez foi avaliada pela variação da fase móvel e seus componentes, como água e metanol, água e acetonitrila e em diferentes proporções, contudo, a fase escolhida composta de tampão fosfato pH 7,0 e acetonitrila nas proporções de 40:60 obteve uma melhor resolução e simetria de pico. Outro critério, a precisão teve seu valor resultante a partir do desvio padrão, 0,09%. A recuperação, ou seja, a exatidão da metodologia deu-se através da adição de padrão em concentrações de 100, 110,120 e 130% do valor rotulado, sendo de 100,95, 99,85 e 99,99%, respectivamente, ou seja, sua recuperação variou de 99,85 a 100,95%.

Para dar confiabilidade aos seus resultados e verificar a reprodutibilidade do equipamento, realizados de acordo com a USP 31, a adequação de sistema também foi verificada. Foram avaliados e encontrados os resultados do desvio padrão, sendo 0,52%; pratos teóricos de 7841, fator de cauda de 1,637 e resolução entre os picos de 5,490 de paracetamol.

Os resultados encontrados para com os critérios analíticos, bem como a adequabilidade de sistema com relação as condições cromatográficas escolhidas pelos autores são listadas a seguir na tabela 8.

Tabela 8 – Condições cromatográficas desenvolvida pelos autores e seus resultados para com os critérios analíticos avaliados.

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: V. V. Vaidya et al., (V. V. Vaidya et al., 2009)	
Detector:	UV/PDA

Coluna:	Hypersil C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	25 °C
Fase móvel:	Tampão fosfato pH 7,0 :Acetonitrila (40:60)
Comprimento de onda:	230 nm
Volume de injeção:	5,0 µL
Fluxo:	0,7 mL/min
Tempo de retenção:	3,84 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	$r^2 = 0,9999$
Robustez	De acordo
Precisão	DPR: 0,09%
Exatidão (Recuperação)	99,85% – 100,95%
LD	0,3 µg/mL
LQ	1,0 µg/mL
Especificidade	De acordo
Adequabilidade de sistema	
Fator de cauda	1,637
Pratos teóricos	7841
%RSD	0,52%
Observação: O método proposto por V. V. Vaidya et al., se mostrou preciso, rápido e com resultados confiáveis, uma vez que é verificado a adequação de sistema.	

O método trazido pelos autores V. V. Vaidy et al. se mostrou validado de acordo com a ICH de 2005, dado que todos os seus critérios de validação se encontram de acordo com a especificação.

Com relação ao artigo trazido pelo autor M. Levent Altun, com nomeação de *HPLC Method for the Analysis of Paracetamol, Caffeine and Dipyrone*, uma metodologia foi criada para a detecção dos ativos paracetamol, cafeína e dipirona. As condições cromatográficas incluem a fase estacionária sendo composta de coluna µ-Bondapak C8 (250 mm × 4.6 mm, 5,0 µm) em temperatura ambiente com pré coluna Bondapak C18 de 10 µm em insertos de plástico descartáveis e suporte Waters Guard-Pak com finalidade de proteger a coluna, fase móvel constituída de fosfato monopotássico 0,01M, metanol, acetonitrila e álcool isopropílico nas proporções de 420:20:30:30 (v/v/v/v), respectivamente, em eluição isocrática, sendo que a mesma foi selecionada para alcançar a máxima



separação dos picos e máxima sensibilidade. O pH da fase móvel não é descrito, contudo, o autor relata que outras proporções de fase foram testadas, bem como seus valores de pH para achar a mais específica. Além disso, a detecção é com base em detector PDA e UV em comprimento de onda selecionado de 215 nm, fluxo de 1,0 mL/minuto e capacidade de loops de injeção de 20 µL, entretanto, as análises foram realizadas com loops de injeção de 10 µL. O tempo de corrida estimado foi de 10 minutos, sendo o tempo de retenção observado do ativo paracetamol de 4,88 minutos.

Os cálculos realizados para a validação da metodologia foram feitas a partir da padronização externa pela medição das áreas dos picos observados nos cromatogramas. Ademais, a adequação de sistema foi acompanhada e seus resultados encontrados estão presentes na tabela 9.

Os critérios analíticos avaliados e seus resultados se encontram na tabela a seguir, sendo que a linearidade foi feita com 5 concentrações, sendo seu DPR encontrado de 0,192%, os quais foram submetidas a análise de regressão para calcular a equação de calibração e o coeficiente de correlação, além do mais, verificou-se que o método apresentou uma boa linearidade dos picos de concentração de 25 a 400 µg/mL, encontrando  $R^2$  de 0,9987 e equação da reta de  $Y: 20491,74 x + 150586,1$ . A relação sinal-ruído foi avaliada com 6 injeções da amostra de preparada de paracetamol para verificar suas concentrações de limite de detecção e limite de quantificação, sendo que nessa metodologia, o relação S/R para o LD foi de 3 e para o LQ de 9, ou seja, 3 vezes maior que o LD. O LD encontrado foi de 0,409 µg/mL e seu LQ de 1,226 µg/mL. Com relação ao critério de precisão, foi avaliado através de 9 injeções do ativo de paracetamol no nível de LQ e seu DPR foi de 2,02%, superior a 2,0%, ou seja, seu resultado encontrado foi muito disperso. A exatidão, nessa metodologia desenvolvida, foi avaliada também através do desvio padrão relativo a partir de 9 injeções do padrão do paracetamol de concentração final de 100 µg/mL. A fórmula utilizada para avaliar a exatidão a partir do desvio é descrita pela equação 9.

Equação 9 – Cálculo para avaliação da exatidão a partir do desvio

$$Desvio (\%) = \frac{(Conc. aumentada - Conc. medida)}{Conc. aumentada} \times 100$$

A recuperação foi um critério avaliado à parte do critério de exatidão, uma vez que foi realizada pela adição de concentração conhecida do ativo em concentrações de 400, 300, 200, 100 e 50 µg/mL. A recuperação foi de 101,62% e DPR de 4,28%, sendo considerada relativamente alta. Para a avaliação da robustez do método, o autor considerou que foi através da mesma análise sendo realizada em diferentes dias, isto é, a precisão inter dia considerada pelos outros autores já mencionados nesse trabalho. Além disso, a robustez avaliada foi verificada também entre análises em HPLCs diferentes.

A tabela abaixo mostra as condições cromatográficas escolhidas, assim como os resultados dos critérios analíticos avaliados.

Tabela 9 – Condições cromatográficas escolhidas pelos autores e seus resultados para os critérios analíticos avaliados.

Especificações para o desenvolvimento do método	
Sistema HPLC	
Autor: M. Levent Altun (M. Levent Altun, 2002)	
Detector:	UV/PDA
Coluna:	µBondapak C18, 250 mm×4,6 mm, 5,0 µm
Temperatura:	25 °C
Fase móvel:	Fosfato Monopotássico 0,01M : Metanol : Acetonitrila : Álcool isopropílico (420:20:30:30)
Comprimento de onda:	215 nm
Volume de injeção:	10 µL
Fluxo:	1,0 mL/min
Tempo de retenção:	4,88 minutos
Critérios analíticos avaliados	
Linearidade:	$r^2 = 0,9987$
Robustez	De acordo
Precisão	DPR: 3,45%
Exatidão (Recuperação)	99,47% – 99,85%
LD	0,2nµg/mL
LQ	0,8 µg/mL
Especificidade	De acordo
Adequabilidade de sistema	
Fator de capacidade (K')	1,81
Seletividade	1,307 (DPR: 0,24%)
Simetria do pico	1,179
Observação: O método proposto por M. Levent Altun, se mostrou preciso, rápido e com resultados confiáveis, uma vez que é verificado a adequação de sistema.	

Com isso, o método se mostrou com resultados satisfatórios para a detecção do ativo paracetamol, entretanto, seus desvios encontrados foram considerados altos, não apresentando um padrão para as análises.

Diante dos artigos expostos, tem-se que seus resultados são confiáveis, exatos, robustos, seletivos e/ou específicos para a metrologia desenvolvida, isto é, conseguem detectar o ativo do paracetamol com precisão. Além disso, não só detectam como também chegam a quantificar o ativo em uma concentração relativamente baixa. Os resultados dos métodos de todos os autores se mostram bastante linear em determinada faixa de concentração do paracetamol.

## 5. CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados, foi possível observar que são utilizadas diversas metodologias para a detecção do ativo paracetamol, cujas são metodologias validadas, precisas, robustas, específicas e confiáveis. Contudo, foi notório que alguns reagentes estão presentes na grande parte dos trabalhos expostos, como o metanol e tampão fosfato compondo a fase móvel, bem como o uso da fase estacionária sendo de especificação C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). Ademais, a maioria dos autores optaram por utilizar um volume de injeção de 20 µL e o detector PDA.

Dentre os resultados individuais de cada trabalho, pode-se perceber que aqueles que tiveram o melhor resultado foram aqueles que compunham a fase móvel de tampão fosfato e metanol em sua composição, como aqueles trabalhados pelos autores CHANDRA, Preeti et al. e ACHEAMPONG, Akwasi et al, entretanto, os autores V. V. Vaidy et al. também tiveram excelentes resultados e utilizaram a fase móvel contendo tampão fosfato e acetonitrila.

Em suma, tem-se que para a análise da determinação do paracetamol, a taxa de fluxo mais indicado é o de 1,0 mL/min de eluição da fase móvel, assim como a coluna deve ser polar, visto que o paracetamol é um composto considerado bastante polar, e com volume de injeção de 20 µL. Com relação à fase móvel, foi verificada que a mais indicada e com melhor afinidade para o paracetamol é a fase móvel em metanol e o sistema, por isso, deve ser em fase reversa e em condição isocrática, bem como o detector pode ser UV ou PDA. Com relação ao comprimento de onda, o mesmo deve ser de 210-270 nm. Assim, com as condições cromatográficas escolhidas, tem-se que a simetria do pico, assim como sua linearidade e o resultado do menor desvio padrão relativo observado pelas diferentes concentrações e repetibilidade da análise resulta em um ativo com o tempo de retenção mais apropriado e rápido, bem como as condições são as melhores encontradas.

## 6. CRONOGRAMA DE TRABALHO A SER CUMPRIDO AO LONGO DAS DISCIPLINAS TCC 1 E TCC 2 (10 MESES)

Com o propósito de melhorar a compreensão e criar um planejamento de programação da revisão de literatura e análise dos dados experimentais, foi construído um quadro com o trabalho.

	Mês									
Atividades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Levantamento da bibliografia	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Seleção de protocolos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avaliação dos protocolos experimentais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Análise dos resultados obtidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Confecção do trabalho final	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A3 Analítica: Consultoria e Treinamento. Princípios de Cromatografia a Líquido (HPLC). Disponível em: <<https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-de-cromatografia-a-liquido-hplc/>>. Acesso em 9 de agosto de 2021.

ACHEAMPONG, A. *et al.* Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate paracetamol and caffeine in tablet formulation. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE nº 899 de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil, 2003, publicada em 02/06/2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE nº 166 de 25 de julho de 2017: Critérios para validação de métodos analíticos.

ALTUN, M. L. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyron. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 521-528, 2002.

BRESCOVIT, N. S. Estudo de estabilidade da solução padrão de ibuprofeno no controle de qualidade por HPLC. 2019.

CHANDRA, P. *et al.* Application of HPLC for the simultaneous determination of aceclofenac, paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical dosage form. **Scientia pharmaceutica**, v. 80, n. 2, p. 337-352, 2012.

CLAUSEN, D. N. *et al.* Desenvolvimento de Método por CLAE para Quantificação de Orfenadrina, Paracetamol e Cafeína em Formulações Farmacêuticas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2066-2079, 2015.

EMANUELLI, T., SCANDIUZZI M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. 2000; Rio Grande do Sul: Universidade do Rio Grande do Sul. Anais. . p.57. 2000.

ETTRE, L. S. M.S. Tswett and the invention of chromatography. *Lc Gc Europe* 2003, 16, 2.

FRANCISCO, A.M.A. Desenvolvimento e validação de uma técnica analítica para a quantificação de lamotrigina em plasma humano. Disponível

em:< [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/5519/6/Cap%C3%ADtulo\\_2.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/5519/6/Cap%C3%ADtulo_2.pdf).> Acesso em 10 de agosto de 2021.

GAMA, R. G. M. Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência: uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico. Fundação Oswaldo Cruz.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human use; Q2B- validation of Analytical procedure: methodology,1996.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

KRASNOVSKY, A. A. Chlorophyll isolation, structure and function: major landmarks of the early history of research in the Russian Empire and the Soviet Union. *Photosynthesis Research* 2003.

LOPES, R. J. Analgésico causa 'overdose a conta-gotas'. Folha de São Paulo, São Paulo, 30 de Novembro. 2011. Saúde, Caderno 6, p.1.

MACCHIONE, E. L. A. *et al.* UM ESPECTRÔMETRO DE MASSA POR TEMPO DE VÔO COM “REFLECTRON”. 2008.

NETO, A. J. S. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 4. *Scientia Chromatographica* Vol.2, N°3, 61-67, 2010.

PACHECO, S. *et al.* História da cromatografia Líquida. *Revista Virtual da química*, v. 7, p 1225-1271, julho-agosto 2015

PACHECO, S. *et al.* História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.

PFARMA. Cromatografia Líquida de Alta eficiência. Disponível em:<<https://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia.html>>. Acesso em 9 de agosto de 2021.

Pharmacy Theory. Whats is HPLC and how does it work?. Disponível em:<https://pharmacytheory.com/what-is-hplc-and-how-does-it-work/>. Acesso em 20 de outubro de 2021

PEREIRA, F. J. *et al.* Development and Validation of an RP-HPLC-PDA Method for Determination of Paracetamol, Caffeine and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, p. 466, 2021.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, N. M.; COSTA, J. V. R. MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PARACETAMOL. **Ministério da Educação Centro Federal de Educação Tecnológica da Bahia**, p. 64, 2008

SHAIK, K. A.; PATIL, S. D.; DEVKHILE, A. B. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride and azithromycin in tablet dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, v. 48, n. 5, p. 1481-1484, 2008

SIMON, A.; CABRAL, L. M.; SOUSA, V. P. Development and validation of an analytical method by HPLC for simultaneous quantification of Betamethasone dipropionate and Betamethasone sodium phosphate in injectable suspension. *Química Nova*, v. 35, n. 3, p. 593-600, 2012.

SKOOG, D. A; LEARY . Principles of Instrumental analysis. Editora Saunders, 5 ed; 2006. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835