

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE SOLVENTES RESIDUAIS COM O USO DA CROMATOGRAFIA GASOSA APLICADOS A FARMACOS

OLIVEIRA, Leonardo Guimarães de; POLETTI, Erick

leonardoguimaraes03@gmail.com

Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz

Resumo: *Este trabalho vem com o intuito de demonstrar como deve ser conduzido a validação de métodos de solventes residuais com o uso da cromatografia gasosa em fármacos, pois devido ao uso e aplicação de solventes no processo de produção de fármacos derivado do uso de solventes tanto na obtenção das matérias primas quanto no produto acabado. Assim tornou-se necessário com rigor o controle destes solventes. Desta forma, o nível ingestão destes solventes contidos no fármaco deve estar de acordo com a sua especificação que é definida a partir do seu nível toxicológico aos seres humanos, animais e danos ao meio ambiente, o qual encontra-se preconizado suas concentrações máximas permitidas nas normas USP <467> e ICH Q3C(R7). Os guias e normas citadas neste documento devem ser seguidas para o atendimento da RDC 166/2017. Abrangendo também o entendimento de como deve ser a elaboração o protocolo, a execução dos testes, avaliação de resultados e compilação destes resultados para o relatório, com intuito de gerar confiança e rastreabilidade dos resultados.*

Palavras-chave: *Validação. Solventes Residuais. Cromatografia gasosa.*

Abstract: *This work aims to demonstrate the validation of residual solvent methods with the use of gas chromatography in drugs, as the use of solvents and solvents in the process of drug production, derived from the use of solvents. finished products. Thus the control of these solvents is strictly necessary. The level of the amount of liquid solvents should not be considered as being in accordance with their nature, which is a principle of toxicity to humans, animals and environmental damage, which is found under their maximum permissible conditions in USP standards cap <467> and ICH Q3C (R7). The guides and standards cited are the following instructions for service of RDC 166/2017. It also covers the understanding of how the protocol should be prepared, the execution of the tests, the evaluation of the results and the compilation of the results for the report, in order to generate confidence and traceability of the results.*

Keywords: *Validation. Residual Solvents. Gas Chromatography.*

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica é tida como uma das indústrias de maior impacto no cenário mundial, pois além de auxiliar na manutenção da vida é importante para a economia de um país, podendo ser considerada um bem necessário. No desenvolvimento de um novo medicamento, é necessário que o mesmo passe por diferentes etapas como: Definir o público alvo, pesquisa bibliográfica de obtenção do ativo, qual é a sua

disponibilidade (in natura ou sintética), desenvolvimento do processo de formulação em vitro e em escala industrial, testes de estabilidade, estudo clínico em camundongos e por fim estudos em humanos (OLIVEIRA; LABRA; BERMUDEZ, 2006).

No processo de síntese de um medicamento vários solventes orgânicos podem ser utilizados, podendo ter sido adicionado como ativo ou para efeito na qualidade dos cristais da substância, odor e sabor. Para a remoção destes solventes orgânicos utiliza-se o emprego de técnicas químicas e físicas. Mesmo após o processo de remoção dos solventes orgânicos ainda é possível verificar a existência de quantidades remanescentes de impurezas. Desta forma, deixa claro a necessidade de controle destes solventes orgânicos eliminando uma possível causa de toxicidade de um medicamento.

A validação do método de avaliação de solventes residuais deve estar de acordo com a RDC 166/2017. Assim, quando se trabalha com o desenvolvimento local, onde a metodologia é definida pela empresa, esta deve seguir de forma completa todos os parâmetros preconizados na RDC 166/2017 sendo eles os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão, faixa de trabalho, robustez e estabilidade das amostras (BRASIL, 2017).

Assim, durante a fabricação de um medicamento é necessário a avaliação do controle de qualidade atestando a conformidade dos lotes produzidos. Com todos os testes analíticos realizados para atestar a qualidade do o fármaco o mesmo é submetido à aprovação da ANVISA. Com o aumento da cobrança sobre a integridade de dados analíticos e rastreabilidade de seus ensaios para a comprovação de resultados, vem sendo necessário metodologias analíticas capazes de atender com confiabilidade toda esta criticidade exigida. Desta forma, é necessário estar em constante investimento em novas técnicas analíticas que ofereça garantia do resultado.

A validação de um determinado procedimento analítico tem como principal objetivo demonstrar que ele seja adequado para a determinação analítica do composto a ser analisado. Os parâmetros de desempenho avaliados devem ser atendidos a partir dos critérios de aceitação preconizados, tratando-se de um estudo experimental e integralmente documentado que visa garantir a qualidade metrológica, rastreabilidade, compatibilidade e confiabilidade em seus resultados analíticos para as tomadas de decisões (MAPA, 2011).

Um das técnicas que vem sendo frequentemente abordada na determinação de traços é a cromatografia gasosa, que tem como princípio a separação baseada na interação da sua fase móvel a sua fase estacionária. Esta técnica trabalha com amostras voláteis, preferencialmente solventes de baixa temperaturas de ebulição e alta pressão de vapor.

A cromatografia foi inventada pelo botânico russo Mikhail Tswett logo após a virada do século XX. Ele empregou a técnica para separar vários pigmentos de plantas, como as clorofilas e xantofilas, passando soluções dessas espécies através de colunas de vidro recheadas com carbonato de cálcio finamente dividido. As espécies separadas apareceram como bandas coloridas na coluna, o que explica o nome que ele escolheu para o método (do grego chroma, que significa “cor”, e, e graphein, que significa “escrever”). Contudo desde a descoberta até a atualidade o conceito permanece evoluindo dando espaço a diversos tipos de cromatografia sendo ela em coluna ou até mesmo em placas (NATO, P. S., 1993).

Ao adotar a cromatografia gasosa como técnica a ser utilizada para o controle de solventes residuais no medicamento, deve ser realizado o desenvolvimento deste método com o intuito de definir a melhor condição analítica. Na sequência, este método passa por uma validação que contempla o tratamento dos resultados obtidos a partir do método proposto, com isso é possível demonstrar que o método é preciso, linear, exato,

seletivo e robusto.

Desta forma, neste trabalho será abordado em como deve ser realizada validação do método de análise para solventes residuais em fármacos. Com a predição de técnicas, guias, e especificações que podem ser usadas com o intuito de atendimento da legislação segundo a RDC 166/2017 de Validação de métodos analíticos.

2 CROMATOGRAFIA

A cromatografia trata-se de uma técnica analítica de separação físico-química, o qual ocorre a migração diferencial dos componentes de uma mistura, a partir da interação dos componentes entre duas fases imiscíveis, essas fases são chamadas de fase móvel e fase estacionária, na medida com que os analitos vão sendo carregados pela fase móvel através de uma fase estacionária, as diferentes características faz com que cada analito interaja de forma diferente com a fase estacionária de uma coluna. (MAGALHÃES, L. 2019).

Os critérios de especificação adotados em uma validação devem ser bem embasados em guias e normativas o qual melhor representa a avaliação dos seus resultados. Ao falarmos de validações de metodologias analíticas, logo pensamos em quais critérios de aceitação podem ser adotados, O “Guidelines for Standard Method Performance Requirements – Appendix F da AOAC Official Methods of Analysis de 2016”, é uma citação confiável que melhor representa uma validação de impurezas orgânicas, estas especificações são baseadas na razão de massa do analito pela massa da amostra, quanto menor for essa relação mais abrangente é o critério. Vale ressaltar que esses critérios desprezam outros fatores importantes que influenciam no resultado final, como a técnica de análise utilizada, a resposta do analito frente ao detector, se há alguma etapa crítica no processo de preparo da sua amostra, que faz com que haja a necessidade de usar novos critérios de aceitação, quando há uma metodologia específica para validação de métodos. Caso haja a necessidade de utilizar-se de uma especificação divergente, deve se direcionar um questionamento a ANVISA informando o uso de uma especificação específica e o racional utilizado para defini-la e solicitar a aprovação antes do estudo. Em seguida é apresentado na Tabela 1 a especificação em DPR% para precisão (Repetibilidade e reprodutibilidade) e recuperação (LATIMER, George W., (AOCS) 2016)

Tabela 1. Tabela de Especificação da Repetibilidade, Reprodutibilidade e Recuperação

Analito (%)	Relação do Analito	Unidade	RSD, %		
			RSD, % (Repetibilidade)	(Reprodutibilidade)	Recuperação Média
100	1	100%	1,3	2	98-102
10	10 ⁻¹	10%	1,9	NA*	98-102
1	10 ⁻²	1%	2,7	4	97-103
0,01	10 ⁻³	0,010%	3,7	8	95-105
0,001	10 ⁻⁴	100 ppm	5,3	NA*	90-107

		(mg/kg)			
0,0001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	7,3	NA*	80-110
0,00001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	11	16	80-110
0,000001	10^{-7}	100 ppb (mg/kg)	15	NA*	80-110
0,000000 1	10^{-8}	10 ppb (mg/kg)	21	32	60-115
0,000000 01	10^{-9}	1 ppb (mg/kg)	30	45	40-120

Fonte: LATIMER, George W., (AOCS), NA*, 2016

Segundo Shabir, A.G. a documentação de uma validação analítica deve ser iniciada com a elaboração de um protocolo o qual atenda a sua metodologia analítica, apresentando como deve ser realizado a execução de uma validação de método. A estrutura pela qual deverá ser seguida trata-se inicialmente de uma definição de um propósito/motivo, descrição do objetivo do estudo, abrangência do protocolo, parâmetros a serem seguidos, critérios de aceitação de um resultado, materiais e amostras de referência, metodologia analítica, e conclusão.

Em uma visão geral deve se contemplar uma descrição geral do método, um resumo dos estudos de caracterização, identificação do tipo de método e abordagem de validação, aplicação do método e protocolo de validação, o uso pretendido de cada aplicação do método, e as características da performance analítica para cada metodologia adotada.

Para a continuidade na validação de métodos deve ser definido quais parâmetros serão analisados, que só será definido após a escolha do método a ser seguido. Pois quando se trata do uso de métodos compendiais já definidos pelas farmacopeias os parâmetros a serem analisados são: Precisão (repetibilidade), exatidão, seletividade e estabilidade. Porém quando ocorre o não atendimento do método farmacopeico, este procedimento passa a ser um desenvolvimento local. Desta forma, ele deve atender os seguintes parâmetros: Linearidade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão, robustez, seletividade, limite de quantificação e estabilidade. Com a aprovação desses parâmetros conclui se que o método atende a finalidade que se propõe. Abaixo será descrito o objetivo de cada parâmetro.

Seletividade - Seletividade é a capacidade que o método analítico possui em medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas e componentes da matriz.

Linearidade - Linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, sendo obtida por padronização interna ou externa.

Limite de Quantificação – O limite de quantificação é a menor quantidade do

analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

No caso de métodos instrumentais, uma das formas de se obter o Limite de Quantificação é através dos parâmetros linearidade, precisão e exatidão, pois dessa forma pode-se afirmar sua correspondência linear sendo precisa e exata.

Precisão - A precisão da metodologia analítica será verificada por dois critérios:

Repetibilidade: Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade pode ser realizada a partir da avaliação do ponto baixo, médio e alto que contemplam o intervalo linear, e injetando seis vezes o ponto central.

Reprodutibilidade: Será verificada através de uma segunda repetibilidade, porém realizada em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

Exatidão - A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A análise é realizada pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de analitos ao medicamento ou ao fármaco. É verificada através da recuperação do solvente em três réplicas nas concentrações baixa, média e alta, que contemplam o intervalo linear estabelecido pela linearidade.

Faixa de trabalho - A Faixa de trabalho da metodologia analítica será estabelecido pela confirmação de que o método tem a representatividade linear em suas concentrações baixa, média e alta.

Robustez - A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este representa frente a pequenas variações dos parâmetros analíticos, que indica sua confiança durante o uso normal. Este teste é geralmente inserido no contexto de validação com o objetivo de prevenir problemas em ensaios interlaboratoriais e identificar os potenciais fatores. Para tanto, devem ser estabelecidos e definidos os níveis dos fatores a serem testados.

Efeito Matriz – Esse efeito é avaliado para matrizes complexas, o qual o nível de contaminação da amostra interfere diretamente na quantificação do seu analito de interesse, desta forma pode ser avaliado através da comparação de curvas com a matriz e sem a matriz, assim se as duas se mostrarem paralelas demonstra que não há efeito da matriz na quantificação do analito, podendo ser adotado o nível de 5% no teste de hipótese.

Limite de detecção, este é demonstrado com a obtenção da menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente

quantificado, sob as condições do método. Esta determinação pode ser feita de algumas formas como: Visual, Razão Sinal/Ruído, baseado na determinação do branco e pela curva de calibração.

A avaliação visual deve ser feita através da menor concentração do limite de detecção, o qual é possível visualizar o efeito visual esperado.

Utilizando-se de tratamento de métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado através do sinal ruído ser maior que 2:1.

Este parâmetro deve ser realizado quando se tratar de métodos qualitativos.

Desta forma, com o conhecimento de cada parâmetro analítico que possa ser analisado em uma validação para o atendimento da RDC 166/2017, dependendo da abordagem analítica utilizada, podendo ser optado por se adequar a um método farmacopeico ou realizar um desenvolvimento local. As farmacopeias Brasileira, Britânica e Americana estão todas harmonizadas entre si seguindo em conformidade com o ICH.

O Capítulo USP <467> trata-se de um capítulo geral aplicado para medicamentos, excipientes e produtos, com o objetivo de promover um controle da quantidade aceitável de solventes residuais presente em um fármaco, baseando-se na dose diária ingerida por este paciente, visando sempre o menor nível toxicológico aceitável de cada solvente residual. Estes solventes residuais podendo ser proveniente do processo de síntese de um ativo, no processo de produção do fármaco, ou no revestimento do comprimido. Desta forma os principais solventes são classificados por Classes I, II, III demonstrados a seguir:

Classe I, Solventes a serem evitados, sendo fortemente Carcinogêneos em humanos, exerce perigo ambiental.

Classe II, Solventes a serem limitados, carcinogêneos para animais, não genotóxicos ou pode ser o possível causador de toxicidade irreversível como, neurotoxicidade ou teratogenicidade, e solventes suspeitos em outras toxicidades significativas, mas reversível.

Classe III, Solventes com baixa toxicidade em potencial, solventes com baixa toxicidade potencial para humanos, não é necessário um limite de exposição com base na saúde, os classe III tem PDE's com 50 mg a dose diária.

Abaixo segue a Tabela 2 de classificação e especificação para cada solventes orgânicos ser adotado.

Tabela 2. Tabela de classificação e especificação de solventes orgânicos

Classe I		Classe II		Classe III	
Solvente	Concentração (ppm)	Solvente	Concentração (ppm)	Solvente	Concentração (ppm)
Benzeno	2	Acetonitrila	410	Ácido acético	
Tetracloroeto de carbono	4	Clorobenzeno	360	Acetona	5000
1,2-Dicloroetano	5	Clorofórmio	60	Anisol	
1,1-Dicloroetano	8	Cumene	70	1-Butanol	

1,1,1-Tricloroetano	1500	Ciclohexano	3880	2-Butanol
		1,2-Dicloroetano	1870	Acetato de Butilo
		1,2-Dimetoxietano	100	Éter terc-butilmetílico
		N,N-Dimetilacetamida	1090	Dimetilsulfóxido
		N,N-Dimetilformamida	880	Etanol
		1,4-Dioxano	380	Acetato de Etila
		2-Etoxietanol	160	Éter etílico
		Etilenoglicol	620	Formato de etilo
		Formamida	220	Ácido fórmico
		Hexano	290	Heptano
		Metanol	3000	Acetato de isobutil
		2-Metoxietanol	50	Acetato de isopropila
		Metilbutilcetona	50	Acetato de metila
		Metilciclohexano	1180	3-Metil-1-Butanol
		Cloreto de metileno	600	Metil-etil-cetona
		N-Metilpirrolidona	530	Metilisobutilcetona
		Nitrometano	50	2-Metil-1-Propanol
		Piridina	200	Pentano
		Sulfolano	160	1-Pentanol
		Tetrahidrofurano	720	1-Propanol
		Tetralina	100	2-Propanol
		Tolueno	890	Acetato de propilo
		Tricloroetano	80	
		Xileno ^a	2170	

a: Usualmente: 60% m-xileno; 14% p-xileno e 9% o-xileno com 17% Etilbenzeno

Fonte: indicar autor e o ano de publicação.

É indicado que para critérios de avaliação de *System suitability* como: resolução, DPR e fator de cauda seja seguido de acordo com a USP <621>, que aborda os parâmetros de qualidade cromatográfica.

Diante da necessidade de se realizar uma avaliação estatística dos resultados podemos citar como apoio o Guia 10 da Anvisa o qual recomenda modelos e

procedimentos de análise estatística de alguns parâmetros da validação, que está alinhado com o cumprimento da Resolução RDC 166/2017, que dispõe de validação de métodos analíticos. Também é sugerido a leitura orientativo para a Validação de métodos analíticos o DOC-CGCERE-008 auxiliando em testes e ferramentas para a melhor execução da validação. Tendo também como sugestão o Guia de validação de controle de qualidade do (MAPA), este guia estabelece parâmetros de desempenho e requisitos mínimos de aceitação que devem ser atendidos para que um determinado procedimento analítico seja validado com o atendimento da legislação. E por ultimo e não menos importante o Guia Eurachem/Ctitac – Determinando a incerteza de medição analítica, que traz como deve ser determinado a incerteza de um ensaio analítico.

CONSIDERAÇÕES

Tendo em vista o conteúdo deste presente trabalho tem como objetivo de exemplificar a validação de método em solventes residuais mostrando de maneira teórica quais guias e normas devem ser consultadas e a forma com que o resultado pode ser avaliado, e como prosseguir no momento de execução dos testes analíticos, pois os solventes são pertinentes do Insumo farmacêutico ativo (IFA) o qual cada fármaco possui uma rota específica de obtenção em que muitas vezes é dependente do emprego de solventes para o melhor rendimento do seu processo produtivo. Contudo, é eminente a sua importância de se realizar uma validação de metodologias analíticas capazes de garantir o controle de qualidade de um medicamento, de forma a garantir que cada solvente que possa estar contido no fármaco esteja dentro do limite aceitável, garantindo a saúde e qualidade de vida da população ao ingerir um medicamento.

REFERÊNCIAS

AOAC – Official Methods of Analysis. Guidelines for Standard Method Performance Requirements – Appendix F, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo da Resolução – RDC nº 166 de 25 de Julho de 2017 – Validação de Métodos Analíticos.

ELLISON, S. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS A. Guia EURACHM/CITAC - Determinação de incerteza na medição analítica. Ed. 2º, versão Brasileira, 2002.

ICH – Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Impurities: Guideline for Residual Solvents, October 2018.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008-Revisão 1. Orientações sobre Validação de métodos de Ensaio Químicos, 2018.

OLIVEIRA, E. a.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral Public production of medicines in

Brazil : an overview. Caderno de Saúde Pública, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 2379–2389, 2006.

MAGALHÃES, Luana. **Cromatografia** Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/cromatografia/>> Acesso em: 27 de Março de 2019.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), **Guia: Validação e Controle de Qualidade Analítica** (Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários), Brasília, 2011.

NATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

SHABIR, A. G. **Step-by-step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry**. Institute of Validation Technology, 2005.

USP. **The United States Pharmacopeia**, 42. United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2019