

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ - CAMPUS DE
TOLEDO**

**DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL**

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO DE IBUPROFENO NO
CONTROLE DE QUALIDADE POR HPLC**

NATALI SILVEIRA BRESCOVIT

Toledo, maio de 2019.

NATALI SILVEIRA BRESCOVIT

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO DE IBUPROFENO NO
CONTROLE DE QUALIDADE POR HPLC**

Trabalho apresentado à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* de Toledo, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental

Orientadora: Prof^a Dr^a Viviane Lobo

Toledo, maio de 2019.

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ - CAMPUS DE
TOLEDO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova o trabalho de Conclusão de Curso

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO DE IBUPROFENO NO
CONTROLE DE QUALIDADE POR HPLC**

elaborada por
Natali Silveira Brescovit

como requisito parcial para obtenção de grau de Especialista em Análise Instrumental

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Viviane Lobo
(UTFPR)

Prof. Dr. Maurício Rosa
(UNIOESTE)

Prof. Dr. Renato Eising
(UTFPR)

Toledo, maio de 2019.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto avaliar três condições distintas de armazenamento da solução padrão de ibuprofeno, com o intuito de verificar em qual condição seria possível manter a estabilidade do mesmo por mais tempo, onde a avaliação foi feita através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A primeira condição avaliada foi o armazenamento de amostras da solução padrão a temperatura ambiente, esta condição apresentou resultados satisfatórios, mantendo a estabilidade do padrão por aproximadamente 20h após o seu preparo. A segunda condição avaliada foi o armazenamento de amostras em geladeira (2°C a 8°C), onde se obteve resultados insatisfatórios, pois apresentou recuperação apenas após 8h o seu preparo. Posteriormente foi avaliada a terceira condição onde amostras foram armazenadas em estufa (30°C) e também se obteve resultados insatisfatórios, onde não se obteve recuperação em nenhuma das injeções realizadas após 8h após o seu preparo. Através desses resultados foi possível afirmar que o acondicionamento de amostras em estufa é melhor quando comparado com as demais condições.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta eficiência. solução padrão de ibuprofeno. estabilidade.

ABSTRACT

In this work, it was proposed to evaluate three different conditions of storage of the standard ibuprofen solution, in order to verify in which condition it would be possible to maintain its stability for a longer time, where the evaluation was done through the high performance liquid chromatography technique (HPLC). The first condition assessed was storage of standard solution samples at room temperature, this condition presented satisfactory results, maintaining the stability of the standard for approximately 20h after its preparation. The second condition evaluated was the storage of samples in a refrigerator (2 ° C to 8 ° C), where unsatisfactory results were obtained, since it recovered only after 8h its preparation. Subsequently, the third condition was evaluated where samples were stored in a greenhouse (30 ° C) and unsatisfactory results were obtained, where no recovery was obtained in any of the injections performed after 8h after preparation. Through these results it was possible to affirm that the packing of samples in greenhouse is better when compared with the other conditions.

Keywords: High performance liquid chromatography. Standard solution of ibuprofen. stability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA IBUPROFENO	11
FIGURA 2 - ESPECTRO OBTIDO NO ESTUDO EM TEMPERATURA AMBIENTE.	21
FIGURA 3 - ESPECTRO OBTIDO NO ESTUDO EM GELADEIRA.	23
FIGURA 4 - ESPECTRO OBTIDO NO ESTUDO EM ESTUFA.	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- 1ªAVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE.	18
TABELA 2 - 2ªAVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE.	19
TABELA 3 - 3ªAVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE.	20
TABELA 4 - RESULTADO DO TESTE ANOVA.	21
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM GELADEIRA.	22
TABELA 6 - RESULTADO DO TESTE DE GRUBBS.	23
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM ESTUFA.	25
TABELA 8 - RESULTADO DO TESTE DE GRUBBS PARA A CONDIÇÃO ESTUFA. ..	26

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CQ - Controle de qualidade

HPCL – Cromatografia líquida de alta performance, do inglês *High performance liquid chromatography*

ICH – Conferência Internacional de harmonização de requisitos técnicos para registro de produtos farmacêuticos para uso humano, do inglês *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 IBUPROFENO	11
2.2 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA.....	11
2.3 ESTABILIDADE DOS PADRÕES E DAS AMOSTRAS	12
2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	13
2.5 CONFORMIDADE DE SISTEMA.....	13
2.6 ESTATÍSTICA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DE RESULTADOS ANALÍTICOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA	15
3.2 TÉCNICA E INSTRUMENTAÇÃO.....	15
3.3 PARÂMETROS DO EQUIPAMENTO	15
3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE IBUPROFENO	16
3.5 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO TRICLOROÁCETICO	16
3.6 CURVA ANALÍTICA.....	16
3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE	18
4.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM GELADEIRA	22
4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM ESTUFA.....	24
5 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Atualmente na indústria farmacêutica, a identificação e quantificação dos princípios ativos dos medicamentos são, em sua maioria, realizadas através de métodos cromatográficos. Estes ensaios seguem as normas preconizadas por órgãos regulamentadores, que estabelecem os ensaios de estabilidade de medicamentos (ORIQUI, 2012). Porém, os mesmos não dispõem um estudo de estabilidade das soluções reagentes utilizadas, ficando a critério da própria indústria farmacêutica a realização de estudos, caso haja a necessidade de utilizar essas soluções reagentes após 24 horas do preparo.

No controle de qualidade (CQ) da empresa Prati-Donaduzzi, são realizados ensaios de identificação e quantificação de diversos princípios ativos, e o método utilizado para determinar a estabilidade da solução padrão é a recuperação dos controles do padrão 1 e 2. Entretanto, após 24 horas, caso necessite a realização de uma nova curva de calibração, torna-se imprescindível um novo preparo dos padrões, o que ocasiona um gasto de padrão, reagente, tempo e a geração resíduos.

O ibuprofeno é um agente anti-inflamatório não esteroide, que pode ser comercializado em diversas apresentações, e se destaca pelo seu elevado consumo mundial dentre outros AINES (GHAUCH, 2012). No setor de controle de qualidade, este medicamento possui uma alta demanda diária de análise, devido à Prati-Donaduzzi ser um dos principais fornecedores do sistema único de saúde (SUS).

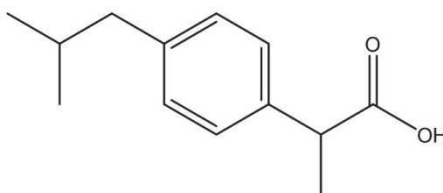
Diante desse contexto objetivou-se com o presente trabalho avaliar a estabilidade da solução padrão de ibuprofeno através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IBUPROFENO

O ibuprofeno (ácido α -metil-4-(2-metilpropil)benzoacético) (FIGURA 1) é um AINE seletivo da enzima ciclooxigenase (COX- 2), responsável por impedir o processo inflamatório sem os efeitos colaterais indesejáveis, principalmente os distúrbios gastrintestinais que são oriundos do bloqueio inespecífico da COX (KUMMER, 2002).

FIGURA 1 - ESTRUTURA IBUPROFENO



Fonte: STOYANOVA, VINAROV; TCHOLAKOVA (2016).

Esse fármaco apresenta a fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$, possui massa molar de 206,28 $g\ mol^{-1}$ e também um caráter ácido fraco, com pKa de 4,9, ou seja, é praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em acetato de etila e solúvel em álcoois, clorofórmio e soluções aquosas de hidróxidos alcalinos (STOYANOVA; VINAROV; TCHOLAKOVA, 2016).

É encontrado comumente em temperatura ambiente na forma de um pó branco e apresenta odor característico. Normalmente é indicado para dores musculares, alívio à febre, e outros sintomas associados a resfriados e gripes. De acordo com Ghauch et al. (2012), o ibuprofeno encontra-se na lista de medicamentos que são mais consumidos no mundo, sendo que este pode estar disponível ao consumidor em diversas formas de apresentação, como comprimidos, gotas, etc. (MONTEIRO, 2017).

2.2 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

A identificação ou quantificação de qualquer produto farmacêutico é realizada através da utilização de substâncias químicas de referência (SQR), que são chamadas de padrões.

Os padrões são requeridos de acordo com a monografia utilizada no procedimento analítico e são reconhecidos pela ANVISA. O reconhecimento adquirido pela agência

assegura além de sua identidade, o grau de pureza, bem como a sua qualidade (ANVISA, 2017).

2.3 ESTABILIDADE DOS PADRÕES E DAS AMOSTRAS

Por volta de 1960 e 1970 ocorreu um aumento significativo nas leis, regulamentações e guias, que buscavam acompanhar e avaliar a qualidade e eficácia de todos os medicamentos, indiferentemente de sua procedência. Isso ocorreu devido ao fato das indústrias crescerem e buscarem atingir novos mercados, onde as exigências divergiam em cada país.

Essa falta de harmonia nas regulamentações impulsionou as indústrias a investirem em estudos e procedimentos que permitissem ampliar o prazo de consumo de seus produtos. Atualmente os principais órgãos reguladores de estudo de estabilidade são o *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ORIQUI, 2012).

Segundo o ICH, o prazo de validade é definido como o período de tempo no qual o medicamento se mantém dentro da especificação, sendo este armazenado nas condições que são definidas no rótulo do recipiente. Já a ANVISA define o prazo de validade como a data limite para a utilização de um produto farmacêutico, baseada nos respectivos testes de estabilidade, no processo de fabricação e nas propriedades dos materiais de embalagem. Existem três tipos de estudos que podem ser feitos nos testes de estabilidade e estes estão dispostos na Resolução nº 398 de 2004, porém ambos os estudos se detêm à estabilidade do medicamento e não a das soluções que são utilizadas na análise (ANVISA, 2004; ORIQUI, 2012).

Visando atender a demanda das análises realizadas na indústria farmacêutica e assegurar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis Torna-se necessário avaliar a estabilidade das amostras e padrões em termos de temperatura e tempo. Pois, caso uma solução não se apresente estável em temperatura ambiente, há a possibilidade de acondicionar a mesma sob refrigeração, aumentando assim o tempo de estabilidade da mesma e conseqüentemente garantindo que a análise possa ser completa antes que ocorra a degradação desta solução (SHABIR, 2003).

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas nas indústrias devido a sua alta sensibilidade e ampla aplicabilidade, sendo que a mesma foi descoberta em 1906 por Mikhael Semenovich Tswett.

Essa técnica é um método físico-químico, no qual misturas complexas podem ser separadas para posteriormente serem identificadas. Esse método de separação é composto por duas fases imiscíveis, as quais recebem o nome de fase estacionária e fase móvel. Sendo que a fase estacionária retém os componentes da amostra que se deseja separar e a fase móvel é responsável por carregá-los durante o processo de identificação (MONTEIRO, 2017; SKOOG *et al.*, 2002).

Visando abranger as características do analito, tais como a solubilidade e o grau de pureza, emprega-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essa técnica pode operar de duas maneiras, sendo uma em fase normal e a outra em fase reversa. Geralmente os métodos analíticos operam com a fase reversa, ou seja, utilizam uma fase estacionária menos polar, e uma móvel mais polar. Neste caso, podem ser empregados diversos solventes como o metanol, água e acetonitrila para a fase móvel e como suporte para a fase estacionária podem ser utilizadas matrizes a base de sílica empregando os grupos C₁₈. Já os detectores variam, pois há uma ampla gama no mercado, sendo que a escolha do mesmo varia de acordo com a necessidade específica da análise. Os principais tipos são: UV/Vis – ultravioleta-visível; espectro de massas, índice de refração, fluorescência e o UV por arranjo de diodos (photodiode array detector, *PDA*) (MONTEIRO, 2017).

Segundo Honório (2013), a utilização de detectores *PDA* torna-se uma alternativa para aumentar a seletividade da técnica, pois esses tipos de detectores além de fornecerem os espectros no UV-VIS do eluente em determinados intervalos de tempo, também possibilitam a escolha do comprimento de onda ideal para o analito de interesse.

2.5 CONFORMIDADE DE SISTEMA

Ribani *et al.* (2004) aborda que a conformidade do sistema deve ser feita sempre antes da realização de uma validação analítica ou da análise de uma amostra.

Esta avaliação se dá a partir da conformidade do sistema (“system suitability”), ou seja, através de testes que indicam que os resultados que serão obtidos a partir desta análise são exatos, precisos e aceitáveis. Normalmente os parâmetros que garantem a conformidade

do sistema, é o fator de retenção (k), onde ocorre à avaliação da separação dos picos, este parâmetro deve apresentar $k > 2$. A repetitividade deve ser inferior a 1% para $n > 5$. A resolução deve ser > 2 entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação), o fator de alargamento deve ser < 2 e o número de pratos teóricos em geral deve ser maior que 2000 para HPLC.

2.6 ESTATÍSTICA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DE RESULTADOS ANALÍTICOS

Durante uma validação analítica ou em um estudo de estabilidade torna-se necessário o uso de ferramentas estatísticas para avaliar através de testes a variância obtida para um determinado grupo amostral. A escolha do teste varia de acordo com os dados que serão obtidos no delineamento experimental. Geralmente utilizam-se os testes ANOVA (*Analysis of Variance*) e o teste de GRUBBS, sendo que o primeiro teste avalia a variância entre os grupos e o segundo determinará a presença de valores aberrantes chamados de “outliers” dentro do grupo e também indicará o ponto em que existe uma maior variação da resposta do método (LARSON, FABER, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

A amostra padrão de referência secundária utilizada foi cedida pela empresa farmacêutica Prati- Donaduzzi.

3.2 TÉCNICA E INSTRUMENTAÇÃO

Para avaliar a estabilidade da solução padrão foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, essa técnica foi empregada por ser reprodutiva e confiável, bem como por possibilitar a análise em curto tempo, o equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência do fabricante SHIMADZU, modelo CL20, detector PDA.

3.3 PARÂMETROS DO EQUIPAMENTO

A estabilidade da solução padrão de ibuprofeno, foi avaliada seguindo os seguintes parâmetros dispostos no quadro 1 abaixo.

QUADRO 1 – PARÂMETROS INSTRUMENTAIS

PARÂMETROS ESPECÍFICOS INSTRUMENTAIS	
Fase móvel	Mistura de solução ácido tricloroacético e acetonitrila (40:60)
Fluxo	2,0 mL/minuto
Detector	PDA
Volume injetado	20 µL
Coluna	C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Tempo de Retenção	Entre 3,3 minutos e 4,5 minutos
Tempo de Corrida	10 minutos
Temperatura	Ambiente

FONTE: O Autor.

Sendo que todos os itens dispostos no quadro acima seguem metodologia vigente na empresa conforme desenvolvimento local.

3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE IBUPROFENO

O preparo da solução padrão de ibuprofeno segue o desenvolvimento local da metodologia vigente na empresa.

Primeiramente foi pesado aproximadamente 10 mg de padrão e transferido para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 5 mL de fase móvel e foi levado ao ultrassom sem aquecimento por 5 minutos até completa solubilização. Posteriormente o volume foi completado com fase móvel, homogeneizado e filtrado para *vial* através de membrana PET de 0,45 μm .

3.5 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO TRICLOROÁCETICO

A solução de ácido tricloroacético foi preparada de acordo com a metodologia vigente que segue desenvolvimento local, onde foram pesadas 4,0 g de ácido tricloroacético para um balão volumétrico e dissolvidas em 500 mL de água purificada, depois o pH foi ajustado para 3,0 com hidróxido de amônio.

3.6 CURVA ANALÍTICA

Após o preparo da solução padrão de ibuprofeno, a solução foi injetada e foi verificada a conformidade do sistema, sendo avaliada a precisão e posteriormente seguindo com as injeções dos *vials* nas condições que foram descritas no delineamento experimental.

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A solução padrão de ibuprofeno foi avaliada em três condições, onde a solução padrão recém preparada foi filtrada para 23 *vials* e posteriormente os mesmos foram armazenados em três condições diferentes: geladeira, estufa e temperatura ambiente com o intuito de verificar se determinada condição favoreceria a estabilidade do mesmo por mais tempo.

Inicialmente o estudo foi feito com *vials* em temperatura ambiente, ou seja, foram utilizados na rotina e ficaram armazenados no equipamento, no decorrer das horas este *vial* foi reinjetado e avaliado sua estabilidade, frente à primeira injeção. Posteriormente foram avaliados *vials* que foram armazenados em geladeira (2 a 8°C) e em estufa (30 °C).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão testados por Análise de Variância (ANOVA) Significância estatística será considerada para valores de $p < 0,05$ e através de GRUBBS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do delineamento experimental, foram avaliados os *vials* que foram armazenados em três condições distintas, para verificar qual dessas manteve a estabilidade do mesmo por mais tempo.

4.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE

Para avaliar a estabilidade do armazenamento sob essa condição, foram realizados 3 estudos durante 3 campanhas diferentes.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na primeira campanha, onde foi avaliada a conformidade do sistema de acordo com os parâmetros sugeridos por Ribani et al. (2004), bem como a recuperação da solução padrão no decorrer do tempo frente à primeira injeção.

TABELA 1- 1ª AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE.

Massa pesada do padrão de ibuprofeno (mg):	10,44		
Pureza do padrão (%):	99,66		
Injeções	Área das réplicas	Data/ Hora	Número de pratos teóricos
Inj 01	577817	10/01/2019 10:35	13800
Inj 02	576364	10/01/2019 10:48	13510
Inj 03	577359	10/01/2019 10:57	13728
Inj 04	577744	10/01/2019 11:07	13625
Médias das injeções	577321		
DPR %:	0,116		
Padrão injetado 10 horas depois (área)	580180	10/01/2019 20:48	13479
Recuperação do padrão (%):	100,50		
Padrão injetado 19 horas depois (área)	582240	10/01/2019 05:04	13387
Recuperação do padrão (%):	100,85		
Padrão injetado 67 horas depois (área)	581692	12/01/2019 05:37	13696
Recuperação do padrão (%):	100,76		

FONTE: O Autor.

A partir dos dados obtidos na Tabela acima, inicialmente foi avaliada a conformidade do sistema, através dos parâmetros indicados por Ribani (2004), que validaram a

conformidade do sistema, sendo esses o DPR inferior a 1,5% e o número de pratos teóricos superiores a 2000.

Posteriormente foi avaliada a recuperação da solução padrão no decorrer das horas e verificou-se que a mesma se manteve estável durante aproximadamente 45h. Portanto a solução padrão de ibuprofeno apresentou recuperação dentro da faixa estipulada para o estudo de estabilidade que é de 98,5% a 101,5% (SHABIR,2003),

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos no segundo estudo realizado, onde foi avaliada a conformidade do sistema e também a recuperação da solução padrão de ibuprofeno no decorrer do tempo frente à primeira injeção.

TABELA 2 - 2ª AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE.

Massa pesada do padrão de ibuprofeno (mg):	10,16		
Pureza do padrão (%):	99,66		
Injeções	Área das réplicas	Data/ Hora	Número de pratos teóricos
Inj 01	567142	22/01/2019 02:36	12420
Inj 02	566643	22/01/2019 02:58	12363
Inj 03	566145	22/01/2019 02:58	12430
Inj 04	568604	22/01/2019 03:09	12258
Médias das injeções	567133,5		
DPR %:	0,187		
Padrão injetado 12 horas depois (área)	572299	22/01/2019 14:16	11950
Recuperação do padrão (%):	100,91		
Padrão injetado 17 horas depois (área)	574043	22/01/2019 19:53	11767
Recuperação do padrão (%):	101,22		
Padrão injetado 25 horas depois (área)	579548	23/01/2019 03:55	11200
Recuperação do padrão (%):	102,19		

FONTE: O Autor.

A partir dos dados obtidos na Tabela 2 acima referente à segunda campanha, foi avaliada a conformidade do sistema que apresentou resultado satisfatório e DPR inferior a 1,5%. Em seguida foi avaliada a recuperação da solução padrão no decorrer das horas e verificou-se que a mesma se manteve estável por 17h, e obteve recuperação dentro da faixa estipulada para o estudo de estabilidade que é de 98,5% a 101,5%.

A Tabela 3 a seguir apresenta os resultados obtidos no terceiro estudo realizado, onde será avaliada a conformidade do sistema e também a recuperação da solução padrão no decorrer do tempo frente à primeira injeção.

TABELA 3 - 3ª AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM TEMPERATURA AMBIENTE.

Massa pesada do padrão de ibuprofeno (mg):	10,9		
Pureza do padrão (%):	99,66		
Injeções	Área das réplicas	Data/ Hora	Número de pratos teóricos
Inj 01	616178	28/01/2019 18:18	12863
Inj 02	613404	28/01/2019 18:29	12847
Inj 03	612445	28/01/2019 18:40	12938
Inj 04	609623	28/01/2019 18:51	12928
Médias das injeções	612912,5		
DPR %:	0,441		
Padrão injetado 5 horas depois (área)	617258	28/01/2019 23:33	12758
Recuperação do padrão (%):	100,71		
Padrão injetado 17 horas depois (área)	619979	29/01/2019 14:41	13072
Recuperação do padrão (%):	101,15		
Padrão injetado 19 horas depois (área)	611410	29/01/2019 16:22	13057
Recuperação do padrão (%):	99,75		

FONTE: O Autor.

A partir dos dados obtidos na Tabela 3 acima referente à terceira campanha, foi avaliada a conformidade do sistema que apresentou resultado satisfatório e DPR inferior a 1,5%. Em seguida foi avaliada a recuperação da solução padrão no decorrer das horas e verificou-se que a mesma se manteve estável por 19h, e obteve recuperação dentro da faixa estipulada para o estudo de estabilidade que é de 98,5% a 101,5%.

Quando comparados os valores encontrados entre as três campanhas realizadas em dias distintos, verificou-se que o *vial* da solução padrão que foi armazenado em temperatura ambiente apresentou estabilidade de aproximadamente 20h. Diante desses dados, pode-se afirmar que ambas as campanhas apresentaram conformidade do sistema e recuperação satisfatória ao longo das horas, indicando que essa condição para armazenamento de vial mantém a estabilidade do mesmo.

Com o intuito de avaliar a variabilidade dos resultados obtidos entre essas campanhas, os dados foram avaliados estatisticamente, onde se obteve os valores dispostos na Tabela 4 abaixo.

TABELA 4 - RESULTADO DO TESTE ANOVA.

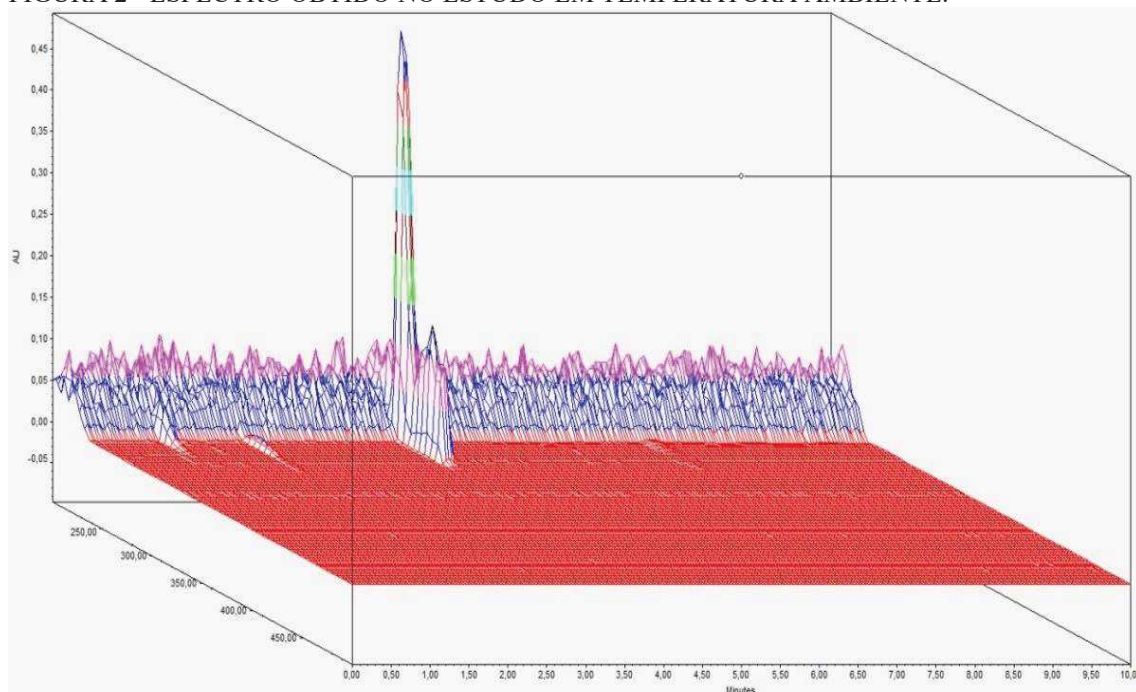
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,386467	2	0,693233	2,0976	0,203829	5,143253
Dentro dos grupos	1,982933	6	0,330489			
Total	3,3694	8				

FONTE: O Autor.

De acordo com a análise dos dados a partir do ANOVA, verificou-se que não há variância significativa entre os valores obtidos entre as campanhas durante dias distintos, pois o F : 2,0976 obtido é inferior ao F crítico: 5,143253 que é tabelado e para 2 graus de liberdade apresenta esse valor, ou seja estipula o valor máximo aceitável para rejeição da hipótese nula (LARSON, FABER, 2010).

Pretendendo confirmar a estabilidade da solução padrão mantida sob essa condição foi realizada uma varredura do espectro dessa solução, conforme mostra a Figura 3 abaixo.

FIGURA 2 - ESPECTRO OBTIDO NO ESTUDO EM TEMPERATURA AMBIENTE.



FONTE: O Autor.

Ao analisar a Figura 2, foi possível confirmar através do espectro obtido que não houve degradação ao longo do tempo, pois no comprimento de onda utilizado para quantificar a solução padrão em estudo, não houve a absorção de nenhum interferente.

4.2 AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM GELADEIRA

Para avaliar a estabilidade do armazenamento sob essa condição, foi realizado um estudo, e o resultado obtido está disposto na Tabela 5 onde será avaliada a conformidade do sistema e a recuperação da solução padrão no decorrer do tempo frente à primeira injeção.

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM GELADEIRA.

Massa pesada do padrão de ibuprofeno (mg):	10,05		
Pureza do padrão (%):	99,66		
Injeções	Área das réplicas	Data/ Hora	Número de pratos teóricos
Inj 01	584583	25/02/2019 17:39	12696
Inj 02	585549	25/02/2019 17:50	12697
Inj 03	584091	25/02/2019 18:02	12686
Inj 04	583763	25/02/2019 18:13	12593
Inj 05	583099	25/02/2019 18:24	12634
Inj 06	585589	25/02/2019 18:35	12826
Médias das injeções	584445,7		
DPR %:	0,170		
Padrão injetado 8 horas depois (área)	575772	26/02/2019 04:02	12723
Recuperação do padrão (%):	98,52		
Padrão injetado 17 horas depois (área)	226818	26/02/2019 13:01	12279
Recuperação do padrão (%):	38,81		
Padrão injetado 29 horas depois (área)	178713	27/02/2019 03:47	13307
Recuperação do padrão (%):	30,58		
Padrão injetado 30 horas depois (área)	178866	27/02/2019 04:04	13110
Recuperação do padrão (%):	30,60		

FONTE: O Autor.

Ao avaliar a Tabela 5 acima, pode-se afirmar que o estudo apresentou conformidade do sistema através do desvio obtido para as 6 injeções do padrão, que foi inferior a 1,5%, bem como atendeu o número de pratos teóricos, verificou-se também que apenas na primeira injeção a recuperação foi satisfatória, mesmo apresentando um resultado no limite do valor mínimo estabelecido para o estudo sendo este de 98,5% a 101,5%. As recuperações obtidas após a primeira injeção não são satisfatórias e foram analisadas estatisticamente através do teste de Grubbs, onde foram obtidos os seguintes resultados.

TABELA 6 - RESULTADO DO TESTE DE GRUBBS.

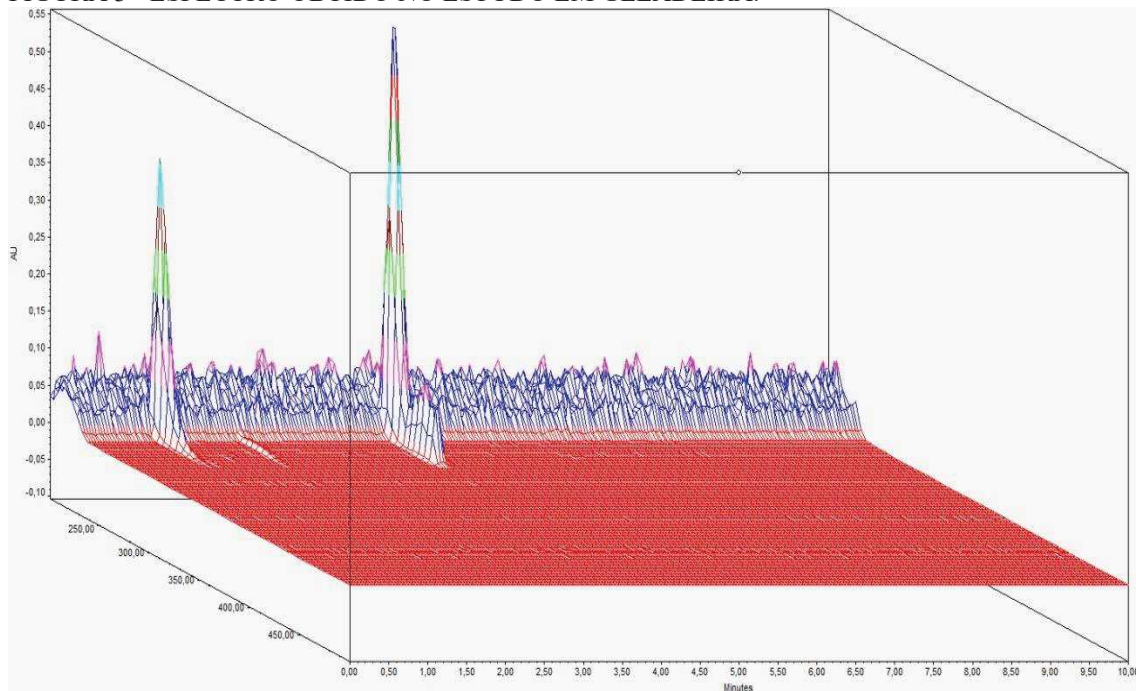
GRUPO		
Amostra	Resultado (%)	Teste
1	98,52	1,48951
2	38,81	-0,32956
3	30,58	-0,58028
4	30,6	-0,57967
Média	49,6275	
DPa	32,8245	
Observações	4	

FONTE: O Autor.

A partir dos valores encontrados dentro do grupo amostral, verificou-se que houve uma variação pequena entre a injeção 2, 3 e 4, porém a primeira injeção apresentou uma variação grande em relação às demais, o que acarretou em uma resposta maior que o valor estabelecido para o limite de 5%, pois o valor tabelado para 4 observações é de 1.463 e obteve-se dentro do grupo amostral um valor de 1,48951. Contudo esse valor não deve ser descartado, muito pelo contrário, esse valor informa que existe uma maior variação da resposta do método nesse ponto nula (LARSON, FABER, 2010).

Após avaliar a variação dentro do grupo amostral, levando em consideração as recuperações insatisfatórias obtidas, foi realizada a varredura do espectro visando confirmar que a estabilidade da solução padrão não é mantida sob essa condição, conforme mostra a Figura 3 abaixo.

FIGURA 3 - ESPECTRO OBTIDO NO ESTUDO EM GELADEIRA.



FONTE: O Autor.

Ao analisar a Figura 3, notou-se que houve o surgimento de um pico com intensidade significativa no espectro, porém o mesmo não interferiu na quantificação da solução em estudo, pois absorveu em uma região distinta do espectro, mesmo não sendo possível identificar qual o composto dentro de uma faixa espectral tão ampla, esse fato indicou a degradação do mesmo.

Diante deste contexto a condição avaliada não se mostrou satisfatória, pois no decorrer do tempo à solução padrão em estudo não manteve a estabilidade.

4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM ESTUFA

Para avaliar a estabilidade do armazenamento sob essa condição, foi realizado 1 estudo, e o resultado obtido está disposto na Tabela 7, onde será avaliada a conformidade do sistema e a recuperação da solução padrão no decorrer do tempo frente à primeira injeção.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DO PADRÃO ARMAZENADO EM ESTUFA.

Massa pesada do padrão de ibuprofeno (mg):	10,05		
Pureza do padrão (%):	99,66		
Injeções	Área das réplicas	Data/ Hora	Número de pratos teóricos
Inj 01	584583	25/02/2019 17:39	12696
Inj 02	585549	25/02/2019 17:50	12697
Inj 03	584091	25/02/2019 18:02	12686
Inj 04	583763	25/02/2019 18:13	12593
Inj 05	583099	25/02/2019 18:24	12634
Inj 06	585589	25/02/2019 18:35	12826
Médias das injeções	584445,7		
DPR %:	0,170		
Padrão injetado 8 horas depois (área)	598705	26/02/2019 03:51	12585
Recuperação do padrão (%):	102,44		
Padrão injetado 17 horas depois (área)	598436	26/02/2019 12:49	12799
Recuperação do padrão (%):	102,39		
Padrão injetado 24 horas depois (área)	607120	26/02/2019 20:17	12735
Recuperação do padrão (%):	103,88		
Padrão injetado 32 horas depois (área)	606948	27/02/2019 03:36	12678
Recuperação do padrão (%):	103,85		
Padrão injetado 55 horas depois (área)	633348	28/02/2019 03:00	12580
Recuperação do padrão (%):	108,37		

FONTE: O Autor.

De acordo com os dados dispostos na Tabela 7 acima, pode-se afirmar que o estudo apresentou conformidade do sistema através do desvio obtido para as 6 injeções do padrão, que foi inferior a 1,5%, bem como atendeu o número de pratos teóricos esperados para uma eficiente separação do analito, verificou-se também que após a realização da curva, já na primeira injeção não houve recuperação satisfatória.

Esses dados foram avaliados estatisticamente através do teste de Grubbs, conforme mostra a tabela 8 a seguir.

TABELA 8 - RESULTADO DO TESTE DE GRUBBS PARA A CONDIÇÃO ESTUFA.

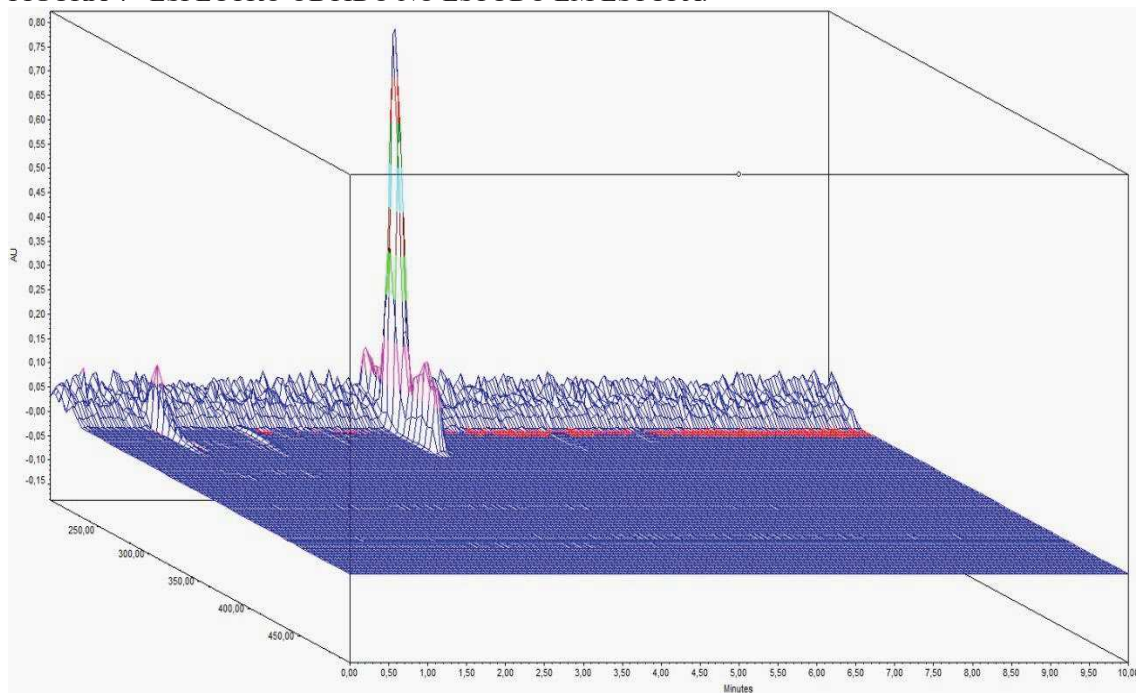
GRUPO		
Amostra	Resultado (%)	Teste
1	102,44	-0,71300
2	102,39	-0,73342
3	103,88	-0,12496
4	103,85	-0,13721
5	108,37	-1,70859
Média	104,1860	
DPa	2,4488	
Observações	5	

FONTE: O Autor.

Os valores obtidos a partir das amostras testadas individualmente utilizando a equação que utiliza os valores de média e desvio padrão encontram-se dentro do limite esperado, sendo que o valor que o limite para 5 observações para 5% de significância é 1,672, ou seja, houve uma pequena variação dentro do grupo amostral nula (LARSON, FABER, 2010).

Pelo fato do estudo não apresentar nenhuma recuperação satisfatória, dentro do limite estipulado ao estudo de 98,5 a 101,5%, pode-se afirmar que esta condição não é adequada, pois acarreta na degradação do mesmo ao longo do tempo. Visando confirmar essa degradação foi realizada a varredura do espectro, conforme mostra a Figura 4 abaixo.

FIGURA 4 - ESPECTRO OBTIDO NO ESTUDO EM ESTUFA.



FONTE: O Autor.

Ao analisar a Figura 4, percebe-se que houve o surgimento de um pico com intensidade pequena no espectro, esse pico absorveu em uma região diferente da pertinente à

solução em estudo, porém sua presença indica que ocorreu a degradação, o diluente utilizado no preparo da solução padrão de ibuprofeno é composto por uma mistura de acetonitrila e ácido tricloroacético, a acetonitrila apresenta ponto de ebulição de 82°C, por ser uma mistura esse comportamento muda. Portanto pode se dizer que possivelmente ocorreu a evaporação do solvente acarretando na concentração da amostra, apresentando uma área maior, por sua vez não recuperando em relação frente à primeira injeção.

Diante deste contexto a condição avaliada não se mostrou adequada para o armazenamento da solução padrão, pois no decorrer do tempo não manteve a estabilidade.

5 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste trabalho foi possível concluir que os resultados encontrados no estudo para duas condições: geladeira e estufa foram insatisfatórios, pois dentro de poucas horas após o seu preparo o mesmo já não apresentou recuperação, indicando que ambos acondicionamentos não mantêm a estabilidade do padrão. Possivelmente o aumento da área obtido no estudo em estufa indica que houve uma evaporação da acetonitrila, acarretando o aumento da área. Já para os resultados obtidos oriundos do acondicionamento em geladeira apresentaram não apresentaram recuperação satisfatória. O acondicionamento dos *vials* à temperatura ambiente apresentou recuperação satisfatória ao longo dos dias, pois manteve a estabilidade da solução por aproximadamente 24h, dispensando a necessidade de um preparo novo a cada campanha realizada, diminuindo assim o gasto de padrão bem como de reagentes, mostrando-se mais eficiente frente às outras condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA -. **RDC 166**: Critérios para a validação de métodos analíticos. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 20 março. 2019.

ANVISA, **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, Volume 1, Maio 2004.

GHAUCH, A; TUQAN, A. M.; KIBBI, N. Ibuprofen removal by heated persulfate in aqueous solution: a kinetics study. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 483–492, 2012.

HONÓRIO, Tereza Cristina de Deus. **Validação analítica de método em HPLC-PDA para avaliação do perfil de exposição a solventes orgânicos aromáticos em comunidade universitária**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2013.

KUMMER, Carmen Luize, COELHO, Tereza Cristina R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira Anestesiol**, v. 52, n. 4, p. 498 – 512 2002.

LARSON, Ron; FARBER, Betsy. **Estatística aplicada**. 4^a ed. São Paulo, 2010.

MONTEIRO, Rubens Teles. **Tratamento dos fármacos nimesulida e ibuprofeno em meio aquoso empregando UV/H₂O₂ e foto-fenton**. Dissertação do Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2017.

ORIQUI, Lucina Rodrigues. **Guia de estabilidade para a indústria química - definição de prazo de validade e proposição de prazo de reteste**. p. 143, 2012.

RIBANI, Marcelo et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J.Chromatogr A** 2003, 987, 57.

SKOOG, D.A. et. al. **Princípios de Análise Instrumental**, 5^a ed. Bookman, p. 641-652, 2002.

STOYANOVA, K.; VINAROV, Z.; TCHOLAKOVA, S. Improving ibuprofen solubility by surfactant-facilitated self-assembly into mixed micelles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 4-9, 2016.