
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“Otimização de Metodologia por Cromatografia Líquida em Fase Reversa por Pareamento Iônico para Análise Simultânea de Paracetamol, Cloridrato de Fenilefrina e Maleato de Carbinoxamina em Formulações Farmacêuticas”

Carina de Almeida Bastos

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação apresentada ao departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Química

Juiz de Fora – Julho de 2008

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Tania, e ao meu pai, Paulo, pelo suporte e pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs, Marina e Sabrina, à minha sobrinha, Mariana, e à Mel, mais nova integrante da família, por fazerem parte da minha vida.

À Tuxinha, por tornar minha vida mais feliz e continuar presente todos os dias.

Ao meu namorado Harleson, por compartilhar cada momento. Essa vitória é nossa!!!

Aos meus amigos, pelo companheirismo durante todos esses anos.

Ao professor e orientador Marcone Augusto Leal de Oliveira, pelos ensinamentos, pela compreensão, pela confiança e pela amizade.

Ao Departamento de Química, a todos os profissionais que o fazem ser como é.

À Medquímica, em especial, ao Márcio, pelas trocas de horário, e à Ana Paula e ao Jadir, por contribuírem para a realização desse sonho.

Ao coordenador do curso de farmácia da Universidade Presidente Antônio Carlos Professor José Otávio do Amaral Corrêa, pela experiência e pelo apoio.

A todos os meus professores e aos meus alunos, por me fazerem crescer a cada dia.

A Deus, por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA	
1.1 Características gerais	15
1.2 Metodologias analíticas utilizadas para a análise de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina	19
CAPÍTULO 2 - PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	
2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	22
2.1.1 Conceito	22
2.1.2 Instrumentação	22
2.1.3 Tipos de cromatografia	23
2.1.4 Cromatografia líquida por pareamento iônico	24
2.1.4.1 Princípios e fundamentos	26
2.1.5 Parâmetros de eficiência avaliados em cromatografia líquida de alta eficiência	27
2.2 Breve descrição da literatura sobre análise de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina por cromatografia líquida de alta eficiência	29
CAPÍTULO 3 - INSTRUMENTAÇÃO, MATERIAIS, REAGENTES, SOLUÇÕES E PREPARO DE AMOSTRAS	
3.1 Instrumentação	32

3.2	Reagentes e soluções	32
3.3	Espectros eletrônicos UV-visível	33
3.4	Fase móvel	33
3.4.1	Fase móvel para análise de fármacos em comprimidos	33
3.4.2	Fase móvel para análise de fármacos em solução oral	34
3.5	Preparo da amostra	34
3.5.1	Comprimidos	34
3.5.2	Solução oral	35
3.6	Coluna cromatográfica	35
3.7	Procedimentos analíticos	36
CAPÍTULO 4 - OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA EM COMPRIMIDOS		
4.1	Introdução	38
4.2	Objetivo	38
4.3	Resultados e discussão	38
4.3.1	Seleção do comprimento de onda	38
4.3.2	Seleção da fase móvel	40
4.3.3	Determinação quantitativa em formulações farmacêuticas	43
4.4	Conclusão	46
CAPÍTULO 5 - OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA EM SOLUÇÃO ORAL – ENSAIOS PRELIMINARES		
5.1	Introdução	48
5.2	Objetivo	48
5.3	Resultados e discussão	48
5.4	Conclusão	55
CAPÍTULO 6 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA EM COMPRIMIDOS		
6.1	Procedimentos de validação	57

6.2	Seletividade e linearidade	57
6.3	Precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	58
6.4	Exatidão	60
6.5	Robustez	62
CAPÍTULO 7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS		
7.1	Considerações finais	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Car	Maleato de carbinoxamina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Fen	Cloridrato de fenilefrina
Fig.	Figura
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	<i>International Conference Harmonization</i>
IRPLC	Cromatografia Líquida em Fase Reversa por Pareamento Iônico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
Me	Metanol
Par	Paracetamol
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura química de maleato de carbinoxamina, cloridrato de fenilefrina e paracetamol
- Figura 2** Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- Figura 3** Desenho esquemático para a determinação da assimetria em um pico cromatográfico
- Figura 4** Espectros eletrônicos de Par, Fen e Car
- Figura 5** Cromatograma da mistura de padrões de (1) - Par, 400 mg L⁻¹; (2) - Fen, 20 mg L⁻¹; e (3) - Car, 4,0 mg L⁻¹. 600 mL de metanol, 400 mL de água destilada, 3,4 g de fosfato de potássio monobásico, 1 mL de ácido fosfórico, 0,5 mL de trietilamina e 0,25 g de lauril sulfato de sódio foram usados como fase móvel. Condições operacionais: volume de injeção de 50 µL, fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min, coluna cromatográfica Luna C18 de dimensões 300 x 3,9 mm e tamanho das partículas de 5 µm mantida a 27°C e detector UV em 220 e 300 nm.
- Figura 6** Cromatogramas obtidos na análise das amostras: (A) - associação 1 e (B) - associação 2
- Figura 7** Cromatogramas obtidos na análise da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral: (1) - Par, 400 mg L⁻¹; (2) - Fen, 10 mg L⁻¹; e (3) - Car, 4,0 mg L⁻¹
- Figura 8** Cromatograma obtido na análise do placebo da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral
- Figura 9** Cromatograma obtido na análise do corante vermelho 40
- Figura 10** Cromatograma obtido na análise do ácido cítrico
- Figura 11** Cromatograma obtido na análise do metilparabeno
- Figura 12** Cromatograma obtido na análise da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral após a adição de carvão ativo
- Figura 13** Cromatograma obtido na análise da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral: (1) - Par, 400 mg L⁻¹; (2) - Fen, 10 mg L⁻¹; e (3) - Car, 4,0 mg L⁻¹

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
α	Seletividade
σ	Desvio padrão do intercepto
μ	Micra
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Microgramas por mililitro
μL	Microlitros
A/B	Assimetria do pico
C	Carbono
Cl	Cloro
cm	Centímetros
g	Gramas
H	Hidrogênio
k'	Fator de capacidade
K_a	Constante de dissociação
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramas
mg L^{-1}	Miligramas por litro
mg mL^{-1}	Miligramas por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitros

mL min⁻¹	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
N	Número de pratos
n	Número de experimentos realizados
n	normal
nm	Nanômetros
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
pK_a	- log K _a
s	Média dos coeficientes angulares das curvas de calibração
S	Enxofre
t'_r	Tempo de retenção ajustado
t'_{r1}	Tempo de retenção ajustado do componente 1
t'_{r2}	Tempo de retenção ajustado do componente 2
t_m	Tempo da fase móvel
t_r	Tempo de retenção
v v⁻¹	Volume por volume
w	Largura na base do pico

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Alguns medicamentos de referência comercializados no Brasil contendo paracetamol, cloridrato de fenilefrina e/ou maleato de carbinoxamina
- Tabela 2** Resultados estatísticos obtidos nos cálculos da linearidade (padrões + excipientes farmacêuticos)
- Tabela 3** Desvio Padrão Relativo (%) da área do pico obtido na repetibilidade e na precisão intermediária e LD e LQ em mg L⁻¹
- Tabela 4** Porcentagem de recuperação para Par, Fen e Car
- Tabela 5** Parâmetros selecionados para a robustez
- Tabela 6** Resultados da robustez para Associação 1 e 2 em recuperação (%)
- Tabela 7** Parâmetros de eficiência avaliados durante a robustez

RESUMO

Uma metodologia alternativa por cromatografia líquida em fase reversa por pareamento iônico para a análise simultânea de paracetamol e cloridrato de fenilefrina (associação 1) e paracetamol e maleato de carbinoxamina (associação 2) em comprimidos foi proposta. Fase móvel consistindo de 60% de metanol e 40% de solução aquosa de fosfato de potássio monobásico anidro (62,46 mM) adicionada com 0,5 mL de trietilamina, 0,25 g de lauril sulfato de sódio e 1 mL de ácido fosfórico foi usada, com volume de injeção de 50 µL, fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min, coluna cromatográfica C18 de dimensões 300 x 3,9 mm e tamanho das partículas de 5 µm mantida a 27°C, detector UV em 220 e 300 nm, e tempo de análise de 6 min. O método proposto para a análise dos comprimidos foi aplicado na análise de medicamentos na forma farmacêutica de solução oral, que contém os três fármacos em associação. Devido à presença de interferentes nestas formulações, o método foi então reotimizado e nova fase móvel consistindo de 480 mL de acetonitrila, 3520 mL de heptanossulfonato de sódio 0,005 M em água, e 4 mL de ácido fosfórico foi usada, com volume de injeção de 100 µL e fluxo de 2,0 mL/min. Os parâmetros avaliados na validação analítica para as associações 1 e 2 foram: seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. Devido à simplicidade, seletividade, precisão, exatidão e rapidez, a metodologia é uma alternativa interessante para assegurar a qualidade dessas drogas na indústria farmacêutica.

Palavras-Chave: cromatografia líquida em fase reversa por pareamento iônico, paracetamol, fenilefrina, carbinoxamina, formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

An alternative methodology by ion-pair reversed phase liquid chromatography for simultaneous analysis of acetaminophen and phenylephrine hydrochloride (association 1) and acetaminophen and carbinoxamine maleate (association 2) in tablets was proposed. Mobile phase consisting of 60% methanol and 40% potassium monobasic phosphate aqueous solution (62.46 mM) added with 0.5 mL triethylamine, 0.25 g sodium lauryl sulfate and 1 mL of phosphoric acid was used, with injection volume of 50 μ L, mobile phase flow of 1.0 mL/min, chromatographic column C18 of dimensions 300 x 3.9 mm and particle size of 5 μ m maintained at 27°C, UV detection at 220 and 300 nm, within 6 min. The proposed method for the analysis of tablets was applied in the analysis of drugs in the pharmaceutical form of oral solution, which contains the three drugs in combination. Due to the presence of interfering in these formulations, the method was again optimized and new mobile phase consisting of 400 mL of acetonitrile, 3520 mL of sodium heptane sulfonate 0.005 M in water, and 4 mL of phosphoric acid was used, with injection volume of 100 μ L and flow of 1.0 mL/min. The analytical validation parameters evaluated for association 1 and 2 were: selectivity, linearity, repeatability, intermediate precision, limit of detection, limit of quantification, accuracy and robustness. Due to its simplicity, selectivity, precision, accuracy and rapidity, the methodology can be an interesting alternative for quality assurance in the pharmaceutical industry of these drugs.

Keywords: ion-pair reversed phase liquid chromatography, acetaminophen, phenylephrine, carbinoxamine, pharmaceutical formulations.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA

1.1 Características gerais [1]

O resfriado comum é doença viral causada especialmente por rinovírus e coronavírus, consistindo em infecção aguda das mucosas das vias respiratórias superiores. A transmissão se faz principalmente por contato direto e raramente através de perdigotos, espirros ou tosse. Os indivíduos doentes disseminam o agente etiológico em suas secreções respiratórias, como o muco nasal, contaminando mãos e objetos.

O resfriado comum é normalmente benigno e autolimitado e geralmente desaparece dentro de uma ou duas semanas, a menos que sobrevenha infecção bacteriana secundária.

Visto que não existe tratamento específico para o resfriado comum, basta aliviar os sintomas da doença.

O tratamento sintomático consiste no uso de medicamentos que aliviam a congestão nasal, secam as membranas da mucosa nasal e baixam a febre e a dor. Isto é conseguido pelo emprego de vários fármacos, pois não há nenhum que exerça sozinho os três efeitos. As associações medicamentosas são muito utilizadas, pois proporcionam meio mais conveniente e às vezes menos oneroso do que o emprego de vários fármacos isolados.

Em geral, os medicamentos contra o resfriado comum contêm um descongestionante nasal, um anti-histamínico e um analgésico. Podem, todavia, incorporar outros componentes.

Os principais integrantes dos descongestionantes nasais são constituídos pelas aminas simpatomiméticas, que exercem ação estimulante nos receptores α -

adrenérgicos. Elas ativam os receptores α no músculo liso vascular, causando assim, na mucosa nasal, vasoconstricção das arteríolas dilatadas e redução do fluxo sanguíneo na área ingurgitada, edematosa. As formas farmacêuticas preferidas são os aerossóis de aplicação tópica, pois proporcionam maior alívio sintomático e causam menor incidência de efeitos adversos; lamentavelmente, produzem congestão nasal reflexa, o que recomenda limitar seu uso de três a cinco dias.

Os anti-histamínicos são constituintes freqüentes de associações medicamentosas para tratamento do resfriado comum. Em consequência de suas propriedades atropínicas, eles secam as secreções nasais e provocam sedação, embora estes efeitos sejam mínimos. A sonolência é a reação adversa mais comum, ocorrendo em 20% dos pacientes.

Os analgésicos mais comumente presentes em associações para alívio do resfriado são ácido acetilsalicílico, metamizol sódico e paracetamol. Menos usados são carbasalato cálcico e salicilamida.

Alguns medicamentos disponíveis atualmente no mercado brasileiro reúnem três importantes fármacos: o paracetamol (Par), que é um analgésico e antipirético, com o cloridrato de fenilefrina (Fen), que é um descongestionante nasal, e o maleato de carbinoxamina (Car), como anti-histamínico (Tabela 1).

Tabela 1. Alguns medicamentos de referência comercializados no Brasil contendo paracetamol, cloridrato de fenilefrina e/ou maleato de carbinoxamina.

Fármaco	Laboratório	Medicamento de Referência	Concentração	Forma Farmacêutica
Paracetamol + cloridrato de fenilefrina + maleato de carbinoxamina	Bristol Myers Squibb	Naldecon	40 mg/mL + 1 mg/mL + 0,4 mg/mL	Solução oral
Paracetamol + cloridrato de fenilefrina (comprimido amarelo) + paracetamol (comprimido branco)	Bristol Myers Squibb	Naldecon Dia	400 mg + 20 mg (comprimido amarelo) + 400 mg (comprimido branco)	Comprimido simples
Paracetamol + cloridrato de fenilefrina (comprimido amarelo) + paracetamol + maleato de carbinoxamina (comprimido laranja)	Bristol Myers Squibb	Naldecon	400 mg + 20 mg (comprimido amarelo) + 400 mg + 4 mg (comprimido laranja)	Comprimido simples
Paracetamol + maleato de carbinoxamina	Nature's Plus	Triscon	120 mg/mL + 2 mg/mL	Solução oral

O paracetamol, conhecido nos Estados Unidos como acetaminofeno, é o analgésico-antipirético de eleição para os pacientes alérgicos ao ácido acetilsalicílico ou com antecedentes de úlcera péptica. Sua eficácia é equivalente à do ácido acetilsalicílico, mas não possui propriedades antiinflamatórias. Julga-se que sua ação decorra da inibição da síntese de prostaglandinas.

A fenilefrina, entre os descongestionantes nasais, é um dos mais utilizados. Atua sobre os receptores α -adrenérgicos. Sua ação tem início rápido e dura de 30 minutos a 4 horas. Causa pouco ou nenhum estímulo do Sistema Nervoso Central. Usada na forma de cloridrato.

A carbinoxamina tem ações anti-histamínicas H₁, antiserotoninérgica e anticolinérgica. Usada na forma de maleato. Comercializada apenas em associações, principalmente indicadas para o tratamento sintomático do resfriado comum. Sua meia-vida é de 10 a 20 horas e a ação dura 3 a 6 horas.

A Figura 1 mostra a estrutura química dos três compostos.

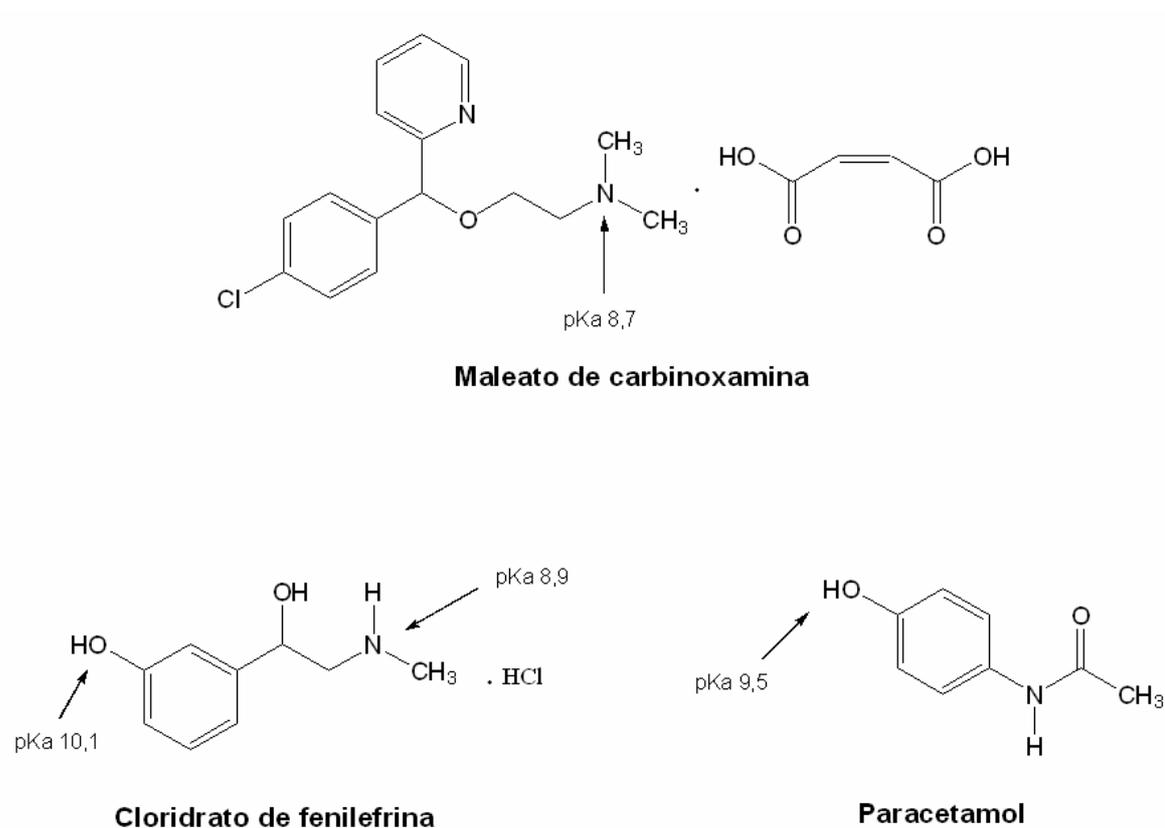


Figura 1. Estrutura química de maleato de carbinoxamina, cloridrato de fenilefrina e paracetamol.

1.2 Metodologias analíticas utilizadas para a análise de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina

Dentre as metodologias analíticas usualmente utilizadas, destacam-se: volumetria [2], espectrofotometria ultravioleta-visível [2,3], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [3-16] e a eletroforese capilar [16-18]. Entretanto, as metodologias

analíticas citadas contemplam a análise dos fármacos de interesse isoladamente ou em diferentes combinações, contendo apenas dois deles.

CAPÍTULO 2

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência [19]

2.1.1 Conceito

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC), usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contém partículas microporosas com grande pureza e formato esférico, que são permeáveis ao solvente e têm uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama. As análises são mais rápidas e a eficiência é muito mais elevada quando comparada à cromatografia líquida clássica. Além disso, o formato instrumental permite o uso de detectores, tais como: ultravioleta, índice de refração, espectrometria de massas, fluorescência, condutividade, eletroquímicos, ressonância magnética nuclear, infravermelho com transformada de Fourier e evaporativo com espalhamento de luz.

2.1.2 Instrumentação

O dispositivo para a CLAE consiste em um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção da amostra, uma coluna de alta performance, um detector e um computador para controle, aquisição e tratamento dos resultados. Muitos dispositivos

incluem um forno para o controle da temperatura da coluna. A Figura 2 mostra o dispositivo para a CLAE.



Figura 2. Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.1.3 Tipos de cromatografia

A cromatografia é dividida em diferentes categorias com base no mecanismo de interação entre o soluto e a fase estacionária.

Cromatografia de adsorção: utiliza uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida ou gasosa. O soluto é adsorvido na superfície das partículas sólidas. Quanto mais fortemente um soluto for adsorvido, mais lentamente ele se deslocará através da coluna.

Cromatografia de partição: uma fase estacionária líquida está ligada a uma superfície sólida. O soluto encontra-se em equilíbrio entre a fase estacionária líquida e a fase móvel. O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Então, os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto os menos solúveis são transportados mais rapidamente pela fase móvel.

Cromatografia de exclusão molecular: também chamada de cromatografia de filtração em gel ou cromatografia de permeação em gel. Esta técnica separa as moléculas pelo tamanho, com os solutos maiores passando com maior velocidade pela coluna. No caso ideal da exclusão molecular, ao contrário de outros tipos de cromatografia, não há interações atrativas entre a “fase estacionária” e o soluto. De forma mais exata, a fase móvel, líquida ou gasosa, passa através de um gel poroso. Os poros são suficientemente pequenos para excluírem as moléculas maiores de soluto, mas não as menores. O fluxo de moléculas grandes passa sem entrar pelos poros do gel. As moléculas pequenas levam mais tempo para passar através da coluna, pois elas penetram no gel e, portanto, têm que fluir por um volume maior antes de saírem da coluna.

Cromatografia de afinidade: esta espécie mais seletiva de cromatografia utiliza interações específicas entre um tipo de molécula do soluto e uma segunda molécula

que se encontra covalentemente ligada (imobilizada) à fase estacionária. Por exemplo, a molécula imobilizada pode ser um anticorpo para uma determinada proteína. Quando uma mistura aquosa, contendo milhares de proteínas, passa através da coluna, somente uma proteína é capaz de reagir com um determinado anticorpo que está ligado à coluna, a proteína de interesse é desalojada por meio de uma mudança no valor do pH ou da força iônica do meio.

Cromatografia de troca iônica: ânions, como SO_3^- , ou cátions, como $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, estão ligados covalentemente à fase estacionária sólida, que neste tipo de cromatografia costuma ser uma resina. Os íons do soluto, com carga oposta, são atraídos para a fase estacionária por forças de natureza eletrostática. A fase móvel, neste caso, é um líquido.

2.1.4 Cromatografia líquida por pareamento iônico

A cromatografia de par iônico, uma versão de alto desempenho da cromatografia por troca iônica, usa uma coluna de CLAE com fase reversa em lugar de uma coluna de troca iônica.

2.1.4.1 Princípios e fundamentos

Para separar uma mistura de cátions, (por exemplo, bases orgânicas protonadas), adiciona-se à fase móvel um surfactante aniônico, como o $n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_3^-$. O surfactante se aloja na fase estacionária, transformando efetivamente a fase estacionária em trocador de íons. Quando os cátions do analito passam através da coluna, eles podem se associar com a fase estacionária devido à atração eletrostática com os ânions do surfactante. O mecanismo de retenção é uma mistura das interações de fase reversa e troca iônica. Para separar ânions do analito, pode-se adicionar sais de tetrabutylamônio à fase móvel como o reagente formador de par iônico.

A cromatografia de par iônico é mais complexa que a cromatografia de fase reversa, pois o equilíbrio entre o surfactante e a fase estacionária é lento, a separação é mais sensível às variações de temperatura e de pH, e a concentração do surfactante afeta a separação. O metanol é o solvente orgânico preferido, pois os surfactantes iônicos são mais solúveis em misturas água/metanol que em misturas acetonitrila/água. A estratégia para o desenvolvimento do método leva em consideração o pH e a concentração do surfactante, mantendo constantes a concentração de metanol e a temperatura. Devido ao lento equilíbrio do surfactante com a fase estacionária, a eluição por gradiente não é recomendada na cromatografia de par iônico.

2.1.5 Parâmetros de eficiência avaliados em cromatografia líquida de alta eficiência

Para monitorar o desempenho de uma determinada coluna, é uma boa prática medir periodicamente o fator de capacidade de um padrão (k'), a seletividade (α), o número de pratos (N) e a assimetria do pico (A/B). Mudanças nesses parâmetros refletem a degradação da coluna.

Para cada pico no cromatograma, o fator de capacidade (k'), também chamado de fator de retenção, razão de retenção ou razão de partição, é definido como:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Onde t_r é o tempo necessário para o soluto percorrer o comprimento da coluna e t_m é o tempo necessário para o solvente, que não sofre retenção, percorrer o mesmo caminho. Quanto mais um componente é retido pela coluna, maior é o seu fator de capacidade.

O tempo de retenção ajustado para um soluto é o tempo adicional necessário para o soluto percorrer o comprimento da coluna, além do tempo necessário para o solvente, que não sofre retenção, percorrer o mesmo caminho:

$$t'_r = t_r - t_m$$

Para dois componentes, 1 e 2, quaisquer, a seletividade (α), é a razão entre seus tempos de retenção ajustados:

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

Onde $t'_{r2} > t'_{r1}$, de modo que $\alpha > 1$. Quanto maior a retenção relativa, maior a separação entre os dois componentes.

O número de pratos na coluna (N) é definido como:

$$N = \frac{16 \times t_r^2}{w^2}$$

Onde t_r é o tempo de retenção do pico e w é a largura na base. Quanto maior o N maior é a eficiência da coluna.

As colunas para CLAE devem ser capazes de fornecer picos estreitos e simétricos. O fator de assimetria A/B deve situar-se na faixa entre 0,9 e 1,5 (Figura 3). A medida é feita tomando-se como referência a largura da base a 10% da altura da banda.

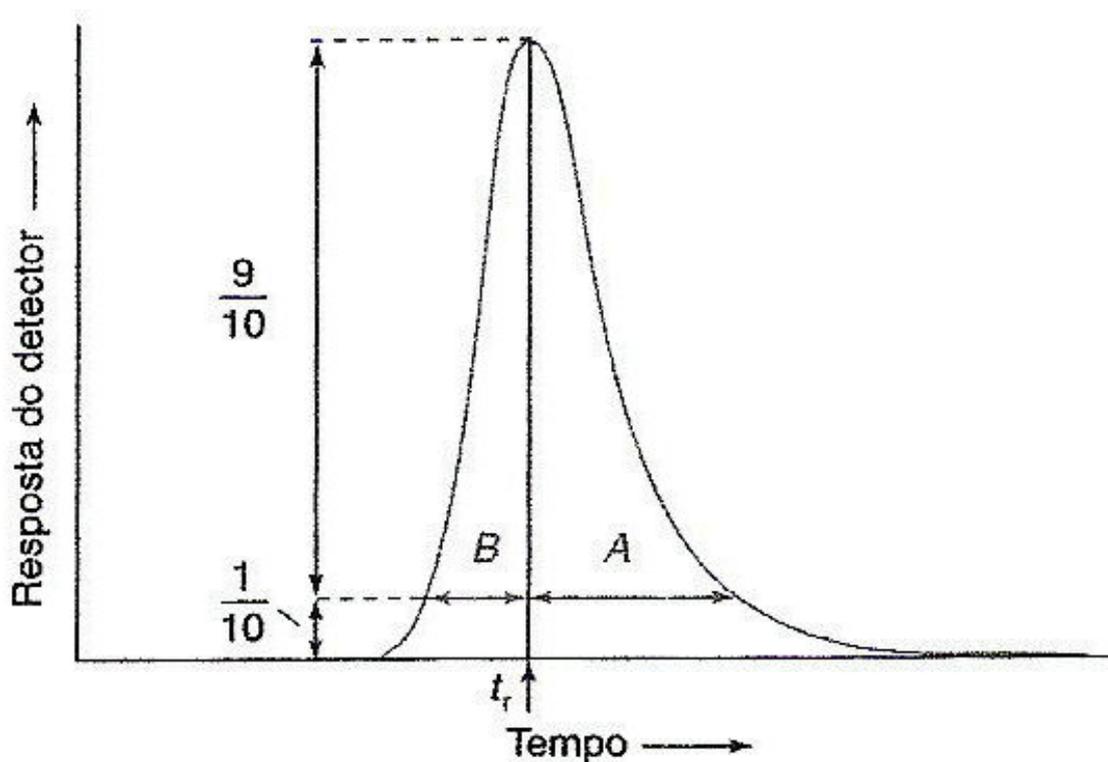


Figura 3. Desenho esquemático para a determinação da assimetria em um pico cromatográfico.

2.2 Breve descrição da literatura sobre análise de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina por cromatografia líquida de alta eficiência

Barbas e colaboradores desenvolveram um método para a determinação de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em formas farmacêuticas usando duas colunas cianopropil, uma proporção constante de solvente aquoso/orgânico (95:5, v/v) e um gradiente de pH de 7,5 a 2,0 com tempo de corrida de 14 minutos [13].

Shervington e Sakhnini desenvolveram um método para a determinação de paracetamol e de cinco de seus derivados para-substituídos usando um sistema de cromatografia de fase reversa em modo isocrático. A coluna consistiu de fase estacionária C18 10 μm e a fase móvel foi uma mistura de acetonitrila e água (7:3) [15].

Erk e Kartal desenvolveram um método para a determinação de maleato de clorfeniramina e cloridrato de fenilefrina em formas farmacêuticas usando uma coluna C18 de tamanho 200 x 4,6 mm, 5 μm , com detector ultravioleta (UV) em 269 nm e fase móvel consistindo de metanol/tampão fosfato (50 mL de fosfato de potássio monobásico 0,2 M + 34,7 mL de hidróxido de sódio 0,2 M; 70:30, pH 7,2) [10].

Lau e Mok desenvolveram um método para a determinação de oito ingredientes ativos em xaropes, entre eles o cloridrato de fenilefrina. Foi usada uma coluna ciano de tamanho 250 x 4,6 mm, 5 μm , uma fase móvel consistindo de uma mistura de água:acetonitrila:etanol (38:60:2) contendo 1 mM ácido perclórico e volume de injeção de 20 μL [11].

Entretanto, nenhuma das metodologias descritas na literatura contempla a análise simultânea dos três fármacos considerados.

CAPÍTULO 3

INSTRUMENTAÇÃO, MATERIAIS, REAGENTES, SOLUÇÕES E PREPARO DE AMOSTRAS

3.1 Instrumentação

Os experimentos envolvendo a otimização da separação foram desenvolvidos em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência modelo Waters 1525 (Massachusetts, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos modelo 2996 mantido a 220 e 300 nm, com controlador de temperatura mantido a 27°C e software de aquisição e tratamento de dados (Empower Personal Workstation system). As amostras foram injetadas manualmente; com volume de injeção de 50 µL e fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min.

As medidas de absorção no espectro foram feitas em um espectrofotômetro UV-visível com duplo feixe (modelo UV mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japão) usando cubetas de quartzo de caminho ótico igual a 1,0 cm.

3.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Acetonitrila, ácido fosfórico, fosfato de potássio monobásico, heptanossulfonato de sódio, metanol, etanol, trietilamina e lauril sulfato de sódio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina foram adquiridos da Farmacopéia Americana (Rockville, USA). Paracetamol foi adquirido da Farmacopéia Brasileira (Rio

de Janeiro, Brasil). Amostras de comprimidos e seus respectivos excipientes farmacêuticos foram adquiridos da Medquímica (Juiz de Fora, Brasil).

3.3 Espectros eletrônicos UV-visível

Os espectros eletrônicos no UV-visível foram obtidos sob as seguintes condições: Par: 7,5 mg L⁻¹; Fen: 20 mg L⁻¹; Car: 20 mg L⁻¹. Todas as soluções foram diluídas em etanol.

3.4 Fase móvel

3.4.1 Fase móvel para análise de fármacos em comprimidos

Uma solução contendo 600 mL de metanol, 400 mL de água destilada; 3,4 g de fosfato de potássio monobásico; 0,5 mL de trietilamina; 0,25 g de lauril sulfato de sódio e 1 mL de ácido fosfórico P.A. foi usada como fase móvel. Os padrões de Par, Fen e Car foram diluídos em fase móvel até as concentrações de 400,0; 20,0 e 4,0 µg/mL, respectivamente, e filtrados através de filtro Millipore de 0,45 µm (São Paulo, Brasil)

antes da injeção. Os excipientes farmacêuticos foram diluídos em fase móvel e filtrados através de filtro Millipore de 0,45 µm (São Paulo, Brasil) antes da injeção.

3.4.2 Fase móvel para análise de fármacos em solução oral

Uma solução contendo 480 mL de acetonitrila, 3520 mL de heptanossulfonato de sódio 0,005 M em água destilada; e 4 mL de ácido fosfórico foi usada como fase móvel. Os padrões de Par, Fen e Car foram diluídos em fase móvel até as concentrações de 400,0; 10,0 e 4,0 µg/mL, respectivamente, e filtrados através de filtro Millipore de 0,45 µm (São Paulo, Brasil) antes da injeção. Os excipientes farmacêuticos foram diluídos em fase móvel e filtrados através de filtro Millipore de 0,45 µm (São Paulo, Brasil) antes da injeção.

3.5 Preparo da amostra

3.5.1 Comprimidos

A formulação farmacêutica da associação 1 contendo 400 mg de Par, 20 mg de Fen e 206,8 mg de excipientes e a formulação farmacêutica da associação 2 contendo

400 mg de Par, 4 mg de Car e 222,0 mg de excipientes foram separadamente pesadas e dissolvidas em 100 mL de fase móvel em um balão volumétrico. 5,0 mL dessas soluções foram separadamente transferidos para 50 mL de fase móvel em um balão volumétrico e filtradas através de filtro Millipore de 0,45 μm .

3.5.2 Solução oral

A formulação farmacêutica contendo 40 mg de Par, 1 mg de Fen e 0,4 mg de Car em 1 mL de excipientes foi pesada e dissolvida em 100 mL de fase móvel em um balão volumétrico e filtrada através de filtro Millipore de 0,45 μm .

3.6 Coluna cromatográfica

Coluna cromatográfica Luna C18 de dimensões 300 x 3,9 mm e tamanho das partículas de 5 μm (Phenomenex, USA) foi usada.

3.7 Procedimentos analíticos

Antes de cada análise, a fase móvel descrita no item 3.4 foi bombeada no sistema de coluna do HPLC durante 30 minutos até a estabilização da linha de base.

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA EM COMPRIMIDOS

4.1 Introdução

Devido à importância dos comprimidos que contém estes fármacos, faz-se necessário a otimização de métodos analíticos de alta eficiência para a análise de tais substâncias, com o intuito de monitorar o teor de cada princípio ativo presente nestes medicamentos.

4.2 Objetivo

Otimizar uma metodologia para análise simultânea de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina em comprimidos.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Seleção do comprimento de onda

A seleção do comprimento de onda foi baseada no espectro UV-visível obtido para cada componente dissolvido em etanol até concentração adequada (Figura 4). Os

comprimentos de onda selecionados foram 220 nm para Fen e Car, visto que neste comprimento de onda ambos apresentaram picos máximos, e 300 nm para Par, pois o mesmo apresenta sinal do pico saturado em 220 nm (comprimento de onda escolhido para os demais), mas em 300 nm ele apresenta sinal aceitável para a análise da amostra nesse comprimento de onda.

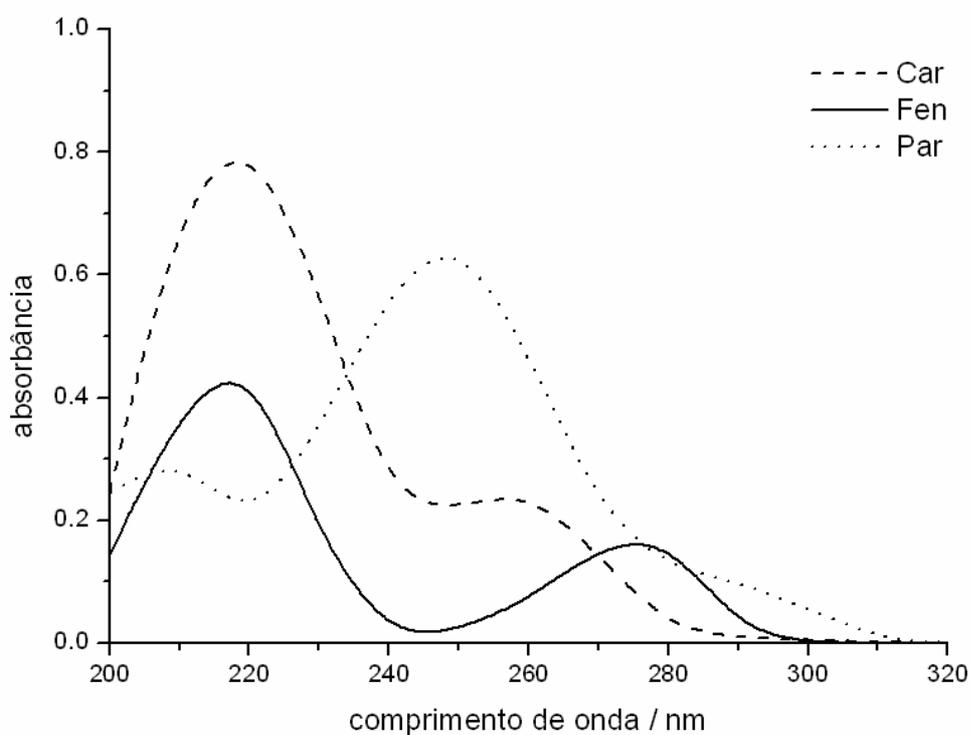


Figura 4. Espectros eletrônicos de Par, Fen e Car.

4.3.2 Seleção da fase móvel

Cromatografia líquida em fase reversa por pareamento iônico (IRPLC) foi investigada para a separação de Par, Fen e Car simultaneamente, baseando-se no trabalho descrito na Farmacopéia Americana para a análise de maleato de clorfeniramina associado com cloridrato de fenilpropanolamina [4]. Nesse caso, o maleato de clorfeniramina foi separado do cloridrato de fenilpropanolamina usando lauril sulfato de sódio como reagente de pareamento iônico adicionado à fase móvel. Uma vez que o maleato de clorfeniramina apresenta estrutura semelhante ao maleato de carbinoxamina, a mesma metodologia foi utilizada, com algumas adaptações, considerando variáveis como pH e solvente orgânico. O controle do pH usando IRPLC é um parâmetro essencial, que controla o grau de ionização da amostra e então o tempo de retenção dos compostos. Dentro deste contexto, o fosfato de potássio monobásico e o ácido fosfórico foram usados para promover a formação de par iônico dos solutos básicos com o contra-íon (pH aparente $\approx 4,1$). O metanol foi utilizado como modificador orgânico e a trietilamina foi empregada para reduzir o fator de cauda dos solutos básicos, causado pela interação desses compostos com os grupos silanóis livres na superfície da coluna C18.

A Figura 5 mostra os cromatogramas para a mistura de padrões obtidos após otimização das variáveis, de acordo com as características apresentadas anteriormente. A separação completa da mistura de padrões em modo isocrático foi alcançada em 6 min. O volume do looping de injeção foi de 50 μL , a fim de otimizar o sinal da Car, a

qual estava em uma concentração muito menor do que o Par. O fluxo da fase móvel foi ajustado a 1,0 mL/min para manter a pressão menor do que 3000 psi.

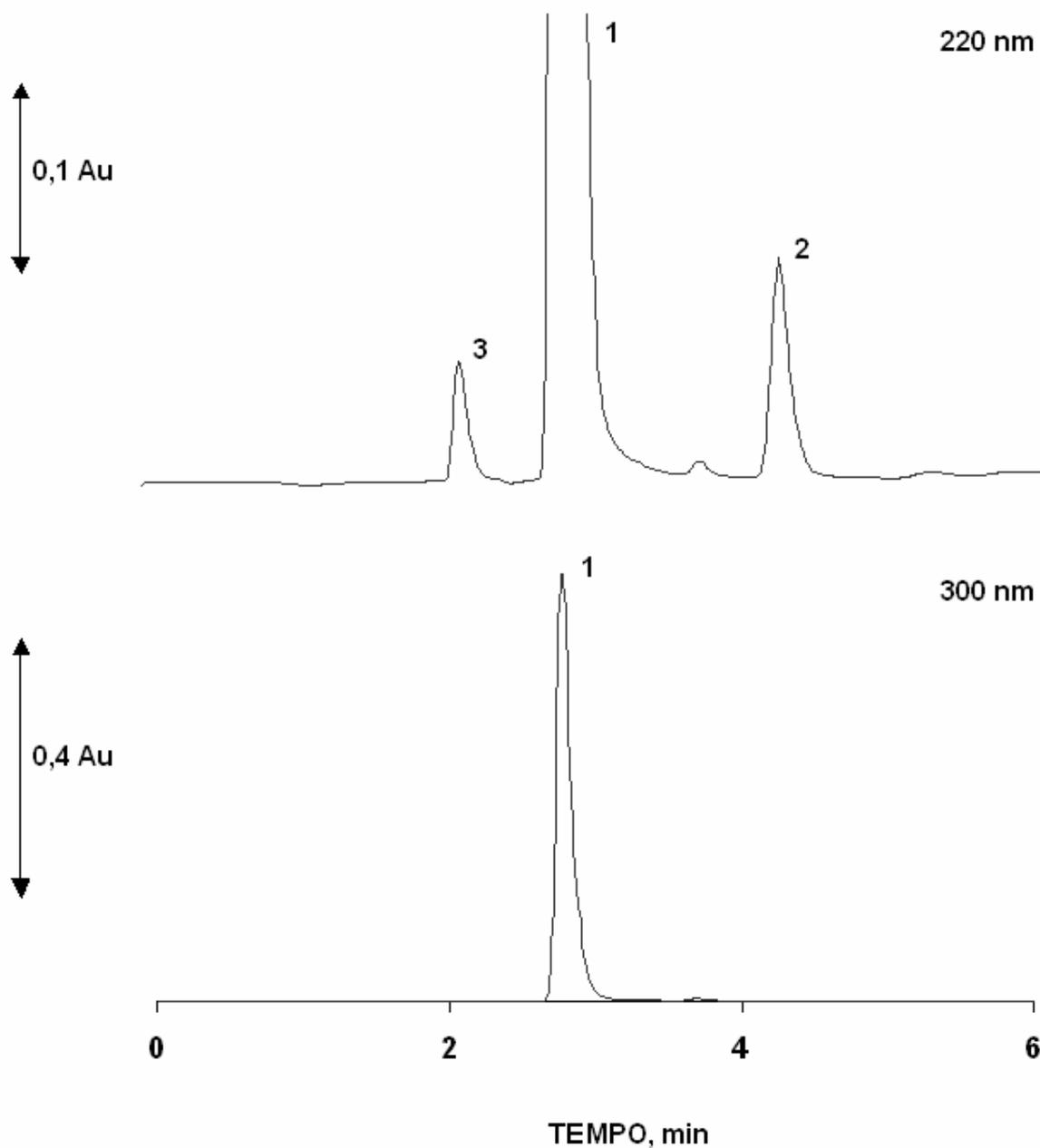


Figura 5. Cromatograma da mistura de padrões de (1) - Par, 400 mg L⁻¹; (2) - Fen, 20 mg L⁻¹; e (3) - Car, 4,0 mg L⁻¹. 600 mL de metanol, 400 mL de água destilada, 3,4 g de fosfato de potássio monobásico, 1 mL de ácido fosfórico, 0,5 mL de trietilamina e 0,25 g de lauril sulfato de sódio foram usados como fase móvel. Condições operacionais: volume de injeção de 50 µL, fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min, coluna cromatográfica Luna C18 de dimensões 300 x 3,9 mm e tamanho das partículas de 5 µm mantida a 27°C e detector UV em 220 e 300 nm.

4.3.3 Determinação quantitativa em formulações farmacêuticas

O método otimizado foi aplicado para a determinação quantitativa de comprimidos da associação 1, compostos por 400 mg de Par e 20,0 mg de Fen; e da associação 2, compostos por 400 mg de Par e 4,00 mg de Car. A Figura 6 mostra os cromatogramas obtidos nas análises das amostras.

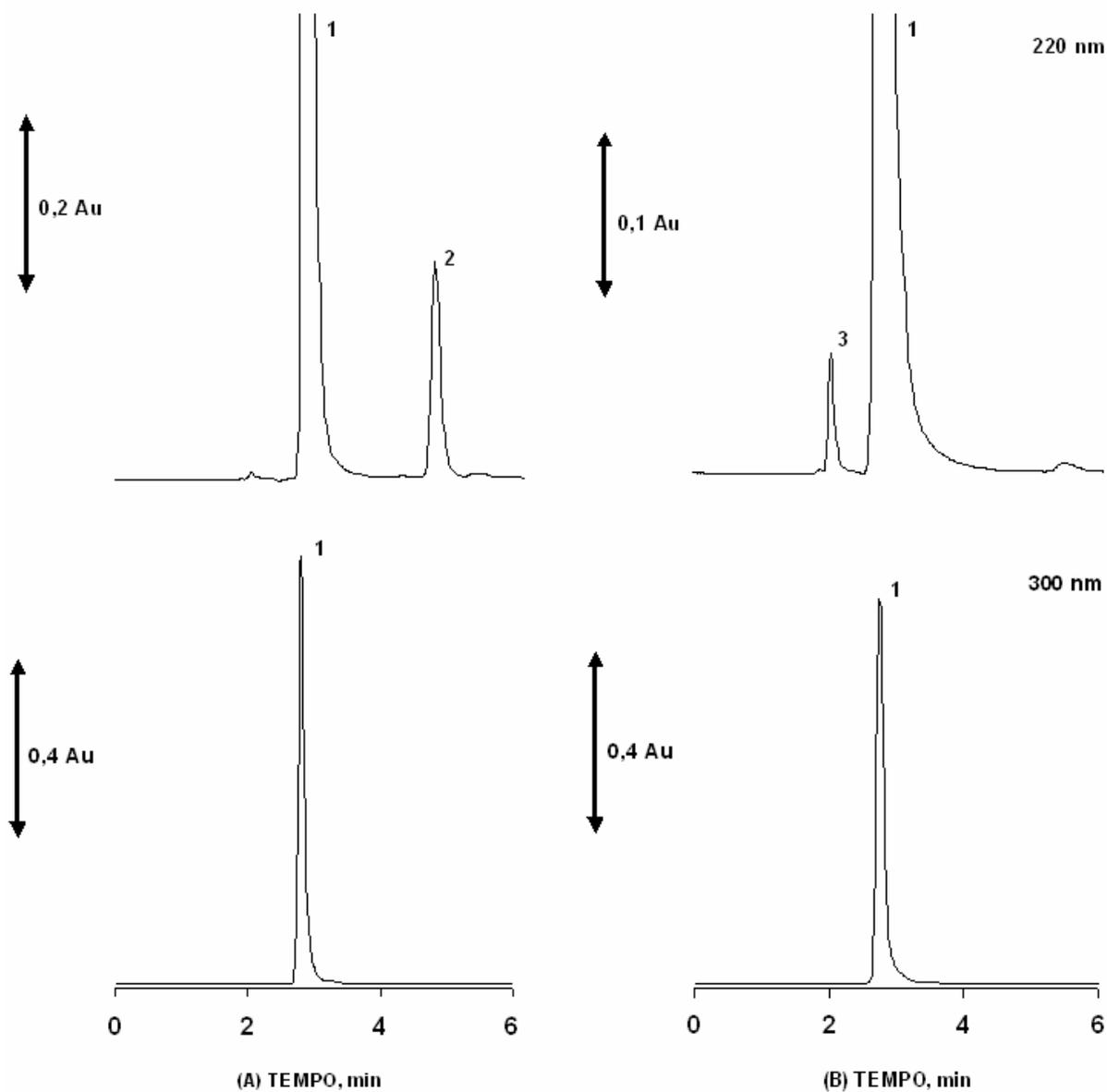


Figura 6. Cromatogramas obtidos na análise das amostras: (A) - associação 1 e (B) - associação 2. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

O método otimizado para comprimidos foi testado na separação dos analitos na forma farmacêutica solução oral, onde foram obtidos os seguintes cromatogramas:

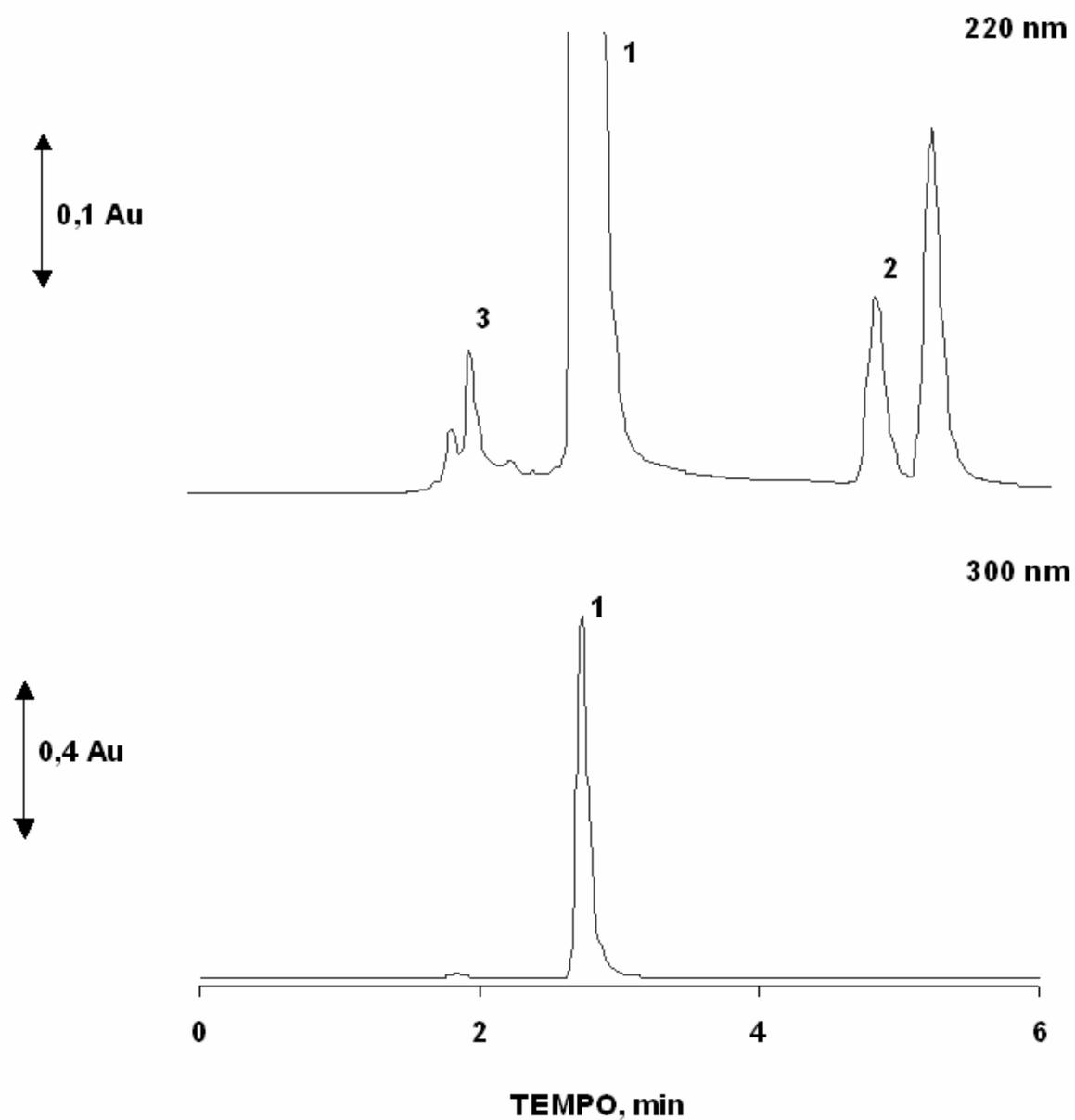


Figura 7. Cromatogramas obtidos na análise da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral: (1) - Par, 400 mg L⁻¹; (2) - Fen, 10 mg L⁻¹; e (3) - Car, 4,0 mg L⁻¹. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

Observa-se através da Figura 7 a presença de três picos na amostra além dos picos dos princípios ativos em 220 nm para a forma farmacêutica solução oral, os quais comprometeram a separação.

4.4 Conclusão

O método otimizado para a forma farmacêutica comprimidos mostrou-se ineficaz para análise dos analitos na solução oral, devido à presença de interferentes. Logo, o mesmo foi submetido a reotimização com o intuito de ser testado para a análise desta outra forma farmacêutica.

CAPÍTULO 5

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PARACETAMOL,
CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA EM SOLUÇÃO
ORAL – ENSAIOS PRELIMINARES**

5.1 Introdução

O controle da qualidade dos produtos na forma farmacêutica de solução oral ainda é deficiente, devido à falta de método analítico para a separação e quantificação dos três fármacos quando presentes em associação.

5.2 Objetivo

Desenvolvimento de metodologia para análise simultânea de paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de carbinoxamina em solução oral.

5.3 Resultados e discussão

Como foi observada a presença de três picos na amostra além dos picos dos princípios ativos em 220 nm na análise da solução oral utilizando o método otimizado para a forma farmacêutica comprimidos, injetou-se, após diluição em fase móvel até concentração adequada, o placebo da solução oral. Para o placebo foi preparada uma solução contendo todos os outros constituintes do medicamento (excipientes), com exceção dos princípios ativos. O cromatograma obtido encontra-se na Figura 8.

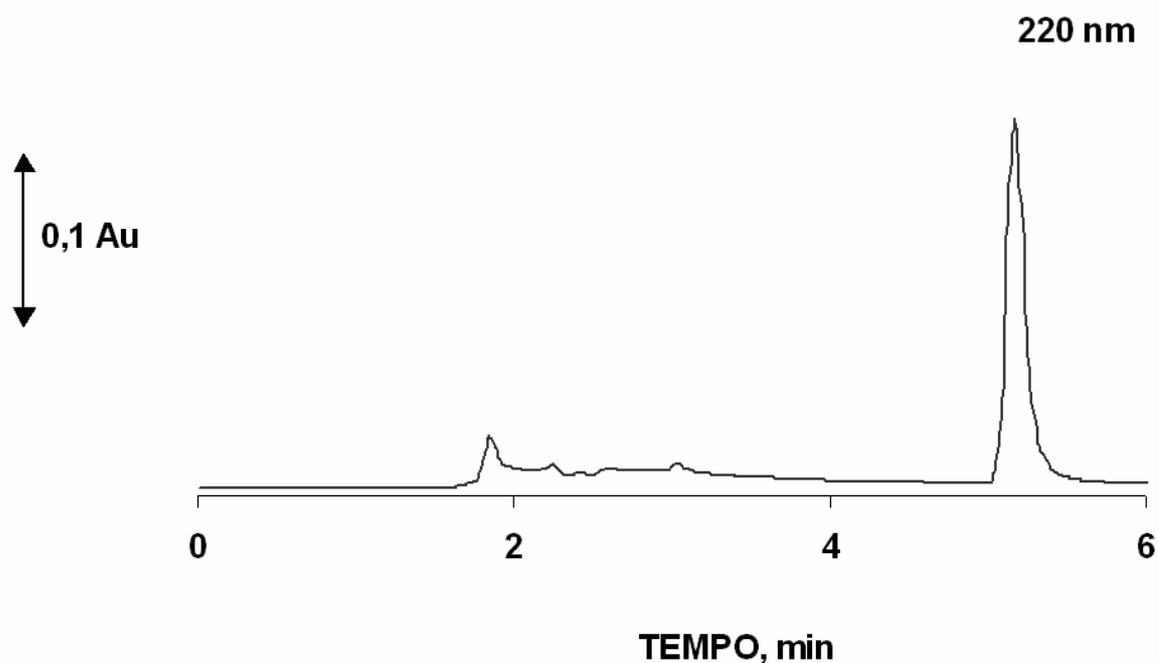


Figura 8. Cromatograma obtido na análise do placebo da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

Foi observada a presença de picos no placebo interferindo com os picos dos fármacos na amostra comercial. Sendo assim, injetou-se cada componente do placebo separadamente, após diluição em fase móvel até concentração adequada. Os cromatogramas das Figuras 9, 10 e 11 mostram os resultados obtidos.

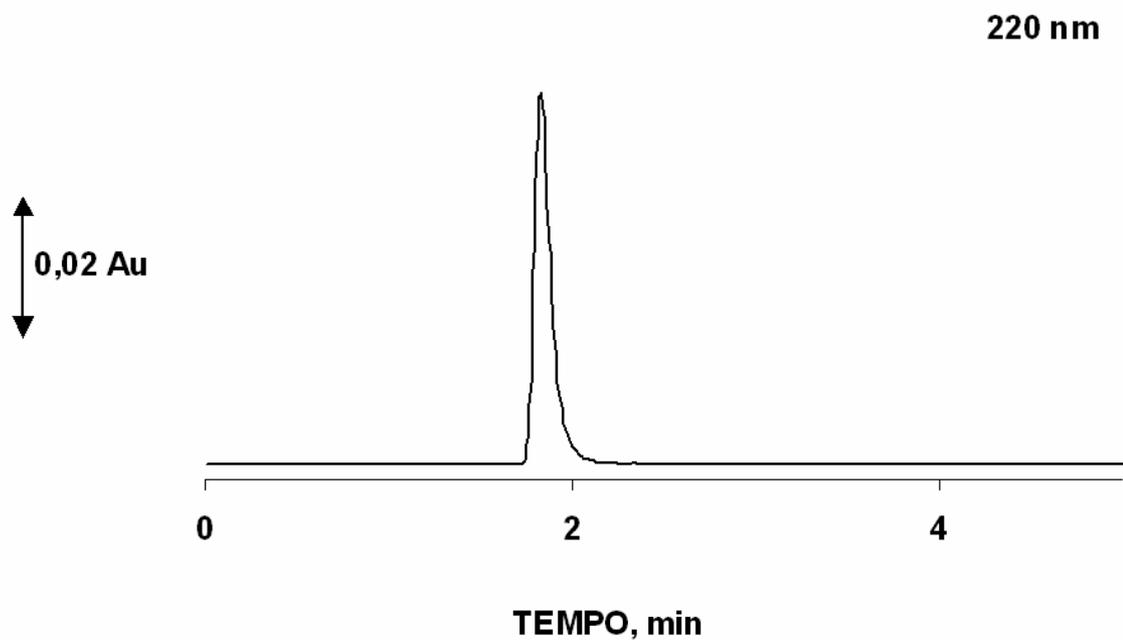


Figura 9. Cromatograma obtido na análise do corante vermelho 40. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

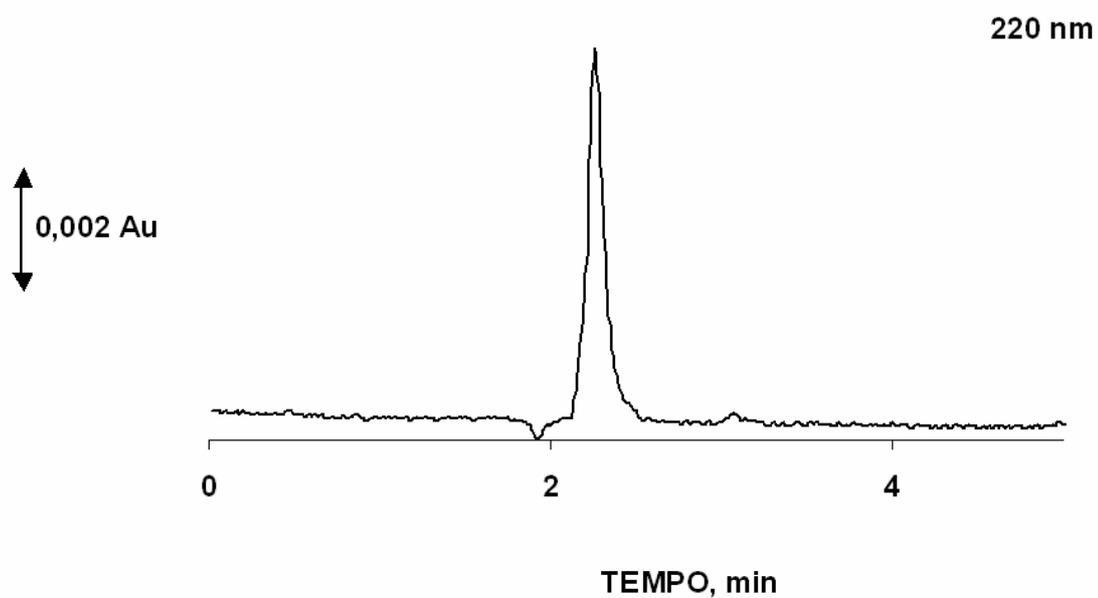


Figura 10. Cromatograma obtido na análise do ácido cítrico. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

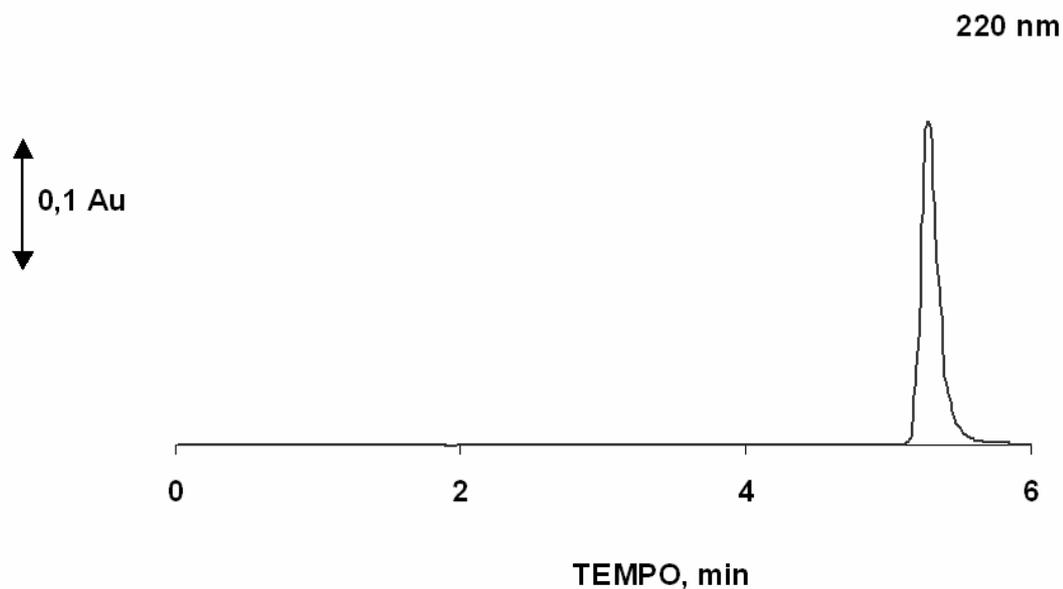


Figura 11. Cromatograma obtido na análise do metilparabeno. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

Observou-se que, de acordo com o tempo de retenção dos mesmos, o primeiro pico interferente correspondia ao corante vermelho 40, o segundo ao ácido cítrico e o terceiro ao metilparabeno. Na tentativa de se retirar o corante presente, realizou-se *clean up* com carvão ativo na amostra diluída antes da injeção (Figura 12). Após o uso do carvão ativo foi possível observar que, apesar da remoção do corante, houve perda também dos princípios ativos.

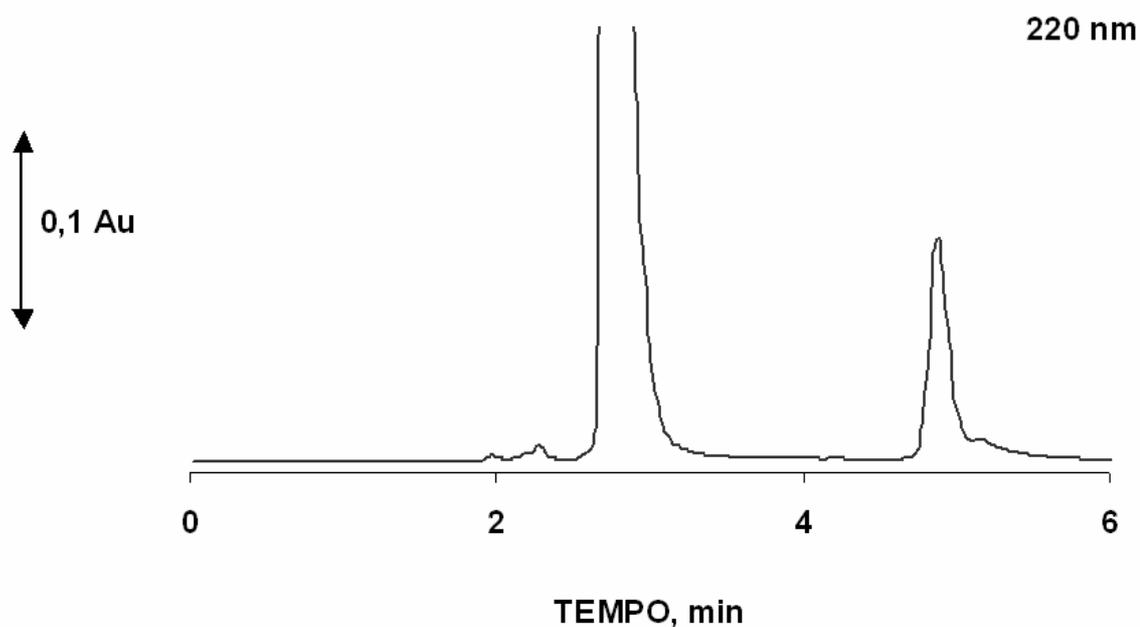


Figura 12. Cromatograma obtido na análise da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral após a adição de carvão ativo. Condições operacionais conforme indicado na Fig.5.

No intuito de obter a otimização para a forma farmacêutica de solução oral, realizou-se uma série de experimentos, envolvendo variáveis como concentração do surfactante, pH, composição e fluxo da fase móvel, tamanho da coluna e temperatura do forno da coluna, os quais não apresentaram resultados satisfatórios. Em função disto, a estratégia utilizada baseou-se em testar uma fase móvel adaptada de uma metodologia utilizada para a determinação de fenilefrina em solução descrita na

Farmacopéia Americana, a qual utiliza mistura de 480 mL de acetonitrila, 3520 mL de heptanossulfonato de sódio 0,005 M em água, e 4 mL de ácido fosfórico (Figura 13).

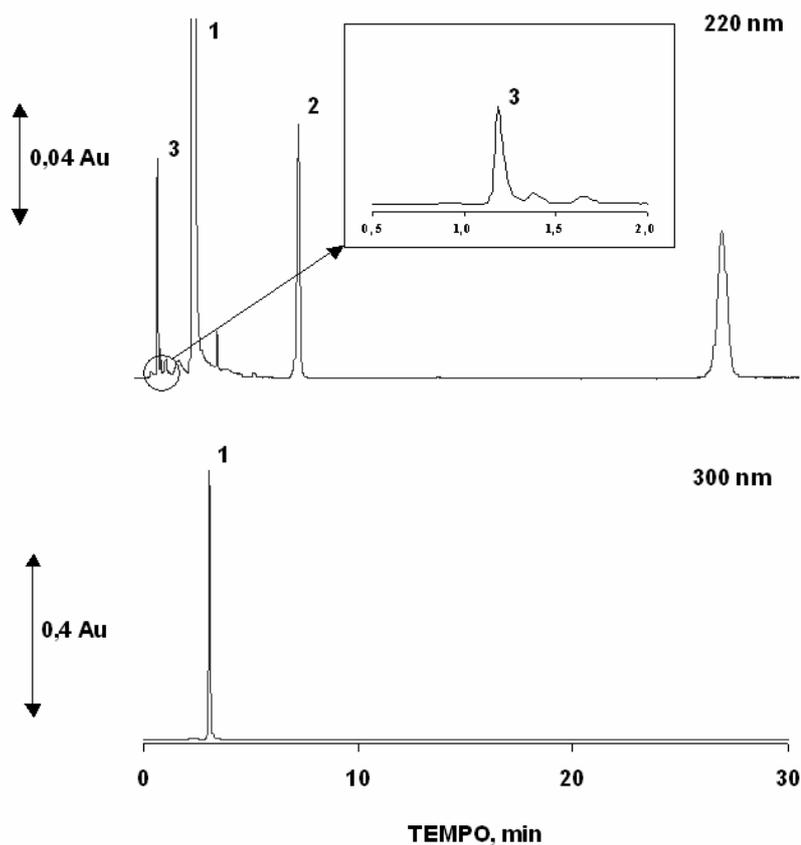


Figura 13. Cromatograma obtido na análise da amostra comercial na forma farmacêutica de solução oral: (1) - Par, 400 mg L⁻¹; (2) - Fen, 10 mg L⁻¹; e (3) - Car, 4,0 mg L⁻¹. 480 mL de acetonitrila, 3520 mL de heptanossulfonato de sódio 0,005 M em água, e 4 mL de ácido fosfórico foram usados como fase móvel. Condições operacionais: volume de injeção de 100 µL, fluxo da fase móvel de 2,0 mL/min, coluna cromatográfica Luna C18 de dimensões 300 x 3,9 mm e tamanho das partículas de 5 µm mantida a 27°C e detector UV em 220 e 300 nm.

5.4 Conclusão

Com a utilização do método contendo a nova fase móvel otimizada, a separação dos picos de interesse foi bem sucedida. Portanto, o método otimizado apresenta relevante potencial para o monitoramento da associação de Par, Fen e Car no controle da qualidade destas formulações farmacêuticas na forma de solução oral.

CAPÍTULO 6

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PARACETAMOL, CLORIDRATO DE FENILEFRINA E MALEATO DE CARBINOXAMINA EM COMPRIMIDOS

6.1 Procedimentos de validação

Após o ajuste da metodologia para a análise dos comprimidos por IRPLC, alguns parâmetros de validação para as associações 1 e 2, como seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez foram determinados.

6.2 Seletividade e linearidade

A seletividade foi verificada através do teste de pureza do pico usando detector de arranjo de diodos, constatando-se que o pico cromatográfico dos analitos não é atribuído a mais do que um componente [20].

Curvas de calibração para os padrões de Par nas concentrações de 320, 360, 400, 440, 480 µg/mL; Fen nas concentrações de 16,0; 18,0; 20,0; 22,0; 24,0 µg/mL; e Car nas concentrações de 3,20; 3,60; 4,00; 4,40 e 4,80 µg/mL foram obtidas.

A linearidade foi avaliada tendo em conta o coeficiente de correlação (r). Coeficiente de correlação igual ou superior a 0,999 é considerado evidência de dados ideais para a linha de regressão realizada através do tratamento dos mínimos quadrados [20].

Outra forma de verificar a linearidade pode ser através da verificação da normalidade do resíduo por meio do teste de *Shapiro-wilk*. Se p -value calculado é maior

que 0,05; a distribuição do resíduo é normal e indica que o teste de linearidade foi considerado satisfatório, como demonstrado na Tabela 2 [21]. Como resultado, o método foi seletivo e a linearidade foi considerada adequada no intervalo de concentração estudado, e o modelo é linear dentro do intervalo avaliado.

Tabela 2. Resultados estatísticos obtidos nos cálculos da linearidade (padrões + excipientes farmacêuticos).

	Coefficiente angular	Intercepto	r	p-value^c
Par^a	10269 ($\pm 74,759$)	202535 (± 29897)	0,999	0,100
Fen^a	79256 ($\pm 736,05$)	24714 (± 15009)	0,999	0,365
Par^b	10647 ($\pm 136,33$)	22813 (± 54791)	0,999	0,294
Car^b	74177 ($\pm 2818,0$)	23050 (± 11480)	0,999	0,937

Associação 1^a, associação 2^b, *Shapiro-wilk* teste^c

6.3 Precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A repetibilidade (n=12) em área para as amostras foi realizada a 100% da concentração do ensaio. No presente caso, concentrações de 400 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$ para Par, Fen e Car, respectivamente, foram usadas. A precisão intermediária (n=12) foi realizada em diferentes dias. Todos os resultados mostraram valores de precisão aceitáveis como mostrado na Tabela 3 [20].

LD e LQ foram calculados por meio da razão entre o desvio-padrão do intercepto das três curvas de calibração obtidas a partir da linearidade pela média dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicado por 3 (equação 1) e 10 (equação 2), respectivamente.

$$(1)LD = \frac{3 \times \sigma}{s}$$

$$(2)LQ = \frac{10 \times \sigma}{s}$$

Onde:

σ = o desvio padrão do intercepto

s = média dos coeficientes angulares das curvas de calibração

LD e LQ obtidos apresentaram valores aceitáveis para a análise das amostras como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Desvio Padrão Relativo (%) da área do pico obtido na repetibilidade e na precisão intermediária e LD e LQ em mg L⁻¹.

	Par ^a	Fen ^a	Par ^b	Car ^b
Repetibilidade	0,562*	0,641*	0,037*	0,237*
	0,071**	0,135**	0,070**	0,308**
Precisão intermediária	2,306*	0,832*	0,494*	1,098*
	1,717**	1,372**	0,522**	0,235**
LD	12,50**	0,3551**	20,95**	0,9905**
LQ	41,69**	1,1836**	69,86**	3,101**

Associação 1^a, associação 2^b
Padrões, padrões + excipientes farmacêuticos**

6.4 Exatidão

A exatidão foi determinada em cinco concentrações diferentes incorporando no ingrediente ativo os seus respectivos excipientes farmacêuticos nas concentrações de 320, 360, 400, 440, 480 µg/mL para Par; 16, 18, 20, 22, 24 µg/mL para Fen; e 3,2; 3,6; 4,0; 4,4; 4,8 µg/mL para Car. Para o teste de exatidão, a porcentagem média de recuperação foi de 100 ± 2% e as porcentagens individuais foram de 100 ± 5% (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de exatidão para Par, Fen e Car.

	Adicionado	Recuperado ^c	Recuperação (%)
Par ^a	317,57	321,29 ± 0,82	101,17
	357,27	367,27 ± 0,17	102,80
	396,97	396,02 ± 0,99	99,76
	436,66	438,62 ± 0,47	100,45
	476,36	469,31 ± 0,07	98,52
			100,54^d
Fen ^a	15,91	16,13 ± 0,45	101,37
	17,90	17,80 ± 0,31	99,45
	19,89	20,04 ± 0,15	100,75
	21,88	22,46 ± 0,31	102,64
	23,87	23,94 ± 1,10	100,28
			100,90^d
Par ^b	318,34	316,68 ± 0,10	99,48
	358,14	360,83 ± 0,11	100,75
	397,93	398,73 ± 0,03	100,20
	437,72	434,61 ± 0,04	99,29
	477,52	470,45 ± 0,06	98,52
			99,65^d
Car ^b	3,23	3,37 ± 0,49	104,37
	3,63	3,63 ± 0,76	99,97
	4,03	3,94 ± 0,20	97,82
	4,44	4,28 ± 0,93	96,29
	4,84	4,66 ± 0,85	96,26
			98,94^d

Associação 1^a, associação 2^b, ^cMédia (n=3); ^dMédia da curva de recuperação

6.5 Robustez

Os parâmetros selecionados para avaliar a robustez foram: fase móvel, fluxo e pH. A Tabela 5 mostra os experimentos realizados para a avaliação da robustez. É importante lembrar que para a associação 1 o fluxo máximo foi fixado em 1,0 mL/min de forma a manter a pressão abaixo de 6000 psi. Todos os parâmetros foram realizados em seis repetições. Para o teste de robustez, a recuperação alcançada permaneceu dentro do intervalo de $100,0 \pm 5,0\%$ de acordo com o indicado na Tabela 6. Foram encontrados valores aceitáveis em relação ao valor validado para as variações de fase móvel, fluxo e pH.

Tabela 5. Parâmetros selecionados para a robustez

Parâmetros	Variações		
	(-)	(0)	(+)
1- Fase Móvel (MeOH:H ₂ O)	55:45	60:40	65:35
2- Fluxo	0,7	1,0	1,3 ^b / 0,4 ^a
3- pH	3,1	4,1	5,1

Associação 1^a, associação 2^b

Tabela 6. Resultados da robustez para Associação 1 e 2 em recuperação (%)

Experimentos	1	2	3	Par^a	Fen^a	Par^b	Car^b
A	-	0	0	100,2	103,1	100,6	102,5
B	+	0	0	101,3	101,6	99,8	102,9
C	0	-	0	100,0	101,0	98,7	95,9
D	0	+	0	99,4	101,2	98,2	99,9
E	0	0	-	101,6	98,4	100,3	100,3
F	0	0	+	100,7	97,0	100,7	102,1
G	0	0	0	101,4	102,8	100,0	98,5

Associação 1^a, associação 2^b

Durante a realização do experimento G (Tabela 6) foram avaliados alguns parâmetros de eficiência, como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros de eficiência avaliados durante a robustez

	Par^a	Fen^a	Par^b	Car^b
<i>k'</i>	0,553*	1,793*	0,554*	0,179*
	0,557**	1,791**	0,552**	0,177**
N	2965*	4550*	3006*	2644*
	2911**	4325**	2992**	2673**
A/B	1,393*	1,257*	1,312*	1,419*
	1,419**	1,274**	1,317**	1,443**
α	3,244*		3,100*	
	3,215**		3,122**	

Associação 1^a, associação 2^b
Padrões , padrões + excipientes farmacêuticos **

Todos os parâmetros de validação do método otimizado obedeceram aos limites de variação permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [22].

CAPÍTULO 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 Considerações finais

O método validado pode ser usado para assegurar a qualidade dessas formulações na indústria farmacêutica, o qual apresenta como vantagens um sistema de fase móvel alternativo, curto tempo de análise e simples passo de preparo de amostra.

Uma continuidade desse projeto poderá ser a análise destes fármacos por eletroforese capilar, para comparar com a metodologia desenvolvida por HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 1997/1998 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997.
- [2] FARMACOPÉIA Brasileira. 3 ed. São Paulo: Andrei, 1977.
- [3] FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- [4] UNITED States Pharmacopeia. 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.
- [5] MARÍN, A; GARCÍA, E; GARCÍA, A; BARBAS, C. Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 701-714, 2002.
- [6] RAVISANKAR, S; VASUDEVAN, M; GANDHIMATHI, M; SURESH, B. Reversed-phase HPLC method for the estimation of acetaminophen, ibuprofen and chlorzoxazone in formulations. **Talanta**, v. 46, p. 1577-1581, 1998.
- [7] MARÍN, A; ESPADA, A; VIDAL, P; BARBAS, C. Major degradation product identified in several pharmaceutical formulations against the common cold. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 471-477, 2005.
- [8] GIL-AGUSTÍ, M; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, MC; ESTEVE-ROMERO, J. Correlation between hydrophobicity and retention data of several antihistamines in reversed-phase liquid chromatography with aqueous-organic and micelar-organic mobile phases. **Analytica Chimica Acta**, v. 421, p. 45-55, 2000.
- [9] QI, M; WANG, P; CHEN, J. LC method for the determination of multiple components in a compound cold formulation. **Chromatographia**, v. 60, p. 105-108, 2004.

-
- [10] ERK, N; KARTAL, M. Simultaneous high performance liquid chromatographic and derivative ratio spectra spectrophotometry determination of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride. **II Farmaco**, v. 53, p. 617-622, 1998.
- [11] LAU, O; MOK, C. High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 45-54, 1995.
- [12] GARCÍA, A; RUPÉREZ, FJ; MARÍN, A; MAZA, ADL; BARBAS, C. Poly(ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 237-243, 2003.
- [13] OLMO, B; GARCÍA, A; MARÍN, A; BARBAS, C. New approaches with two cyano columns to the separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and related compounds. **Journal of Chromatography B**, v. 817, p. 159-165, 2005.
- [14] GUMBHIR, K; MASON, WD. High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and its conjugates in human plasma using solid-phase extraction and electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 623-630, 1996.
- [15] SHERVINGTON, LA; SAKHNINI, N. A quantitative and qualitative high performance liquid chromatographic determination of acetaminophen and five of its *para*-substituted derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 43-49, 2000.
- [16] MARÍN, A; BARBAS, C. CE versus HPLC for the dissolution test in a pharmaceutical formulation containing acetaminophen, phenylephrine and

-
- chlorpheniramine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 769-777, 2004.
- [17] MARCHESINI, AF; WILLINER, MR; MANTOVANI, VE; ROBLES, JC; GOICOECHEA, HC. Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 39-46, 2003.
- [18] OKAMOTO, H; NAKAJIMA, T; ITO, Y; AKETO, T; SHIMADA, K; YAMATO, S. Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 517-528, 2005.
- [19] HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- [20] International Conference Harmonisation (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- [21] MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 6. ed. Wiley, 2005.
- [22] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.