

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA  
DE MINAS GERAIS (PPGMQ-MG)

CAROLINE SERIANI MODENEZE

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
ANALÍTICA VERDE PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO  
ACETILSALÍCILICO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Itajubá - MG  
29 de Agosto de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA  
DE MINAS GERAIS (PPGMQ-MG)

Caroline Seriani Modeneze

# **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA VERDE PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ACETILSALÍCILICO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de Concentração:** Química Analítica

**Orientador:** Prof. Dr. Sandro José de Andrade

Itajubá - MG

29 de Agosto de 2022

## **Agradecimentos**

À Deus, por ter me dado saúde, disposição, força e persistência para superar as dificuldades e por me capacitar nos momentos em que eu pensei que não fosse conseguir continuar, por me fortalecer para conciliar trabalho e estudo e não desistir.

À UNIFEI, seu corpo docente, direção e administração que abriram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior e cheio de desafios e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química de Minas Gerais, pela oportunidade de fazer um mestrado e por todo suporte durante essa jornada.

Ao meu orientador Sandro José de Andrade, pelo suporte, sugestões, reuniões e correções.

Ao grupo de pesquisa LSIAA, por todas as prévias, pelas contribuições e reuniões semanais enriquecedoras.

Ao meu coordenador Alexandre Rosolia, por todo apoio, pelo conhecimento transmitido e por me proporcionar trabalhar num ambiente harmonioso e motivador.

Ao meu namorado e meu melhor amigo, Alexandre, pelo apoio sem limites, por acreditar em mim, me motivar e estar ao meu lado para tudo.

Aos meus amados pais, Rose e Paulo, agradeço por todo incentivo, amor incondicional, por sempre confiarem em mim, obrigada por terem me ensinado valores sólidos e me incentivado a correr em busca dos meus sonhos com humildade e dignidade. Vocês são o motivo de todo meu esforço!

## RESUMO

Temas de sustentabilidade e produtividade estão cada vez mais em alta, devido ao aumento constante das demandas e às diretrizes globais guiando para um mundo cada vez mais sustentável, sempre considerando o ganho de tempo. No âmbito farmacêutico, esses temas também se fazem presentes, exigindo-se metodologias cada vez mais rápidas e menos tóxicas e nocivas ao meio ambiente. Um dos medicamentos com maior produção e consumo mundiais é a Aspirina®, um dos fármacos mais tradicionais do mercado farmacêutico. Com seu alto volume de produção e consumo, conseqüentemente grandes volumes de análises, alto gasto de solvente e tempo requerido, faz-se necessário e importante o desenvolvimento de metodologias mais ágeis e com menor utilização de solventes. Além do viés de redução de uso de orgânicos, é de conhecimento geral a crise de acetonitrila que vem acontecendo há alguns anos, tendo sido intensificada no último ano e continuado no ano atual. Com isso, também é importante que se trabalhe com metodologias que reduzam ou eliminem o uso de acetonitrila como solvente, extinguindo o risco de comprometimento das análises por falta deste solvente. Dessa forma, a metodologia analítica foi desenvolvida com uma coluna de bloco monolítico Chromolith High Resolution RP-18 100mm x 4,6mm, com 2 mL.min<sup>-1</sup> de fluxo em uma composição de 38% de etanol e 62% água acidificada com ácido fosfórico, temperatura de 30°C, 10 µL de volume de injeção em um tempo de corrida de 3,5 minutos. Para a validação, foram realizados os ensaios de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação. A seletividade apresentou resultados dentro dos padrões aceitáveis, utilizando como placebo o Parateck® SI 200, já que não houve nenhum interferente no mesmo tempo de retenção do ácido acetilsalicílico. A curva de calibração se apresentou linear, com coeficiente de correlação maior que 0,99. Ensaios de precisão foram avaliados pela repetibilidade e reprodutibilidade, que apresentaram coeficientes de variação de 0,36% e 0,55%, respectivamente. A exatidão também apresentou resultados dentro dos critérios de aceitação estipulados pela RDC n°166/2017, onde foram avaliadas a recuperação em 80, 100 e 120% (400, 500 e 600 mg/comprimido). Limites de detecção e quantificação também foram avaliados, apresentando valores de 0,04 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,52 mg.mL<sup>-1</sup>. Portanto, o método desenvolvido pode ser aplicado com sucesso para análises de teor em comprimidos de Aspirina®. Além disso, a metodologia desenvolvida foi medida quanto ao caráter verde, sendo avaliada por quatro métricas: estrela-verde, NEMI, AGREE, eco escala analítica e análise de custo e tempo. Pela estrela-verde, a metodologia desenvolvida atende à 5 princípios da Química Verde frente à 2 princípios atendidos pela metodologia farmacopeica. Pela NEMI, 3 quadrantes preenchidos frente a 2 quadrantes do método original e uma pontuação de 93 na eco escala analítica frente à 80 pontos da farmacopeia. Pela AGREE, a metodologia verde apresentou um score de 0,67 versus 0,35 do método original, comprovando também o maior caráter verde da metodologia desenvolvida. Além disso, apresentou uma redução de 72,5% (de R\$51,78 para R\$14,24 considerando 15 corridas) de custo e 65% de tempo (de 10 minutos para 3,5 minutos) em relação à metodologia farmacopeica.

Palavras-chave: Aceleração de Métodos; Química Verde; Produtividade; Estrela-Verde; NEMI; AGREE; Eco Escala Analítica; Ácido Acetilsalicílico; Cromatografia.

## ABSTRACT

Themes of sustainability and productivity are increasingly on the rise, due to the constant increase in demands and global guidelines leading to an increasingly sustainable world, always considering the gain of time. In the pharmaceutical field, these themes are also present, requiring methodologies increasingly faster, less toxic and less harmful to the environment. Given this scenario, one of the drugs with the highest production and consumption worldwide is Aspirin®, one of the oldest drugs in the pharmaceutical market. With its high-volume production and high consumption, consequently large volumes of analyses, high solvent expenditure and time required for such analyses, it is necessary and important to develop more agile methodologies and with less use of solvents. In addition to the reduction in the use of organics, the acetonitrile crisis that has been going on for some years is well known, having intensified in the last year and continued in the current year. Therefore, it is also important to work with methodologies that reduce or eliminate the use of acetonitrile as a solvent, eliminating the risk of compromising the analyzes due to the lack of this solvent. Thus, the analytical methodology was developed with a Chromolith High Resolution RP-18 100mm x 4.6mm monolithic block column, with 2 mL.min<sup>-1</sup> of flow in a composition of 38% ethanol and 62% acidified water phosphoric acid, temperature 30°C, 10 µL injection volume in a run time of 3.5 minutes. For validation, selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limits and quantification tests were performed. The selectivity presented results within acceptable standards, using Parateck® SI 200 as placebo, since there was no interference in the same retention time of acetylsalicylic acid. The calibration curve was linear, with a correlation coefficient greater than 0.99. Precision tests were evaluated by repeatability and reproducibility, which showed coefficients of variation of 0.36% and 0.55%, respectively. The accuracy also presented results within the acceptance criteria stipulated by RDC No. 166/2017, where recovery was evaluated at 80, 100 and 120% (400, 500 and 600 mg/tablet). Limits of detection and quantification were also evaluated, presenting values of 0.04 mg.mL<sup>-1</sup> and 0.52 mg.mL<sup>-1</sup>. Therefore, the developed method can be successfully applied to Aspirin® tablet content analysis. In addition, the methodology developed was measured for green character, being evaluated by four metrics: green star, NEMI, AGREE, analytical echo scale and cost and time analysis. By the green star, the methodology developed meets the 5 principles of Green Chemistry against the 2 principles met by the pharmacopeial methodology. By NEMI, 3 filled quadrants compared to 2 quadrants of the original method and a score of 93 on the analytical echo scale compared to 80 points of the pharmacopeia. According to AGREE, the green methodology presented a score of 0.67 versus 0.35 of the original method, also proving the greater green character of the developed methodology. In addition, it presented a 72.5% reduction (from R\$51.78 to R\$14.24 considering 15 runs) in cost and 65% in time (from 10 minutes to 3.5 minutes) in relation to the pharmacopeial methodology.

Keywords: Method Acceleration; Green Chemistry; Productivity; Green Star; NEMI; GREE; Eco Analytical Scale; Acetylsalicylic acid; Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Felix Hoffmann: o Descobridor da Aspirina® .....	12
Figura 2 – Reação de Acetilação para Síntese do Ácido Acetilsalicílico - (1) Ácido Salicílico (2) Anidrido Acético (3) Ácido Acetilsalicílico e (4) Ácido Acético .....	13
Figura 3 – Estrutura da COX (ciclooxigenase) inativada pelo Ácido Acetilsalicílico .....	14
Figura 4 - Cascata Simplificada do Ácido Araquidônico e Ação dos AINEs .....	15
Figura 5 - Substituição eletrofílica para síntese do Ácido Acetilsalicílico .....	17
Figura 6 - Síntese de Kolbe para obtenção do precursor da Aspirina® .....	17
Figura 7 - Formação do fenolato de sódio para obtenção do AAS .....	18
Figura 8 - Oxidação do cumeno para obtenção do fenol .....	19
Figura 9 – Formação do peróxido em contato com oxigênio do ar .....	19
Figura 10 – Eliminação da água seguida da formação de carbocátion mais estável .....	20
Figura 11 – Transferência de próton com subsequente formação do fenol .....	20
Figura 12 – Formação da Acetona. ....	20
Figura 13 – Representação para o cálculo de assimetria .....	22
Figura 14 – Estrutura Interna das Colunas de Núcleo Rígido. ....	26
Figura 15 - Estrutura Interna das Colunas de Bloco Monolítico .....	27
Figura 16 - Métrica holística Estrela-Verde A à D, em ordem crescente do atendimento aos princípios da Química Verde .....	40
Figura 17 - Avaliação do Caráter Verde entre métodos 525.5 e 505 segundo os critérios da rotulagem NEMI	41
Figura 18 – Pontuações atribuídas para avaliação na eco escala .....	43
Figura 19 – Ranking dos solventes .....	45
Figura 20 – Cromatograma referente à metodologia original IF010-00 do AAS .....	57
Figura 21 – Cromatograma referente à análise do AAS com a substituição de ACN por EtOH. ....	58
Figura 22 – Normógrafo que relaciona % de ACN x % de solvente alternativo (MeOH, EtOH, THF, DSMO e i- propanol).....	59
Figura 23 - Gráfico de Viscosidade da Acetonitrila, MeOH e EtOH.....	60
Figura 24 – Sobreposição dos Cromatogramas Metodologia Original (Verde) e com EtOH (vermelho). ....	61
Figura 25 – Gráfico do acompanhamento de pressão durante a análise com coluna de núcleo rígido .....	62
Figura 26 – Cromatograma do AAS utilizando coluna de núcleo rígido.....	63
Figura 27 – Cromatograma do AAS utilizando coluna de núcleo rígido à 45°C.....	63
Figura 28 – Cromatograma do AAS utilizando colunas de bloco monolítico. ....	64
Figura 29 – Ensaio de Fluxo 1 mL.min <sup>-1</sup> .....	65
Figura 30 - Ensaio de Fluxo 1,5 mL.min <sup>-1</sup> .....	66
Figura 31 - Ensaio de Fluxo 2 mL.min <sup>-1</sup> .....	66
Figura 32 - Ensaio de Fluxo 2,5 mL.min <sup>-1</sup> .....	66
Figura 33 – Curva de Van Deemter bloco monolítico versus colunas particuladas. ....	67

Figura 34 – Ensaio de Temperatura 25°C.....	68
Figura 35 - Ensaio de Temperatura 30°C .....	68
Figura 36 - Ensaio de Temperatura 35°C.....	68
Figura 37 - Ensaio de Temperatura 40°C.....	69
Figura 38 – Cromatograma da Fase Móvel EtOH:H <sub>2</sub> O/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 38:62:2 .....	71
Figura 39 – Cromatograma Branco Etanol .....	71
Figura 40 – Cromatograma Parateck® SI 200.....	71
Figura 41 – Sobreposição dos Cromatogramas do Parateck® SI 200 e Padrão .....	72
Figura 42 – Cromatograma Teste de Estresse – Alta Temperatura .....	72
Figura 43 - Cromatograma Teste de Estresse – Meio Ácido .....	72
Figura 44 - Cromatograma Teste de Estresse – Meio Básico.....	73
Figura 45 - Cromatograma Teste de Estresse – Luz UV .....	73
Figura 46 - Ajuste do cursor sobre o pico do AAS. ....	74
Figura 47 - Ajuste do cursor no eixo y - 237 nm.....	74
Figura 48 - Análise Espectral AAS .....	75
Figura 49 – Curva de Calibração AAS.....	76
Figura 50 – Gráfico de Resíduos da Linearidade AAS.....	77
Figura 51 – Teste de Fisher e de intercepto.....	78
Figura 52 – Avaliação da Repetibilidade Neolicy® .....	79
Figura 53 – Avaliação da Reprodutibilidade Neolicy®.....	81
Figura 54 – Avaliação da Exatidão Neolicy® .....	83
Figura 55 - Estrela-Verde para a Metodologia Farmacopeica do AAS. ....	86
Figura 56 - Estrela-Verde para a Metodologia Desenvolvida neste trabalho.. ..	88
Figura 57 - NEMI para Metodologia Farmacopeica.....	90
Figura 58 - NEMI para a Metodologia Desenvolvida.....	90
Figura 59 - Pictogramas contendo os scores apresentados na métrica AGREE para (a) o método farmacopeico e (b) método com etanol desenvolvido no presente trabalho. ....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de <i>system suitability</i> - Metas Padrão .....	21
Tabela 2 - Parâmetros a serem considerados na validação analítica RDC nº 166/2017.....	29
Tabela 3 – Valores críticos de F em um Nível de Probabilidade de 5% (Nível de Confiança 95%). .....	33
Tabela 4 – Valores de t tabelado para vários níveis de probabilidade. ....	34
Tabela 5 – Padrões Analíticos Utilizados. ....	47
Tabela 6 – Amostra e Placebo Utilizados.....	47
Tabela 7 – Solventes Utilizados. ....	48
Tabela 8 – Parâmetros da Metodologia Original do AAS®. ....	50
Tabela 9 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 21.....	58
Tabela 10 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 22.....	60
Tabela 11 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 27.....	63
Tabela 12 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 28.....	64
Tabela 13 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 29.....	65
Tabela 14 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 32.....	67
Tabela 15 - Dados de <i>system suitability</i> referente à Figura 36.....	69
Tabela 16 – Parâmetros Metodologia Desenvolvida. ....	69
Tabela 17 - Propriedades Parteck® SI 200 .....	70
Tabela 18 – Dados da Curva de Linearidade AAS.....	75
Tabela 19 – Dados Repetibilidade. ....	78
Tabela 20 – Dados Reprodutibilidade. ....	80
Tabela 21 - Valores de LOD e LOQ.....	81
Tabela 22 – Dados de Exatidão. ....	82
Tabela 23 - Avaliação e atribuição de pontos à metodologia farmacopeica. ....	91
Tabela 24 - Avaliação e atribuição de pontos à metodologia desenvolvida. ....	92
Tabela 25 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do score referente ao método cromatográfico desenvolvido e o método farmacopeico. ....	93
Tabela 26 - Análise de Custo e Tempo Metodologia Farmacopeica vs. Desenvolvida.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS	Ácido Acetilsalicílico
ACN	Acetonitrila
AGREE	<i>Analytical GREEnEss Metric</i>
AINE	Anti-inflamatório Não Esteroide
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CDS	<i>Chromatography Data System</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração Média Determinada
COX	Ciclooxigenase
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EtOH	Etanol
EV	Estrela-Verde
FP	<i>Fewer Peaks</i>
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprint Response</i>
GHS	Rotulagem de Produtos Químicos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Inclinação da Curva
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LCA	Avaliação do Ciclo de Vida
LIMS	<i>Laboratory Information Management System</i>
MeOH	Metanol
MIT	Instituto de Tecnologia de Massachusetts

MP	<i>More Peaks</i>
NEMI	Índice Nacional de Métodos Ambientais
PBT	Persistente, Biocumulativo e Tóxico
PGE2	Prostaglandina
QAV	Química Analítica Verde
RCRA	<i>Resource Conservation and Recovery Act</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em Fase Sólida
SQR	Substância Química de Referência
THF	Tetraidrofurano
TRI	<i>Toxic Release Inventory</i>
µL	microlitro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	FARMACOLOGIA.....	10
1.2	ÁCIDO ACETILSALÍCILICO .....	11
1.2.1	Histórico .....	11
1.2.2	Mecanismo de Ação.....	14
1.2.3	Síntese .....	16
1.2.4	Metodologia Farmacopeica.....	20
1.3	PRODUTIVIDADE .....	23
1.4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA .....	27
1.4.1	Seletividade.....	29
1.4.2	Linearidade.....	30
1.4.3	Precisão .....	31
1.4.4	Exatidão .....	34
1.4.5	Limite de Detecção.....	35
1.4.6	Limite de Quantificação.....	36
1.5	QUÍMICA VERDE .....	37
1.5.1	Avaliação do Caráter Verde – Métricas Holísticas .....	39
1.5.2	Cromatografia Verde .....	44
2.	OBJETIVOS.....	46
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	46
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
3.	METODOLOGIA .....	47
3.1	MATERIAIS .....	47
3.1.1	Padrões Analíticos de Referência e Amostra de Aspirina® .....	47
3.1.2	Reagentes e Solventes .....	48
3.1.3	Equipamentos e Consumíveis.....	48
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	50
3.2.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ÁCIDO ACETILSALÍCILICO .....	50
3.2.2	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA OTIMIZADA .....	52

3.2.3	AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE .....	55
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ÁCIDO ACETILSALÍCILICO.....	57
4.1.1	Metodologia Original .....	57
4.1.2	Transferência para Metodologia com Etanol – Coluna Original .....	58
4.1.3	Aceleração da Metodologia – Coluna de Núcleo Rígido .....	61
4.1.4	Aceleração da Metodologia – Coluna de Bloco Monolítico .....	64
4.2	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA OTIMIZADA.....	70
4.2.1	Seletividade.....	70
4.2.2	Linearidade.....	75
4.2.3	Precisão Repetibilidade.....	78
4.2.4	Precisão Reprodutibilidade.....	79
4.2.5	Limites de Detecção e Quantificação .....	81
4.2.6	Exatidão .....	82
4.3	AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE.....	84
4.3.1	Avaliação Métrica Estrela-Verde .....	84
4.3.2	Avaliação Métrica NEMI .....	89
4.3.3	Avaliação Métrica Eco Escala Analítica .....	91
4.3.4	Avaliação Métrica GCFR – AGREE .....	93
4.3.5	Avaliação Geral – Custo e Tempo.....	95
5.	CONCLUSÕES.....	98
6.	REFERÊNCIAS .....	100

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FARMACOLOGIA

Uma das áreas da saúde que está em constante avanço e desenvolvimento é, sem dúvidas, a farmacologia. União das palavras gregas *farmakon* e *logos*, que significam drogas e estudo, respectivamente, a farmacologia é a ciência que estuda os efeitos de uma substância química sobre a função dos sistemas biológicos, que dependem, sobretudo, da interação droga/organismo (LEONARDI; MATOS, 2020).

Com um histórico tão antigo quanto a história da humanidade, no passado, a cura das doenças advinha de tratamentos com produtos naturais, extraídos de plantas, flores e sementes. As atividades relacionadas à farmácia tiveram sua origem a partir do século X com as boticas ou apotecas, como eram conhecidas na época, onde medicina e farmácia eram uma única profissão. A Espanha e a França foram pioneiras na criação das boticas, onde mais tarde originaria o modelo das farmácias atuais. Naquele tempo, o profissional que era responsável por conhecer e curar as doenças era chamado boticário. Porém, para exercer a profissão deveria cumprir uma série de requisitos e ter um local e equipamentos adequados para preparo e armazenagem dos medicamentos (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO CEARÁ, 2020).

Foi apenas com a propagação acelerada da lepra que, Luís XIV, rei da França na época, ampliou o número de farmácias hospitalares, além de outras inúmeras iniciativas na área da saúde pública. Já no século XVIII, a farmácia se separou da medicina e ficou proibido aos médicos serem proprietários de boticas. Com isso, deu-se início à separação de responsabilidades, ou seja, daqueles que diagnosticavam as doenças e dos que misturavam matérias para produzirem poções de cura (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2019).

A primeira escola de farmácia de que se tem conhecimento, foi fundada pelos árabes, quando foi criada uma legislação para o exercício da profissão. Luís XV, em 1777, determinou que fosse substituído o nome de apotecário por farmacêutico. Naquela época, para obtenção do diploma de farmacêutico eram exigidos estudos teóricos e prestação de exames práticos, embora ainda não fosse considerado de

nível universitário. Com o passar dos anos, o estudo universitário para formação em Farmácia foi estendido por toda a Europa (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO CEARÁ, 2020).

O estudo dos remédios ganhou um impulso notável a partir do século XVI, com a pesquisa dos princípios ativos provenientes de plantas e dos minerais capazes de curar doenças. Com o tempo, a indústria farmacêutica foi ganhando espaço e, com ela, novos medicamentos são criados e estudos realizados em grande velocidade (SINDUSFARMA, 2021).

## 1.2 **ÁCIDO ACETILSALÍCILICO**

### 1.2.1 **Histórico**

A história do ácido acetilsalicílico teve seu início há mais de 3 mil e 500 anos. O ácido origina-se da salicilina, substância presente em diversas espécies de plantas utilizadas como medicamentos. A salicilina ocorre em muitos arbustos (jasmin, granza, solda branca); árvores (salgueiro, faia, bétula, oliveira, álamo); legumes (ervilhas, feijões, trevos) e em gramíneas (trigo, centeio, cana de açúcar). Com anotações que datam de cerca 1500 anos a.C., conhecidos como papiros de Ebers, recomendavam o uso da infusão de folhas secas de murta para o alívio de dores reumáticas. Anos depois, o pai da Medicina, Hipócrates, recomendava tomar suco da casca do salgueiro para aliviar as dores do parto e diminuir a febre, além de recomendar o uso tópico de suas folhas como antisséptico nos cuidados pós-parto e a casca do álamo para várias doenças dos olhos (BAYER, 2020).

Teofrasto, botânico pioneiro que sucedeu a Aristóteles como diretor do Liceu de Atenas, proclamava a excelência analgésica da casca da granza e sua ação diurética suave. Porém, apenas centenas de anos mais tarde é que se deu o nome de salicilato a este componente presente nas plantas. Este nome deriva-se de *salix*, denominação latina ao grupo de plantas que pertence o salgueiro. No ano 75 d.C, Dioscórides, cirurgião grego a serviço do exército romano, fez experimentos com uma pasta composta de cinzas de salgueiro para remover qualquer calosidade e combater as dores da gota. Plínio, o Velho, enciclopedista romano, colocou o suco do salgueiro na lista dos diuréticos e propôs uma infusão de casca de álamo para tratar a dor ciática. Índios norte-americanos usavam o suco da casca do salgueiro para combater

a febre e os hotentotes, da África do Sul, ferviam folhas do salgueiro em água e as usavam para diminuir as dores do reumatismo. O salgueiro e outras plantas saliciladas eram muito usadas também pelos habitantes primitivos do Mediterrâneo. Por muitos anos, o salgueiro ficou esquecido pela medicina científica, mas continuou sendo usado na medicina popular (CÂMARA FILHO, 2020).

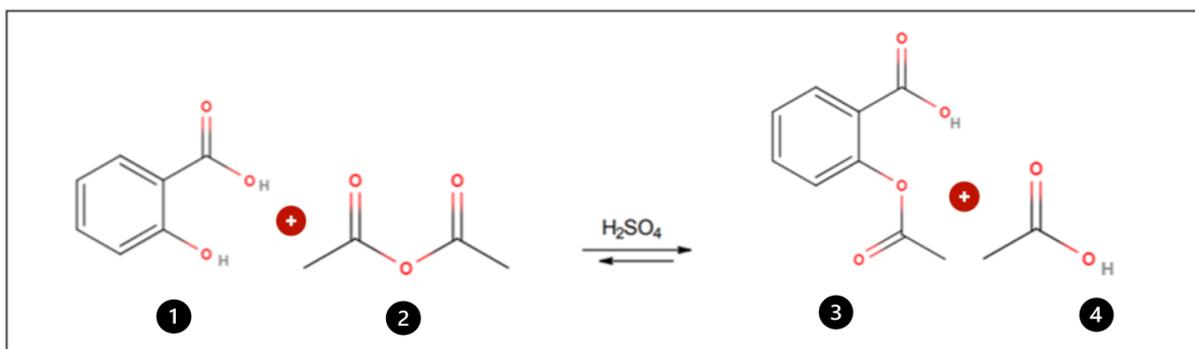
Edward Stone, sacerdote e naturalista inglês do século XVIII, iniciou os testes com salgueiro em laboratório de química científica, onde comprovou seus efeitos farmacológicos em um ensaio com 50 pacientes, publicado pela *Royal Society of London*, para alívio dos sintomas da malária. Trata-se do primeiro ensaio clínico da história da Medicina. Durante o século XIX, muitos personagens trabalharam em pesquisas utilizando salgueiro como personagem principal. Em 1826, o princípio ativo da casca do salgueiro foi identificado pelos químicos italianos Fontana e Brignatelli e em 1829, Henri Leroux, farmacêutico francês, conseguiu isolá-lo e o chamou de salicilina ou salicina. Em 1838, o químico italiano Raffaele Piria conseguiu separar a salicina em dois compostos, um deles, após uma posterior etapa de hidrólise oxidativa, chegou ao ácido livre, chamado ácido salicílico e quase ao mesmo tempo, na Suíça, o farmacêutico Pagenstecher descobriu que poderia obter o ácido salicílico nas plantas barba de bode e buque de noiva. Mesmo após isolado, o composto utilizado no alívio de diversos sintomas, causava muitas irritações no estômago devido ao seu caráter ácido e pela necessidade de altas doses para atingir o efeito, além do sabor desagradável. Por isso, o ácido salicílico teve seu uso limitado (KIEFER, 1997).

A síntese química do ácido salicílico em laboratório foi inicialmente realizada por Kolbe, onde passou a ser produzido em maiores quantidades e mais bem aceito pela comunidade médica. Porém, ainda causava os sintomas de irritação gástrica na população. Esse fato incentivou Felix Hoffmann a estudar mecanismos que diminuíssem esses efeitos negativos (Figura 1) (MENEGATTI *et al.*, 2001).



**Figura 1 - Felix Hoffmann: o Descobridor da Aspirina®.**  
Fonte: Science History Institute, 2003.

Foi em 1897, na cidade de Düsseldorf na Alemanha, que o químico Felix Hoffmann, contribuiu de forma significativa para que se chegasse ao produto final Aspirina®. Trabalhando para *Friedrich Bayer & Co*, buscava meios de atenuar o constante desconforto gerado em seu pai pelo uso de ácido salicílico para alívio das dores decorrentes de uma artrite reumatoide. Foi então que o químico manipulou o analgésico e o patenteou, se tornando o descobridor oficial do ácido acetilsalicílico, menos tóxico e com uma ação analgésica mais potente. Esses diversos estudos serviram para demonstração e comprovação das propriedades analgésicas e anti-inflamatórias do ácido acetilsalicílico, sintetizado a partir do ácido salicílico (1) com anidrido acético (2), em presença de ácido sulfúrico como catalisador, seguido da eliminação do ácido acético (3), em uma reação denominada acetilação (Figura 2). Em 1899, o medicamento passou a ser comercializado pela Bayer na forma de pó e foi o primeiro fármaco sintético da história a ser comercializado (BAYER, 2020).



**Figura 2 – Reação de Acetilação para Síntese do Ácido Acetilsalicílico - (1) Ácido Salicílico (2) Anidrido Acético (3) Ácido Acetilsalicílico e (4) Ácido Acético**  
 Fonte: Próprio Autor – Software MolView, 2020.

A Aspirina® passou a ser o primeiro medicamento comercializado na forma de comprimido no ano de 1900 e chegou ao Brasil no ano seguinte, em 1901. A Aspirina® foi registrada internacionalmente pela Bayer em 1906 – na época, foi nomeada como *The Wonder Drug* (a droga maravilha). Depois da I Guerra Mundial, a Companhia Bayer teve seu direito sobre a patente cassado e foi proibida de utilizar a marca Aspirina®. Só voltou a deter os direitos da marca nos Estados Unidos em 1994, depois de comprar a empresa que tinha ficado com eles (CÂMARA FILHO, 2020).

Apesar de ser uma droga tão antiga, devido ao seu valor de venda, é a droga de uso mais disseminado sobre a face da Terra: são produzidas anualmente 40 toneladas e foram publicados mais de 26 mil trabalhos científicos sobre ela. Em 1966,

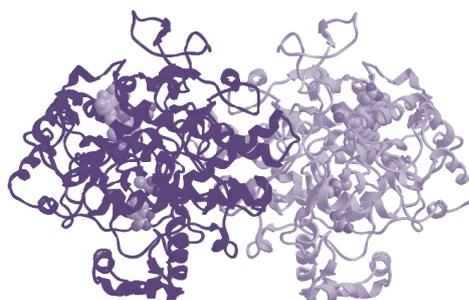
o Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT), nos Estados Unidos, fez uma pesquisa onde perguntou qual seria a invenção que as pessoas não estavam dispostas a abdicar – a Aspirina® teve duas vezes mais citações do que o computador pessoal. Em 1969, as aspirinas da Bayer foram incluídas no *kit* de automedicação que os astronautas da missão Apollo 11 levaram para a Lua (CÂMARA FILHO, 2020).

Em 1971, John Vane, professor de Farmacologia na Universidade de Londres, publicou, na *Nature New Biology*, os mecanismos de ação da Aspirina®. O pesquisador descobriu que o fármaco inibe a síntese de prostaglandinas, moléculas envolvidas nos processos inflamatórios e na formação de coágulos. Essa descoberta ampliou o uso do medicamento que, além das já conhecidas funções como antitérmico, anti-inflamatório e analgésico, passou a ser usado também como anticoagulante plaquetário no tratamento e prevenção do infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e outros distúrbios da coagulação (VANE, 1971).

Segundo as pesquisas da Bayer, o Brasil consome cerca de 1 bilhão de comprimidos de Aspirina® ao ano, em média 7 comprimidos por pessoa, um número ainda baixo quando comparado à Europa (20 comprimidos, aos Estados Unidos (30 comprimidos) ou à Argentina, campeã em consumo, 40 comprimidos por pessoa ao ano. Ainda segundo a Bayer, são produzidas 40.000 toneladas anuais de Aspirina®, o que representa entre 50.000 e 120.000 milhões de comprimidos (BAYER, 2021).

### 1.2.2 Mecanismo de Ação

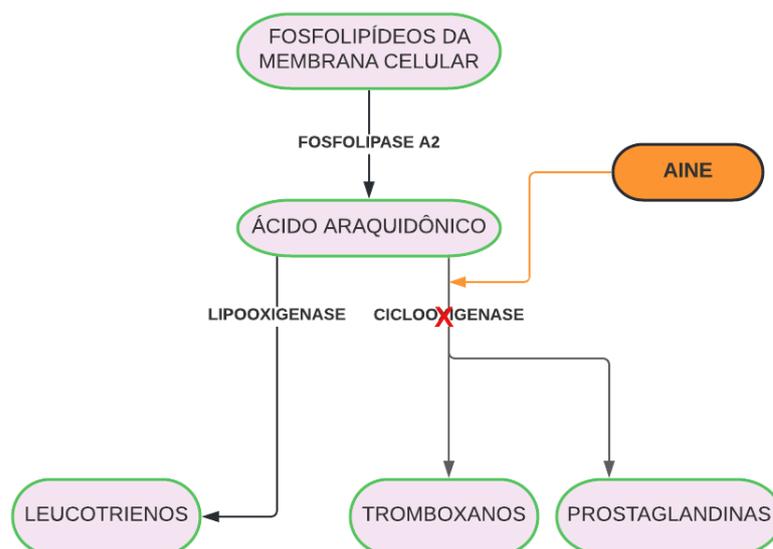
O ácido acetilsalicílico é um anti-inflamatório não esteroide (AINE), popularmente conhecido como Aspirina®, pertencente ao um grupo de fármacos que possuem a capacidade de controle de inflamações, analgesia e combate à febre. OS AINEs encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo (BATLOUNI, 2010).



**Figura 3 – Estrutura da COX (ciclooxigenase) inativada pelo Ácido Acetilsalicílico**  
Fonte: Próprio Autor – Software MolView, 2020.

A Aspirina® sendo “a” em referência ao grupo funcional acetil presente, “spir” devido à espécie da planta de origem e “ina”, terminação comum na época para nomes de medicamentos, atua como um inibidor de uma enzima chamada ciclooxigenase, também chamada COX (Figura 3) (BAYER, 2020).

Como já mencionado, os AINEs são medicamentos que se caracterizam por dificultar a atividade de subtipos da ciclooxigenase, impedindo assim a síntese de prostaglandinas, suprimindo o processo inflamatório. As ciclooxigenases são enzimas pertencentes à cascata do ácido araquidônico, um lipídio presente na membrana plasmática das células, que é transformado em mediadores prostanoides. O bloqueio enzimático, por acetilação, resulta na inibição da biossíntese das prostaglandinas e tromboxanos (Figura 4) (CARVALHO *et al.*, 2004).



**Figura 4 - Cascata Simplificada do Ácido Araquidônico e Ação dos AINEs**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

A COX, enzima chave que catalisa a biossíntese das prostaglandinas, também foi isolada em 1976 e clonada em 1988. Em 1991 foi identificado um gene que codificava uma segunda forma dessa enzima, então chamada de ciclooxigenase-2. Sabe-se, atualmente, que a ciclooxigenase pode ser encontrada em duas formas: a ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). As duas formas têm estrutura proteica primária similar e catalisam essencialmente a mesma reação. Cada COX está relacionada com um tipo de efeito inflamatório e, inibindo sua ação, tem-se a inibição de uma série de mecanismos, inclusive aqueles que desempenham funções

essenciais (FOYE *et al.*, 2008).

Expressa de forma constitutiva, a COX-1 é uma enzima com ação nas funções fisiológicas. No sistema cardiovascular, a COX-1 tem a função reguladora da produção de tromboxanos, responsável pela agregação plaquetária e determina a vasoconstrição. Além disso, também realiza a síntese da prostaciclina, que ao contrário dos tromboxanos, inibe a agregação plaquetária e causa o relaxamento vascular. Para o sistema gastrointestinal, a COX-1 faz a síntese da prostaglandina E2 (PGE2), que tem ação na produção do muco gástrico, importante na proteção contra a acidez e ação de enzimas (CARVALHO *et al.*, 2004).

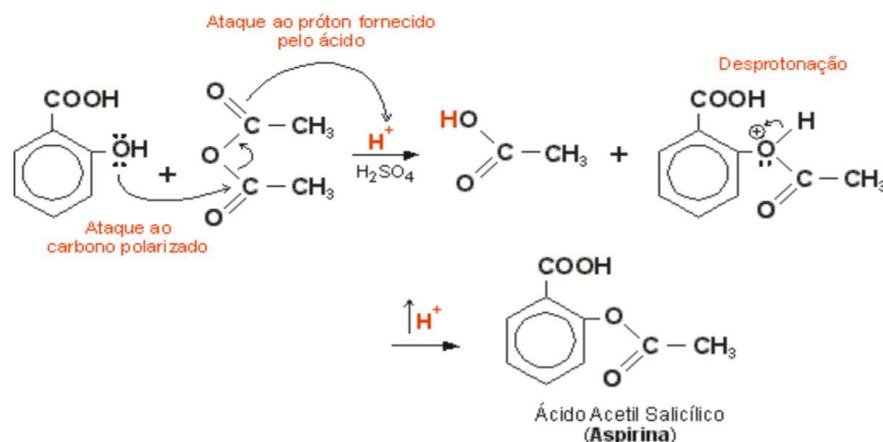
Já a COX-2 tem a expressão acentuada em processos patológicos, por mediadores químicos produzidos por leucócitos. Sua expressão é induzida na presença de dano tecidual ou de infecções microbianas, sendo relacionadas com o desenvolvimento da resposta inflamatória. Ao produzir mediadores prostanoídes, controlam as respostas relacionadas com a dor, inflamação e febre. Durante os processos inflamatórios e/ou infecciosos, os altos níveis de PGE2 resultam na elevação da temperatura, por ativação do hipotálamo no Sistema Nervoso Central (SNC) (CARVALHO *et al.*, 2004).

O bloqueio da COX-2 pelo AAS está relacionado ao seu efeito analgésico, antitérmico e anti-inflamatório. Ao inibir a síntese dos tromboxanos, exerce ação antiplaquetária. O bloqueio da COX-1 se relaciona ao principal efeito adverso do fármaco, no estômago, devido à diminuição da produção do muco gástrico (SERHAN *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Síntese

Para a produção da Aspirina®, a matéria prima foi o salicina extraída do salgueiro, que posteriormente foi separada e obtido o ácido salicílico. Este sofre uma acetilação, para diminuir sua acidez que é bem comum em hidroxilas fenólicas devido

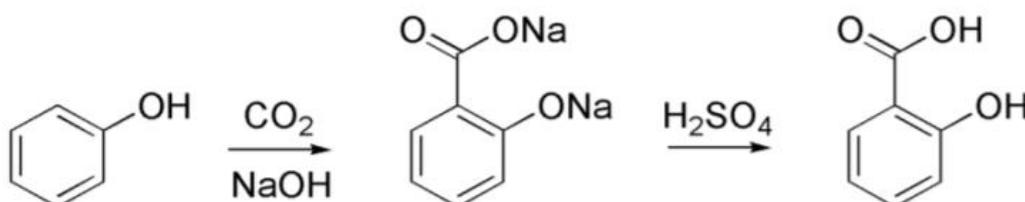
ao elevado pKa, conforme a reação a seguir (Figura 5) (CLAYDN *et al.*, 2000).



**Figura 5 - Substituição eletrofilica para síntese do Ácido Acetilsalicílico**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

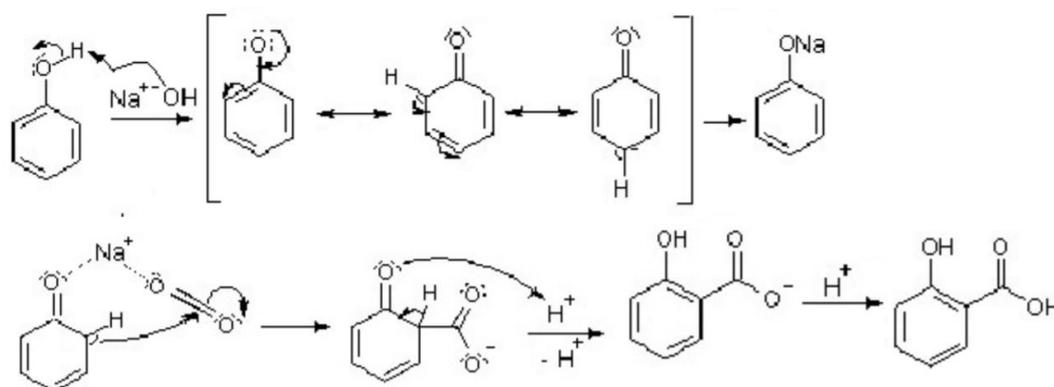
A reação se dá por meio de uma catálise ácida. Forma-se um carbono com carga formal positiva ligado a uma hidroxila, do anidrido. O próximo passo é que a densidade negativa do oxigênio do ácido salicílico ataca o carbono eletrofilo do anidrido. O oxigênio, agora com três ligações, é desprotonado reestabelecendo as duas ligações e também reestabelecendo a acidez do meio, caracterizando um mecanismo de substituição eletrofilica. É importante lembrar que a reação original utilizou cloreto de acetila, uma opção de substituinte para o anidrido acético em reações de acetilação, tendo a desvantagem de ser muito mais reativo, necessitando de um manuseio mais cuidadoso, já que se hidrolisa facilmente com a umidade do ar e em temperatura ambiente, devido ao seu baixo pKa (CLAYDN *et al.*, 2000).

Para reações envolvendo grandes demandas se faz necessário considerar outros aspectos tais como a disponibilidade de matéria prima, favorecimento termodinâmico, entre outros, o que refletirá no custo total da produção. A síntese de Kolbe-Schmitt utiliza o fenol para obter o ácido salicílico, precursor da Aspirina® (Figura 6).



**Figura 6 - Síntese de Kolbe para obtenção do precursor da Aspirina®.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

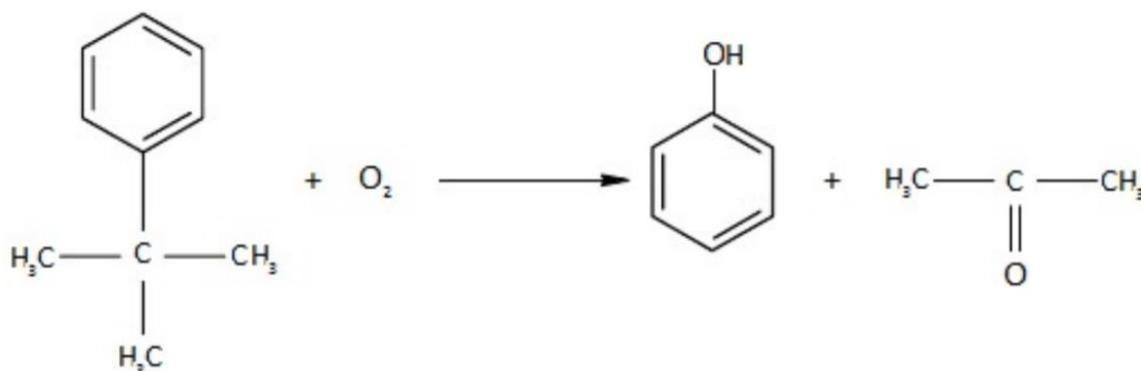
A formação do fenóxido de sódio aumenta a reatividade comparada ao fenol, facilitando sua reação com o dióxido de carbono. A espécie  $O^-$  promove orto e para substituições, todavia a reação com o dióxido de carbono produz mais substituintes orto, 79%, em relação à substituição para, o controle termodinâmico induz a substituição para (Figura 7) (CLAYDN *et al.*, 2000).



**Figura 7 - Formação do fenolato de sódio para obtenção do AAS.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

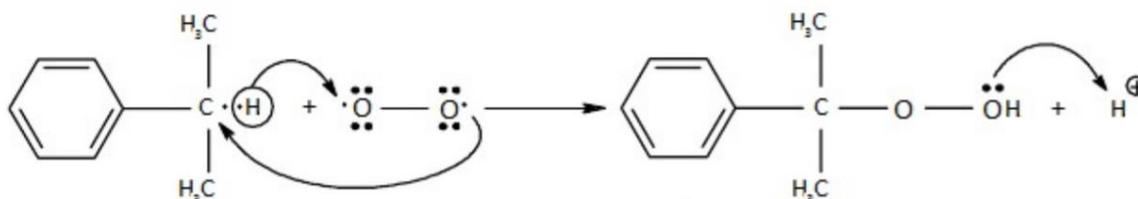
Como a maior porcentagem é o produto orto, a substituição eletrofílica com o dióxido de carbono se dá por meio de uma coordenação entre os oxigênios do CO2 e o sódio. A reação é realizada após aquecer o fenóxido de sódio com dióxido de carbono a elevadas pressões, cerca de 100 atm, que após ser acidificada produz o produto ácido salicílico. Os cristais resultantes são estabilizados por ligações de hidrogênio intramoleculares. A produção da Aspirina® cresceu de forma gigantesca devido a sua difusão no mundo o que aumentou o seu uso. Outras fontes que servissem de precursora para a produção em escala industrial se fizeram necessária, com a síntese de Kolbe-Schmitt o fenol passou a ser usado para obtenção do ácido salicílico, que já não era suficiente a fonte natural (CLAYDN *et al.*, 2000).

A extração do petróleo produz muitas substâncias e em quantidades sempre crescentes. Uma das substâncias extraídas do petróleo é o cumeno ou o isopropil benzeno, que é utilizado para a produção de fenol.



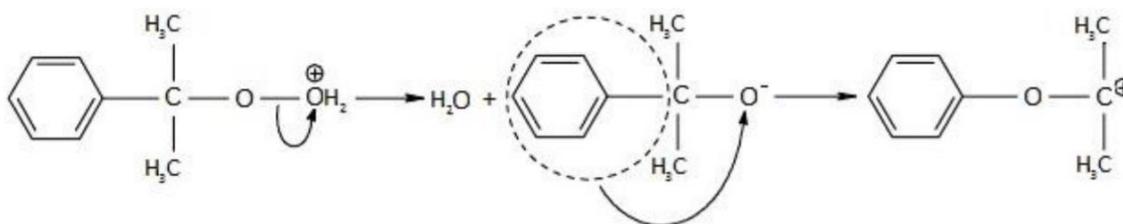
**Figura 8 - Oxidação do cumeno para obtenção do fenol.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

A oxidação do cumeno (Figura 8) tem a vantagem de produzir além do fenol, que será usado para produção de Aspirina®, a propano-2-ona ou a popularmente conhecida como acetona, que tem seu uso como solvente, esmaltes, tintas, vernizes, fármacos fazendo com que esta reação de oxidação do cumeno gere produtos de grande utilidade e baixo custo. O esquema mostra a reação (Figura 9) (CLAYDN *et al.*, 2000).



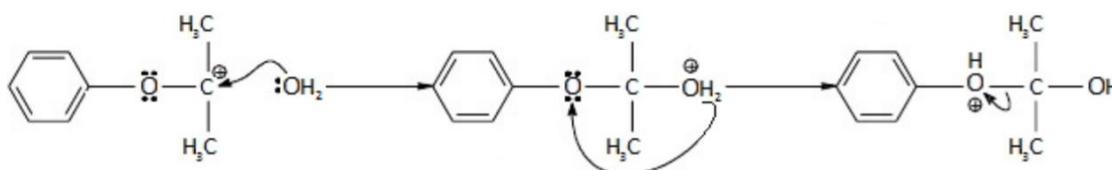
**Figura 9 – Formação do peróxido em contato com oxigênio do ar.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

Logo de início, um peróxido é formado devido à interação do isopropil benzeno com o oxigênio. Após a protonação do oxigênio, ocorre a eliminação de água e formação de um cátion O<sup>+</sup>, que sofre um rearranjo formando um carbocátion mais estável (Figura 10) (CLAYDN *et al.*, 2000).

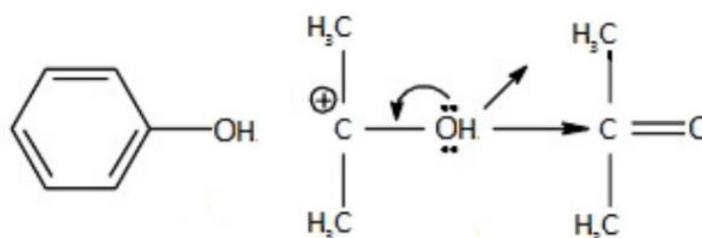


**Figura 10 – Eliminação da água seguida da formação de carbocátion mais estável.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

Numa fase seguinte, o carbocátion adiciona uma molécula de água, ocorrendo uma transferência de próton (Figura 11) e a formação do fenol e da acetona, que pode ser separada por destilação (Figura 12) (CLAYDN *et al.*, 2000).



**Figura 11 – Transferência de próton com subsequente formação do fenol.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.



**Figura 12 – Formação da Acetona.**  
 Fonte: Claydn *et al.*, 2000.

#### 1.2.4 Metodologia Farmacopeica

A metodologia farmacopeica brasileira para quantificação do teor de ácido acetilsalicílico é preconizada pelo método identificado como IF010-00. Utiliza-se cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 237 nm com uma coluna de 250 mm

de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada à grupo octadecilsilano e 5 µm de tamanho de partícula, mantida à temperatura ambiente em um fluxo da fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> com uma mistura de ácido fosfórico, acetonitrila e água na proporção 2:400:600 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

O *system suitability* trata-se de um conjunto de testes de adequação do sistema que são específicos do método e não do instrumento. Sua função é garantir que o sistema analítico esteja apto a gerar dados de qualidade aceitáveis. Para o IF010-00, o *system suitability*, ou seja, a meta, é alcançar resolução de, no mínimo, 6,0, entre ácido acetilsalicílico e ácido salicílico e desvio padrão relativo das áreas de, no máximo, 2,0% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Além desses dois parâmetros, serão avaliados pratos teóricos, assimetria e fator de capacidade e as metas a serem atingidas estão dispostas na Tabela 1:

**Tabela 1 - Parâmetros de *system suitability* - Metas Padrão**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Fator de Capacidade (K')	$2 \leq K' \leq 10$
Resolução (R)	$R \geq 2$
Eficiência da Coluna (N)	$N \geq 2000$
Assimetria (T)	$0,8 \leq T \leq 1,5$
Tempo de corrida	$\leq 10$ minutos para rotina
Precisão	$RSD \leq 2,0\%$ (5,0% para traços)
Pressão de trabalho (P)	$\leq 75\%$ do limite operacional

**Fonte: Adaptado Treinamento Desenvolvimento Merck, 2020.**

A eficiência da coluna é utilizada para comparar o desempenho de colunas diferentes. Ela é expressa como o número de pratos teóricos, N. As colunas com números altos de pratos são mais eficientes. Uma coluna com um valor alto de pratos teóricos terá um pico mais estreito em um determinado tempo de retenção do que uma coluna com um número de pratos mais baixo. O comprimento da coluna e o tamanho de partícula são parâmetros que influenciam a eficiência da coluna (MERCK, 2020).

A resolução é uma medida da habilidade de uma coluna separar dois

componentes. A equação geral que rege a resolução cromatográfica está demonstrada na Equação 1:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \left(\frac{k}{k+1}\right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \quad (1)$$

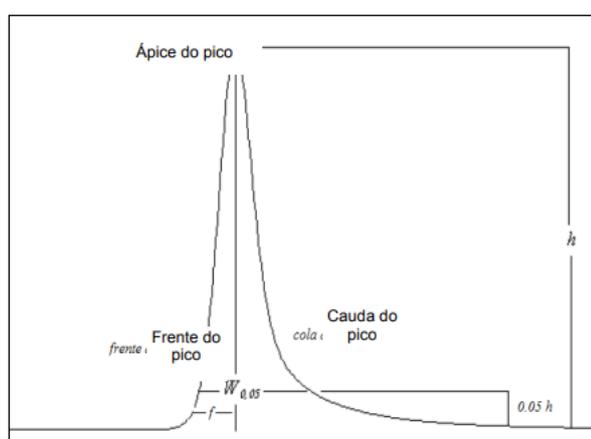
Onde N é número de prato,  $\alpha$  é o fator de seletividade e k é o fator de capacidade.

Analisando a equação da resolução, observa-se que a eficiência, medida pelo número de pratos teóricos (N) é apenas um dos fatores que determinam a resolução cromatográfica. Enquanto N depende principalmente do comprimento (L) e do diâmetro interno (d.i.) da coluna,  $\alpha$  e k dependem da estrutura química da fase estacionária (MERCK, 2020).

Outra forma de avaliar a resolução é através da Equação 2, onde  $t_{r1}$  e  $t_{r2}$  são os tempos de retenção dos dois componentes e  $W_1$  e  $W_2$  são as larguras correspondentes às bases dos picos obtidos extrapolando os lados relativamente retos dos picos até a linha de base (MERCK, 2020).

$$R = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{W_1 + W_2} \quad (2)$$

Já a assimetria, também conhecida como fator de cauda de um pico é calculado pela Equação 3, onde  $W_{0,05}$  é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância do máximo do pico até a borda inicial do pico, medindo a distância em um ponto definido a 5% da altura a partir da linha de base (Figura 13) (PASCHOAL *et al.*, 2008).



**Figura 13 – Representação para o cálculo de assimetria.**  
**Fonte: Paschoal *et al.*, 2008.**

$$T = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (3)$$

O fator de capacidade ou fator de retenção ( $k'$ ) é definido como a razão entre o tempo que o analito tem interação com a coluna ( $t_r$ ) e o tempo de interação com a fase móvel ( $t_0$ ), podendo ser equacionado da seguinte maneira (MERCK, 2020):

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (4)$$

### 1.3 PRODUTIVIDADE

Nunca se falou tanto em produtividade como nos dias de hoje. Com o mundo cada vez mais rápido e mais exigente, cobra-se ainda mais eficiência. Produtividade é uma medida que está intimamente ligada ao desempenho, ou seja, é a relação da quantidade do que é produzido com os insumos que são utilizados ou com a quantidade de tempo investido no processo. De acordo com Paul J. Meyer, pioneiro no setor de desenvolvimento pessoal, produtividade nunca é um acidente, é sempre o resultado de um comprometimento com a excelência, inteligência, planejamento e esforço focado. Mensurar a produtividade de um laboratório é imprescindível para que a gestão seja capaz de avaliar os indicadores de desempenho e definir estratégias para alcançar os objetivos almejados. Aumentar a produtividade em um laboratório essencialmente voltado à técnica cromatográfica demanda otimização de todo *workflow*, desde a busca bibliográfica, preparo de amostra, escolha da fase estacionária adequada, condições da separação, até a validação e o tratamento dos dados (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY BRASIL, 2020).

Abordando o preparo de amostras, essa etapa pode ser automatizada de diversas maneiras, desde um simples processo de interfaceamento das balanças a sistemas de gerenciamento de informações laboratoriais como os *softwares Laboratory Information Management System (LIMS)* e *Chromatography Data System (CDS)* até o uso de robôs de preparo autônomos. Um dos grandes avanços na automação estão diretamente relacionados às técnicas de derivatização de amostras e extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction - SPE*). A técnica de SPE atende principalmente a necessidade de limpeza de amostras em matrizes complexas ou “suja” (produtos naturais, amostras ambientais e fluidos biológicos) e para a concentração de amostras onde os analitos de interesse encontram-se diluídos abaixo dos limites de detecção e

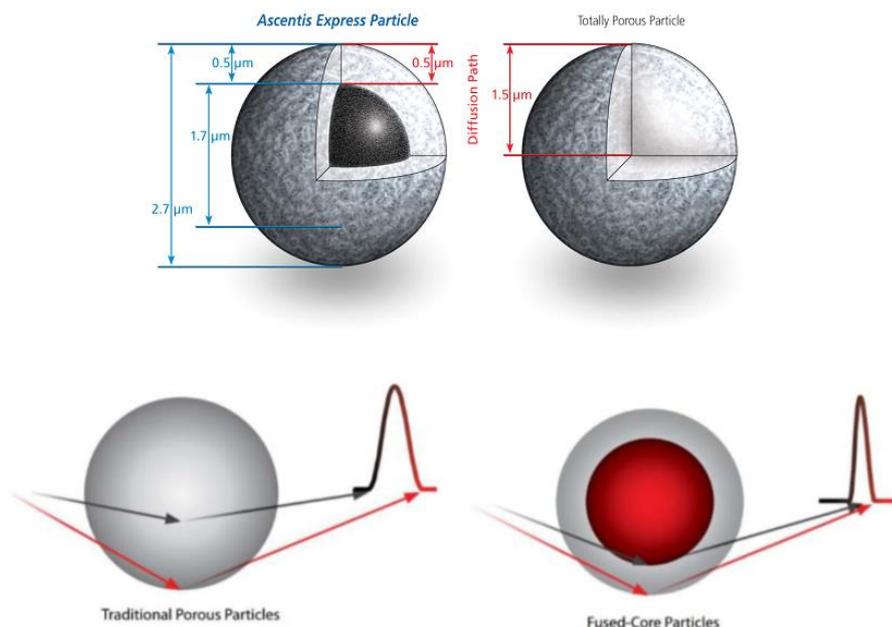
quantificação do equipamento. A técnica tradicional utiliza cartuchos plásticos descartáveis (ou microplacas) e um sistema de vácuo para auxiliar na eluição das amostras e fases de lavagem e extração (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY BRASIL, 2020).

Com demandas cada vez maiores por análises mais rápidas e mais complexas, outra técnica que tem chamado bastante atenção é a cromatografia multidimensional com colunas de funcionalidade ortogonal. Esse mecanismo de separação é um método complementar à cromatografia clássica unidimensional (com uma única coluna). A cromatografia multidimensional acontece com uma separação parcial na primeira coluna e a transferência desses analitos parcialmente separados para a coluna da segunda dimensão (que apresenta funcionalidade distinta da primeira), com o uso de uma válvula programável. Essa perspectiva é extremamente confiável, robusta e financeiramente atrativa. A técnica pode ser realizada nos modos *online* e *off-line*. Para o modo *off-line*, a coleta das amostras da primeira coluna é feita manualmente ou com o uso de um coletor de frações automatizado e, em seguida, injetadas em um sistema com a coluna da segunda dimensão. Para automatização dessa análise, ou seja, para se trabalhar no modo *online*, basta incluir uma válvula chaveadora em um sistema de CLAE com duas bombas de fase móvel. A válvula será responsável pelo processo de transferência da fração não separada para a coluna da segunda dimensão. A inclusão dessa válvula garante melhor confiabilidade e maior capacidade de processamento de amostras, levando um menor tempo e menor perda de amostras, aumentando a produtividade dentro do laboratório. Uma restrição para o modo *online* é a obrigatoriedade da compatibilidade entre as fases móveis utilizadas em ambas as dimensões (HITACHI, 2019).

Outro ponto passível de otimização é a definição e o desenvolvimento da metodologia analítica, atingindo parâmetros de adequabilidade satisfatórios com grande elevação da produtividade. Para o desenvolvimento de um método robusto e seletivo, diversos parâmetros devem ser definidos, começando pela fase estacionária. A coluna é o coração da cromatografia e, para o desenvolvimento de um método otimizado, o ideal é ter conhecimento dos mecanismos de ação das diferentes fases estacionárias nos analitos, promovendo a escolha ideal da fase ligada, tipo de suporte, tamanho de partícula, comprimento da coluna e fase móvel que será utilizada. A busca por métodos analíticos cada vez mais rápidos e eficientes impulsionaram o

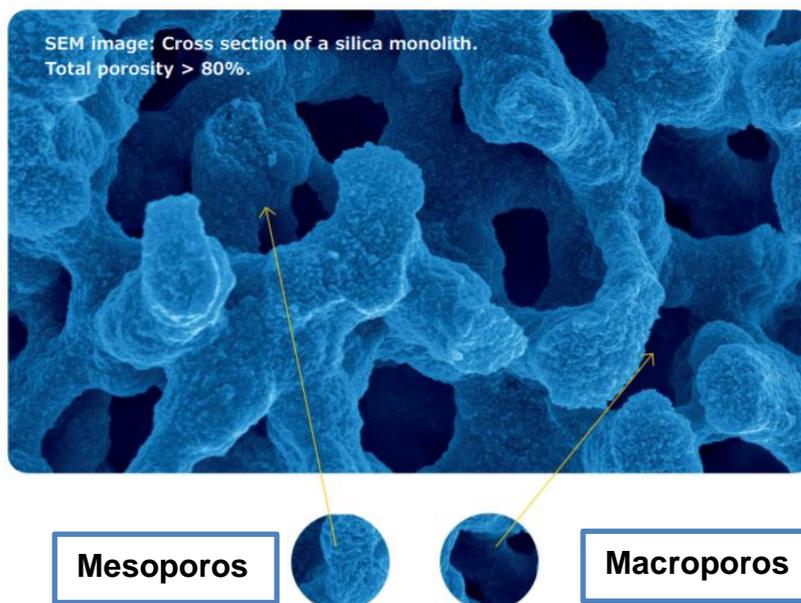
desenvolvimento da cromatografia rápida e ultracromatografia, que se fundamenta nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida tradicional, mas com a utilização de fases estacionárias porosas ou semi-porosas (partículas de núcleo fundido) com tamanhos de partículas iguais ou inferiores à 2 µm. A redução das dimensões da coluna com maiores velocidades lineares de fase móvel leva a um aumento da resolução e melhora dos limites de detecção das análises, além da diminuição expressiva do tempo de corrida (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY BRASIL, 2020).

O bloco monolítico e as colunas de núcleo rígido são duas novas tendências que têm se destacado. As colunas de núcleo rígido ou também chamadas de núcleo fundido têm se apresentado como uma tendência mundial, sendo formadas por uma esfera de sílica fundida não permeável e uma casca de sílica permeável ao redor da esfera, o que permite uma dispersão muito menor, além de uma pressão mais baixa, trabalhando com menor exigência do equipamento e permitindo maior eficiência da análise. A razão para tantos benefícios dessa tecnologia de colunas é devido ao seu processo de fabricação inovador, já que a distribuição do tamanho de partícula é muito estreita, o que permite o uso de fritas de grande porosidade que resistem à entupimentos, resultando em uma coluna mais robusta. A estrutura interna das partículas das colunas de núcleo fundido em uma comparação com as partículas das colunas tradicionais está representada na Figura 14 (KIRKLANDA *et al.*, 2013; MERCK, 2020).



**Figura 14 – Estrutura Interna das Colunas de Núcleo Rígido.**  
**Fonte: Merck, 2020.**

Em contraste com as colunas empacotadas com partículas convencionais, os blocos monolíticos são baseados na tecnologia de sílica monolítica de última geração. São produzidas a partir de um pedaço contínuo de sílica porosa usando um processo sol-gel, essas colunas possuem estrutura porosa bimodal definida com macro e mesoporos na faixa de micro e nanômetros (Figura 15). Os mesoporos formam a estrutura porosa fina (tamanho médio dos poros de 13 nm) e criam a grande área de superfície uniforme na qual ocorre a adsorção, permitindo assim uma separação cromatográfica de alto desempenho. Os macroporos (tamanho médio de 2 µm) permitem um fluxo rápido da fase móvel e baixa pressão. A alta permeabilidade e porosidade do corpo de sílica e a baixa contrapressão resultante, permitem taxas de fluxo mais flexíveis em comparação com colunas de partículas. Como resultado, os blocos monolíticos permitem análises de alto rendimento sem perda de eficiência de separação. A Figura 15 mostra a estrutura interna das colunas de bloco monolítico, com os mesoporos e macroporos, estrutura bimodal que revolucionou as análises cromatográficas com relação a aumento de fluxo e pressões de trabalho substancialmente baixas (MERCK, 2020).



**Figura 15 - Estrutura Interna das Colunas de Bloco Monolítico.**  
Fonte: Merck, 2020.

Algumas características das colunas de bloco monolítico podem ser destacadas. As separações ocorrem duas vezes mais rápidas e com metade da contrapressão se comparada com as colunas tradicionais de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno. Com isso, é inerente uma maior produtividade de amostras, já que as separações são até nove vezes mais rápidas. Além disso, o bloco monolítico tem uma resposta bastante rápida à mudança de fluxo e uma vida útil significativamente aumentada. Um ponto diferencial é com relação ao preparo de amostras, já que para trabalhar com essas colunas, há uma menor necessidade de preparo de amostras, pois as colunas são muito resistentes ao bloqueio, mesmo com amostras biológicas. Por fim, para realização da troca de colunas tradicionais para colunas de bloco monolítico para métodos que requerem validação, a economia de custos devido ao aumento do rendimento das análises justifica a despesa de uma revalidação da metodologia no prazo de um mês (SIGMA ALDRICH, 2020).

#### 1.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Produzir dados confiáveis é uma das competências mais importantes de um laboratório e é através da validação de um método de ensaio que isso pode ser demonstrado. A validação é um processo que define parâmetros analíticos e confirma

se a metodologia desenvolvida é adequada ao fim pretendido. Inerente à definição dos parâmetros, está a necessidade de avaliação do desempenho do método. Além disso, é importante ressaltar que a validação é um processo que deve ser feito depois do desenvolvimento da metodologia e antes das análises para emissão de resultados, já que a validação garante credibilidade e confiabilidade. Desse modo, o termo “validação” é bastante amplo e é apresentado com diversas definições na literatura, além de quais parâmetros devem ser avaliados. Outro ponto que não é harmonizado diz respeito aos critérios de aceitação adotados para cada parâmetro avaliado (CARDOSO *et al.*, 2010; MAGNUSSON, ÖRNEMARK, 2014).

Com o intuito de garantir a qualidade e segurança no uso dos medicamentos, observa-se uma grande movimentação das autoridades sanitárias em todo o mundo em torno deste assunto. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio de legislação e exigências, cobra cada dia mais das indústrias farmacêuticas a comprovação que seus produtos atendam a critérios de segurança, qualidade e eficácia. A norma que estabelece critérios para a validação de metodologias analíticas empregadas em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de Julho de 2017 da ANVISA (ANVISA, 2017).

De acordo com a RDC nº 166, o objetivo da validação é demonstrar que a metodologia escolhida é adequada para a finalidade pretendida, ou seja, comprovar por meio de análises que é possível a determinação qualitativa, semiquantitativa, e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias nos produtos farmacêuticos garantindo que o método atenda as exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados, comprovando assim que o produto pode ser analisado e as especificações comprovadas por tal método (RIBANI *et al.*, 2004). Cada teste é classificado por categoria de acordo com sua finalidade, e baseado nesta, existe um conjunto de parâmetros que devem ser atendidos. Os parâmetros utilizados em validação de métodos analíticos são: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (Tabela 2). Atender à legislação sanitária brasileira, que enfatiza a comprovação da qualidade segurança e eficácia dos medicamentos, tem sido um trabalho rotineiro nas indústrias farmacêuticas (ANVISA, 2003).

**Tabela 2 - Parâmetros a serem considerados na validação analítica RDC n° 166/2017.**

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim	Não	Sim
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

Fonte: Adaptada RDC n° 166, 2017.

#### 1.4.1 Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser comprovada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. No caso de métodos cromatográficos, deve ser provada a pureza cromatográfica do sinal do analito, exceto para produtos biológicos.

Para métodos de quantificação e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação. Para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação, é necessário expor a amostra a condições de degradação ou estresse em ampla faixa de pH, de oxidação, de calor e de luz.

Uma das maneiras para a determinação da seletividade de um método é através do experimento controle, ou seja, compara-se a análise do tempo de retenção do pico resultante da amostra com a análise da matriz isenta do analito, onde os componentes da matriz não podem apresentar picos semelhantes ao tempo de retenção do analito na amostra, sendo eluídos separadamente (RIBANI *et al.*, 2004).

### 1.4.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da solução química de referência (SQR) em, no mínimo, triplicata.

As soluções utilizadas para avaliação da linearidade devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR.

A linearidade pode ser determinada através de expressão matemática, conhecida como curva analítica ou curva de calibração, que correlaciona a resposta fornecida pelo equipamento (sinal obtido) com concentrações ou massas conhecidas da espécie analisada por padronização interna ou externa (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2018). A curva analítica geralmente é obtida usando-se padrões em pelo menos 5 concentrações diferentes em triplicata, obtendo-se a equação da regressão linear de primeiro grau determinada pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a Equação 5 (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2016; LIMA *et al.*, 2017; INMETRO, 2018).

$$y = ax + b \quad (5)$$

Sendo, y a resposta medida (absorbância, altura ou área do pico); a é o coeficiente angular (inclinação da curva ou sensibilidade); x é a concentração do analito; b é o coeficiente linear (interseção com o eixo y quando x = 0).

Os coeficientes de regressão a e b podem ser calculados pelas Equações 6 e 7, respectivamente (ANVISA, 2016; INMETRO, 2018).

$$a = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad (6)$$

$$b = \frac{\sum y_i - a \sum x_i}{n} = \bar{y} - a\bar{x} \quad (7)$$

Onde, xi são valores individuais de concentração; yi são valores individuais da resposta instrumental;  $\bar{x}$  é média de valores de x (concentração);  $\bar{y}$  é média de valores

de y (resposta instrumental).

Além do cálculo dos coeficientes de regressão linear, tem-se a determinação dos coeficientes de correlação linear R e de determinação linear  $R^2$  para expressar o quão adequado a curva analítica está para ser usada como modelo matemático. A qualidade do modelo matemático proposto é definida pelo coeficiente de determinação  $R^2$ , onde valores próximos de 1,0 demonstram forte correlação entre as variáveis. Enquanto a dispersão ou desvio dos pontos experimentais diminui à medida que R se aproxima de  $-1,0$  e  $1,0$ , pois menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para a linearidade da curva ser confiável, a RDC nº 166 recomenda que R deve ser maior ou igual a 0,990 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.

Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados:

- Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- Gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;
- Equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- Avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação ( $r^2$ );
- Avaliação da significância do coeficiente angular.

A homocedasticidade dos dados deve ser investigada para a utilização do modelo adequado. Esse parâmetro trata-se da avaliação dos erros, que não devem ser homogêneos. Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5% (cinco por cento). O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.

#### 1.4.3 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Deve ser expressa por meio de ensaios de repetibilidade, de precisão intermediária ou de reprodutibilidade.

Deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR=(DP/CMD)X100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

As amostras para avaliação da precisão devem ser preparadas de maneira independente desde o início do procedimento descrito no método. Para determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios:

- Avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.;
- Utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.

Para determinação da precisão intermediária, deve-se obedecer aos seguintes critérios:

- Expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos;
- Contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade;

Por último, a reprodutibilidade deve ser obtida por meio da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes. É aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados.

Para afirmar que os resultados obtidos são estatisticamente semelhantes entre si, utiliza-se o teste F e o teste *t-Student*, resumidamente (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2016; INMETRO, 2018). Esse conjunto de procedimentos estatísticos para análise de variância de respostas de experimentos é conhecido por ANOVA (Analysis of Variance). De modo geral, esses testes estatísticos fornecem se um dado experimental é significativamente igual a um valor conhecido ou se dois ou mais dados experimentais podem ser considerados idênticos (SKOOG *et al.*, 2006).

### 1.4.3.1 Teste de Hipótese F

O teste F é empregado na comparação de variâncias e na análise de regressão linear, sendo baseado na hipótese nula de que as variâncias dos dois valores considerados sejam iguais, onde a hipótese nula é rejeitada se o teste estatístico difere muito de 1. Em outras palavras, o Teste F informa se os resultados são precisos entre si. Esse teste é a razão entre os desvios-padrão de dois dados, como mostra a Equação 8, e o resultado é comparado com o valor crítico de F em um determinado nível de confiança. Valores para um nível de significância de 0,05 ou nível de confiança de 95% estão apresentados na Tabela 3 (SKOOG *et al.*, 2006; PROCÓPIO, 2017).

$$F = \frac{SD_1^2}{SD_2^2} \quad (8)$$

**Tabela 3 – Valores críticos de F em um Nível de Probabilidade de 5% (Nível de Confiança 95%).**

Graus de Liberdade (Denominador)	Graus de Liberdade (Numerador)								
	2	3	4	5	6	10	12	20	∞
2	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,40	19,41	19,45	19,50
3	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,79	8,74	8,66	8,53
4	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	5,96	5,91	5,80	5,63
5	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,74	4,68	4,56	4,36
6	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,06	4,00	3,87	3,67
10	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	2,98	2,91	2,77	2,54
12	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,75	2,69	2,54	2,30
20	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,35	2,28	2,12	1,84
∞	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,83	1,75	1,57	1,00

Fonte: Skoog *et al.*, 2006.

Se  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , ambos os métodos ou amostras são significativamente diferentes estatisticamente. Já se  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , os resultados obtidos não apresentam diferença estatisticamente significativa entre seus resultados (SKOOG *et al.*, 2006; PROCÓPIO, 2017)

### 1.4.3.2 Teste t de Student

O teste estatístico t de *Student*, ou simplesmente teste t, considera os valores obtidos ao comparar duas médias de amostras ou uma média de uma amostra e de um valor conhecido, ou seja, o Teste t informa se os resultados são idênticos.

Inicialmente, calcula-se o intervalo de confiança (IC) para a média ( $\bar{x}$ ) de  $n$  réplicas de medidas a partir de um valor de  $t$  tabelado ( $t_{\text{tabelado}}$ ), de acordo com a Equação 9. Para  $n$  medidas, utiliza-se a Equação 10 para determinar o valor de  $t$  experimental ( $t_{\text{calculado}}$ ). Os valores de  $t$  tabelado encontram-se na Tabela 4 (SKOOG *et al.*, 2006; PROCÓPIO, 2017).

$$IC = \bar{x} \pm t_{\text{tabelado}} \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(SD_1^2(n_1-1) + SD_2^2(n_2-1))}{(n_1+n_2-2)}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1+n_2}} \quad (10)$$

**Tabela 4 – Valores de  $t$  tabelado para vários níveis de probabilidade.**

Graus de Liberdade	80%	90%	95%	99%	99,9%
1	3,08	6,31	12,7	63,7	637
2	1,89	2,92	4,30	9,92	31,6
3	1,64	2,35	3,18	5,84	12,9
4	1,53	2,13	2,78	4,60	8,61
5	1,48	2,02	2,57	4,03	6,87
6	1,44	1,94	2,45	3,71	5,96
7	1,42	1,90	2,36	3,50	5,41
8	1,40	1,86	2,31	3,36	5,04
9	1,38	1,83	2,26	3,25	4,78
10	1,37	1,81	2,23	3,17	4,59
15	1,34	1,75	2,13	2,95	4,07
20	1,32	1,73	2,09	2,84	3,85
40	1,30	1,68	2,02	2,70	3,55
60	1,30	1,67	2,00	2,62	3,46
$\infty$	1,28	1,64	1,96	2,58	3,29

Fonte: Skoog *et al.*, 2006.

Se  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ , ambas as médias são estatisticamente diferentes (hipótese alternativa). Já se  $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ , as médias obtidas não apresentam diferença estatística entre seus resultados (hipótese nula) (SKOOG *et al.*, 2006; PROCÓPIO, 2017).

#### 1.4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um

valor aceito como verdadeiro. Deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível.

As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR. Deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela Equação 11:

$$R\% = \frac{X_{exp}}{X_{real}} \times 100 \quad (11)$$

Deve ser calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração. Em análises traço, é aceitável valores de recuperação ou erro relativo percentual entre 80–110% com CV de no máximo 20% para concentrações com grandezas maiores ou iguais à 10–6 (ppm) e de 40–120% para concentrações com grandezas maiores ou iguais à 10–9 (ppb) com CV de no máximo 35% (ANVISA, 2016; INMETRO, 2018).

#### 1.4.5 Limite de Detecção

O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado.

Para métodos visuais, o limite de detecção é determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado. Já para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído.

A razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1, seguindo a Equação 12:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad (12)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração,  $\delta$  é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas:

- A partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;
- A partir do desvio padrão residual da linha de regressão;
- A partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

#### 1.4.6 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. Para a determinação deste parâmetro deve ser seguido o mesmo procedimento descrito no item 1.4.5., sendo que a razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1, como na Equação 13.

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC} \quad (13)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração,  $\delta$  é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas:

- A partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;
- A partir do desvio padrão residual da linha de regressão;
- A partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

Com o crescimento do uso da cromatografia líquida, a técnica ganhou atenção dos pesquisadores para a implementação da Química Analítica Verde (QAV) no desenvolvimento de metodologias analíticas. O objetivo da QAV é reduzir ou eliminar os impactos causados pelas análises químicas sobre o meio ambiente sem prejudicar os parâmetros de desempenho, portanto suas prioridades são: eliminação ou redução de reagentes e solventes, redução de emissões, eliminação de reagentes tóxicos e redução de trabalho e energia. Com base nos princípios da química verde, algumas estratégias são comumente implementadas para obter métodos de cromatografia

líquida mais ecológicos. Elas se concentram na redução do consumo de solvente pela diminuição do comprimento da coluna, diâmetro interno e/ou partícula da coluna; e a substituição de solventes tóxicos e perigosos, como ACN e MeOH, por solventes alternativos menos tóxicos e ambientalmente mais corretos. As técnicas cromatográficas têm o potencial de serem mais verdes em todas as etapas da análise, desde a coleta e preparação da amostra, até a separação e determinação (ARAGÃO et al., 2009; SHIRKHEDKAR; CHAUDHARI, 2021).

## 1.5 QUÍMICA VERDE

A Química é uma ciência que se destaca por sua presença em diversas áreas, desde combustíveis aos mais complexos medicamentos. A produção química gera inúmeros inconvenientes, como a formação de subprodutos tóxicos e a contaminação do ambiente e dos seres humanos. As indústrias devem sempre aprimorar o desenvolvimento dos processos, para que sejam cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente e ao homem (PRADO, 2003; SANTOS *et al.*, 2022).

Criada pelos químicos John Warner e Paul Anastas, membros da Agência Ambiental Norte-Americana, em 1991, a Química Verde foi definida por eles, na época como sendo um conjunto de princípios que reduzem ou eliminam o uso ou a geração de substâncias perigosas durante o planejamento, manufatura e aplicação de produtos químicos (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Em 1993, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) reconheceu e aprovou a criação da Química Verde, definindo-a como invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para diminuir ou eliminar a utilização e a geração de substâncias perigosas. Nessa definição, o termo “perigosas” deve ser entendido como substâncias nocivas ou tóxicas à saúde humana e ao meio ambiente (QUÍMICA VERDE NO BRASIL, 2010).

Conhecida também como Química Limpa ou Química Sustentável, a Química Verde é um tipo de prevenção relacionada à poluição causada por atividades na área química. Buscando o desenvolvimento de metodologias que utilizem e gerem a menor quantidade de materiais tóxicos ou inflamáveis possíveis, esse ramo da Química tem o objetivo de minimizar riscos, assim como gastos com o tratamento dos resíduos gerados nos processos. Para isso, algumas instituições definiram os doze princípios

elementares da Química Verde, que precisam ser seguidos quando se pretende implementá-la em uma indústria ou instituição ou pesquisa na área de química e aqui estão listados os doze pontos (SILVA, 2005; ZIDNY; EILKS, 2022).

**1) Prevenção:** é mais econômico evitar a produção de resíduos tóxicos do que tratá-lo após a sua geração;

**2) Eficiência Atômica:** deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final;

**3) Síntese Segura:** sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente;

**4) Desenvolvimento de Produtos Seguros:** os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos;

**5) Solventes e Auxiliares Seguros:** o uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, entre outros) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas ou facilmente reutilizáveis;

**6) Eficiência Energética:** a utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes;

**7) Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima:** sempre que possível e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não-renováveis;

**8) Evitar a Formação de Derivados:** a derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção, desproteção ou modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos;

**9) Catálise:** o uso de catalisadores seletivos deve ser escolhido em substituição aos reagentes estequiométricos;

**10) Síntese de Produtos Biodegradáveis:** os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente;

**11) Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição:** será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas;

**12) Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes:** a escolha das substâncias adicionadas ou formadas em um processo químico deve considerar a minimização do risco de acidentes, vazamentos, incêndios e explosões.

#### 1.5.1 Avaliação do Caráter Verde – Métricas Holísticas

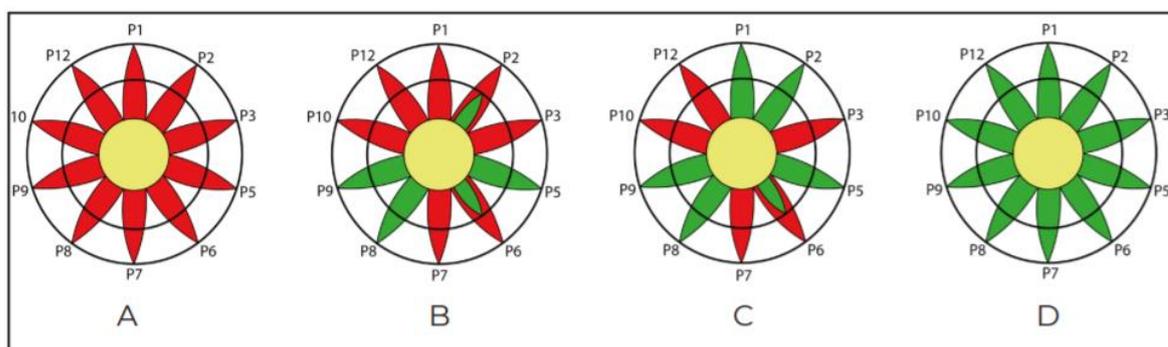
O significado da palavra “métrica” em qualquer contexto corresponde a um sistema de avaliação do funcionamento de um sistema dinâmico e complexo que permite aferir o modo como ele opera, especificamente quanto ao cumprimento dos respectivos objetivos. Os resultados provenientes servem para auxiliar na tomada de decisões na gestão do sistema, justificar alterações a serem realizadas, orientar a evolução de processos e promover inflexões do seu funcionamento visando atingir de forma mais eficaz o objetivo pretendido (GAŁUSZKA *et al.*, 2012; BECKER *et al.*, 2022).

Avaliar quantitativamente o caráter verde dos processos analíticos é um ponto de muita atenção, já que é uma grande dificuldade do processo. Isso surge por conta da grande variedade de metodologias, solventes, analitos, complexidade da matriz, além de muitas outras etapas a serem consideradas. Além disso, a verdura química é um conceito difícil de avaliação devido à complexidade intrínseca da Química e das suas múltiplas relações com o ambiente, biosfera e a sociedade. As métricas relacionadas à massa da Química Verde fornecem indicações úteis sobre a verdura, mas têm um alcance limitado pois aferem apenas a produtividade atômica, ou seja, fornecem uma avaliação incompleta do caráter verde, que não leva em consideração os riscos para a saúde e para o ambiente. As métricas ambientais são um complemento essencial da avaliação do caráter verde, mas são complexas e difíceis

de usar (GAŁUSZKA *et al.*, 2012; EL-KAFRAWY *et al.*, 2022).

Nesse sentido, as métricas holísticas surgiram com o objetivo de favorecer a transposição da forma qualitativa da avaliação do caráter verde para uma forma quantitativa. O emprego das métricas de verdura representam um meio de avaliar o quanto um processo se aproxima ou se afasta do cumprimento dos princípios que norteiam a Química Verde. Um exemplo de uma métrica holística é a chamada Estrela-Verde (EV), que atende simultaneamente os doze princípios da Química Verde (RIBEIRO *et al.*, 2010; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022).

A EV é uma estrela com o número de pontas relativo ao número de princípios que estão sendo avaliados. Cada ponta terá o seu respectivo comprimento proporcional ao grau do cumprimento do princípio correspondente (Figura 16).



**Figura 16 - Métrica holística Estrela-Verde A à D, em ordem crescente do atendimento aos princípios da Química Verde.**  
**Fonte: Vitalino et al, 2019.**

A EV é um gráfico radial que pode ser construído a partir de planilhas eletrônicas. A Figura 16 apresenta um conjunto de EVs em ordem crescente do atendimento aos princípios. A EV A, preenchida completamente de vermelho, registra as medidas de uma situação em que nenhum dos Princípios da Química Verde foram atendidos. Desta forma, representa a pior situação possível, denominada de caso maligno. A EV D, totalmente preenchida de verde, exemplifica uma situação em que todos os Princípios da Química Verde foram atendidos plenamente. Representa uma situação ideal denominada de caso benigno. As EV B e EV C demonstram situações intermediárias. A EV B apresenta cinco pontas totalmente vermelhas, representando os princípios que não foram atendidos. As três pontas totalmente verdes indicam os princípios que foram totalmente atendidos. As duas pontas preenchidas com as duas cores, verde e vermelha, reflete a situação em que o princípio foi parcialmente

atendido. A EV C tem um número maior de pontas verdes quando comparada com a EV B, por evidenciar uma situação em que o número de princípios que foram totalmente atendidos é maior (RIBEIRO *et al.*, 2010; MARTÍNEZ *et al.*, 2022).

Economia atômica, eficiência da massa de reação, estrela verde e eco escala são métricas tradicionais muito utilizadas, porém são técnicas aplicadas à Química Verde mais voltadas para fins de sínteses orgânicas do que para aplicações em Química Analítica Verde, além de serem técnicas essencialmente qualitativas. Adaptações destas métricas e outras metodologias de avaliação de verduza química, quantitativas e semiquantitativas, foram sendo propostas na literatura com o intuito de promover uma avaliação adequada aos procedimentos analíticos como, por exemplo, a reformulação da métrica por economia atômica, a Avaliação do Ciclo de Vida (LCA), o Índice Nacional de Métodos Ambientais (NEMI), Certificado Verde e uma adaptação da eco escala (YABRÉ *et al.*, 2020).

A rotulagem NEMI é um banco de dados que resulta em um pictograma de fácil leitura que classifica os métodos analíticos de acordo com quatro critérios: PBT (persistente, bioacumulativo e tóxico), corrosivo (pH < 2 ou > 12), perigoso e resíduos (>50 g). Como exemplo, a Figura 17 compara dois métodos para determinação de pesticidas orgânicos na água, utilizando cromatografia gasosa (OLIVEIRA, 2002; FERREIRA *et al.*, 2022).

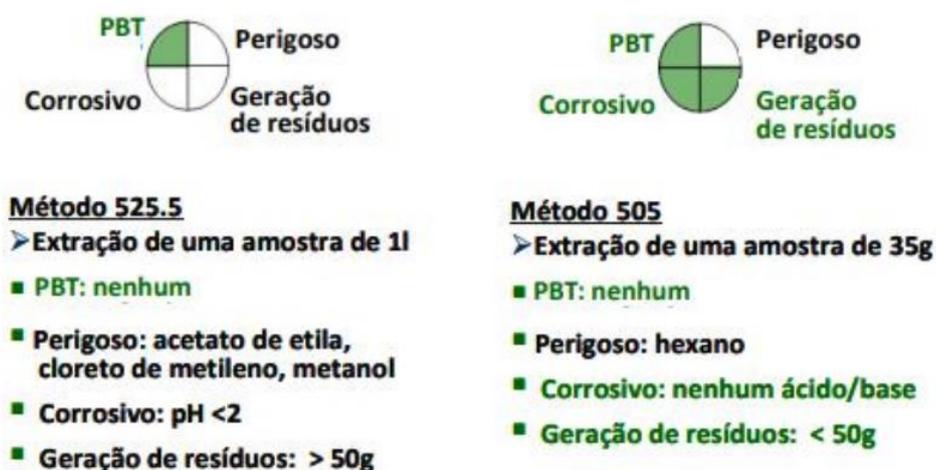


Figura 17 - Avaliação do Caráter Verde entre métodos 525.5 e 505 segundo os critérios da rotulagem NEMI.

Fonte: Oliveira, 2022.

O quadrante verde preenchido, indica que o método analítico atende ao

respectivo critério, ou seja, é “verde” neste quesito. E como pode ser observado na Figura 17, o método 505 é o mais “verde” para essa análise, por possuir mais quadrantes preenchidos. Entretanto, a rotulagem NEMI ainda é uma métrica mais qualitativa, que leva em consideração uma avaliação sem muitos requisitos e sem atribuição e avaliação de dados (OLIVEIRA, 2002; RAHMAN *et al.*, 2022).

A reformulação da eco escala para aplicação em procedimentos analíticos também assume que um procedimento ideal, caracterizado pela eliminação ou minimização de reagentes, consumo de energia e geração de resíduos, têm uma pontuação igual a 100 pontos na eco escala. Pontos de penalidade são atribuídos a parâmetros que diferem do ideal e são subtraídos de 100, logo, quanto mais a pontuação se afasta da máxima, menos verde é o procedimento. Os resultados obtidos da subtração classificam os procedimentos analíticos como excelente caráter verde 10 (>75 pontos), caráter verde aceitável (50 pontos) e caráter verde inadequada (<50 pontos) (IBRAHIM *et al.*, 2019; RASHED *et al.*, 2020; DOGAN *et al.*, 2020; LUVIZON, 2020).

Para atribuição dos pontos de penalidade às substâncias envolvidas nos procedimentos, GAŁUSZKA e colaboradores (2012) propõem que a avaliação dos riscos físicos, ambientais e à saúde sejam atribuídos com base no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). A partir dessa classificação, cada substância é caracterizada por um ou mais pictogramas, a quantidade de pictogramas corresponde a um subtotal de pontos que deve ser multiplicado pelo valor atribuído à palavra de advertência sinalizada no GHS, na qual 0 pontos é atribuído aos reagentes sem pictogramas, 1 ponto de penalidade é atribuído ao reagente que contém perigo menos grave, sinalizado pela palavra “atenção” e 2 pontos são atribuídos ao reagente que contém perigos mais graves, sinalizado pela palavra “perigo”. Além destas, outra pontuação também deve ser multiplicada, a que se refere aos valores de quantidade utilizadas de cada solvente. Do ponto de vista energético e residual, as pontuações devem ser atribuídas conforme indicado na Figura 18.

	Reagentes	Sub-total	Total
<b>Quantidade</b>	<10 mL (g)	1	Quantidade X Perigo
	10-100 mL (g)	2	
	>100 mL (g)	3	
<b>Perigo</b>	Nenhum	0	
	Risco menos grave	1	
	Risco mais grave	2	
<b>Energia</b>	≤1,0 kWh por amostra		0
	≤1,5 kWh por amostra		1
	>1,5 kWh por amostra		2
<b>Risco ocupacional</b>	Processo analítico Hermético		0
	Emissão de vapores e gases para o ar		3
<b>Resíduo Quantidade</b>	Nenhum	0	Quantidade X Característica
	<1 mL	1	
	1-10 mL	3	
	>10 mL	5	
<b>Característica</b>	Reciclável	0	
	Degradável	1	
	Passivo	2	
	Não admite tratamento	3	
<b>Somatório dos pontos</b>			<b>TOTAL</b>

Figura 18 – Pontuações atribuídas para avaliação na eco escala.  
Fonte: Adaptado GALUSZKA *et al.* (2012).

Em 2014, Funari e colaboradores desenvolveram um outro método de avaliação para estimar o quão verde são as análises cromatográficas, o Green Chromatographic Fingerprint Response (GCFR). Este método é baseado em fatores relacionados ao desempenho da separação cromatográfica e está representado na Equação 14. A equação contém três termos complementares e foi projetada para maximizar o número de picos e sua distribuição ao longo de todo o cromatograma ao mesmo tempo em que tenta maximizar o número de picos por minuto de análise.

$$GCFR = n^x \left( \frac{FP}{MP} \right) \left( \frac{n}{t} \right) \quad (14)$$

Onde n é o número total de picos num cromatograma, x é o expoente de n (indica o peso atribuído a ele), t é o tempo total de execução, *fewer peaks* (FP) é o número de picos na seção do cromatograma com menos picos e *more peaks* (MP) é

o número de picos na seção do cromatograma de igual comprimento, mas com mais picos (FP/MP indica como uniformemente esta informação é distribuída entre seções iguais do cromatograma). Quanto mais alta a pontuação GCFR para uma determinada corrida, melhor, pois significa uma separação mais eficiente (FUNARI *et al.*, 2014).

De forma alternativa à métrica GCFR, utilizou-se a métrica AGREE - *Analytical GREEnEss Metric* - para se quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido e para estabelecer comparações com o método de referência IF010-00. A métrica foi selecionada porque representa o estado-da-arte na literatura e possibilita uma avaliação flexível, rápida, de fácil interpretação, porém holística do impacto ambiental de processos. O critério de avaliação se baseia em critérios quantitativos baseados nos 12 princípios da Química Analítica Verde (para os quais podem ser atribuídos pesos pelo analista), os quais são transformados em uma escala que varia de 0 a 1. O resultado final é apresentado na forma de pictograma por um software livre disponibilizado no material suplementar da referência original. O pictograma indica um score final, a performance do processo em cada um dos critérios avaliados e eventuais pesos atribuídos pelo usuário (PENA-PEREIRA *et al.*, 2020; KOKILAMBIGAI; LAKSHMI, 2022).

### 1.5.2 Cromatografia Verde

Para algumas implementações, é necessário modificar a instrumentação cromatográfica, o que pode tornar o método mais caro e/ou mais complexo. Por isso, uma boa tática é a substituição de solventes tóxicos por solventes verdes alternativos, como o etanol por exemplo. O etanol é um solvente ambientalmente amigável e com características favoráveis para as análises de cromatografia líquida. Com isso, muitos estudos estão sendo feitos para sua aplicação como solvente orgânico na fase móvel e a maioria deles demonstraram bons resultados. Um artigo publicado em 2014 fez uma combinação dos dados divulgados por algumas instituições que categorizaram os solventes de acordo com sua periculosidade. A combinação dos dados resultou em um *ranking* dos solventes mais e menos recomendados para se utilizar em análises químicas, mostrado na Figura 19 (PRAT *et al.*, 2014; HESSEL *et al.*, 2022).

Recomendado	Água, EtOH, i-PrOH, 1-BuOH, EtOAc, i-PrOAc, n-BuOAc, anisol, sulfolano.
Recomendado ou problemático?	MeOH, 2-BuOH, t-BuOH, álcool benzílico, etilenoglicol, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, ciclohexanona, MeOAc, AcOH, Ac <sub>2</sub> O.
Problemático	Me-THF, heptano, Me-ciclohexano, tolueno, xileno, clorobenzeno, acetonitrila, DMPU, DMSO.
Problemático ou Perigoso?	MTBE, THF, ciclohexano, DCM, ácido fórmico, piridina.
Perigoso	Éter di-isopropílico, 1,4-dioxano, DME, pentano, hexano, DMF, DMAc, NMP, metoxietanol, TEA.
Altamente Perigoso	Éter dietílico, benzeno, clorofórmio, CCl <sub>4</sub> , DCE, nitrometano.

**Figura 19 – Ranking dos solventes**  
**Fonte: Adaptado de PRAT, *et al.*, 2014**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

- Otimizar e acelerar a metodologia farmacopeica brasileira IF010-00 para quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE;
- Desenvolver a nova metodologia utilizando os conceitos da Química Verde;
- Validar a metodologia analítica otimizada seguindo as preconizações da RDC 166/2017 da ANVISA;

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Otimizar parâmetros cromatográficos para redução de tempo de corrida, aumentando a produtividade;
- Implementar a utilização de colunas cromatográficas com tecnologias mais modernas - fase estacionária semi-porosa (partículas de núcleo fundido) e monolíticas - para aumento da resolução e melhora dos limites de detecção da análise;
- Reduzir ou eliminar a geração de resíduos e minimizar a utilização de solventes, visando atender à filosofia da Química Verde;
- Comparar e avaliar o caráter verde da metodologia original e da metodologia desenvolvida;
- Validar a metodologia analítica otimizada seguindo a RDC 166/2017 da ANVISA, assegurando sua adequabilidade ao fim proposto de acordo com as exigências dos órgãos regulamentadores;
- Submeter a metodologia analítica otimizada para teste em algum laboratório farmacêutico brasileiro.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Padrões Analíticos de Referência e Amostra de Aspirina®

Os padrões analíticos de referência utilizados estão relacionados na Tabela 5, com a descrição do lote, pureza, validade e marca:

Tabela 5 – Padrões Analíticos Utilizados.

Padrão Analítico	Lote	Pureza, % m/m	Data de Validade	Marca
Ác. Acetilsalicílico	LRAC6517	99,9	31/10/2024	Sigma Aldrich
Ácido Salicílico	3.0	100	16/03/2024	USP

Fonte: Próprio Autor, 2022.

As amostras dos comprimidos de Aspirina® e do placebo Parateck® SI 200 utilizados estão relacionadas na Tabela 6, com a descrição de lote, data de validade e marca:

Tabela 6 – Amostra e Placebo Utilizados.

Amostra	Lote	Data de Fabricação	Data de Validade	Marca
Aspirina®	ARBSS6	01/12/2020	01/12/2022	Bayer
Parateck® SI 200	K32103583	28/10/2020	28/10/2022	Merck

Fonte: Próprio Autor, 2022.

### 3.1.2 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento e validação da metodologia analítica estão descritos na Tabela 7:

Tabela 7 – Solventes Utilizados.

Reagente/Solvente	Lote	Data de Fabricação	Data de Validade	Marca
<b>Acetonitrila grau HPLC</b>	I1014830921	09/05/2019	31/05/2022	Merck
<b>Ácido Fosfórico</b>	K52677452108	18/03/2021	31/07/2023	Merck
<b>Etanol grau HPLC</b>	K52885927	15/10/2020	31/10/2023	Merck
<b>Água Milli-Q</b>	NA	NA	NA	Merck

Fonte: Próprio Autor, 2022.

### 3.1.3 Equipamentos e Consumíveis

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos  
Marca: Hitachi High-Tech  
Modelo: Chromaster 600
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos  
Marca: Agilent Technologies  
Modelo: 1260 Infinity
- Balança Analítica  
Marca: Sartorius  
Modelo: Secura 225-D

- Deionizador  
Marca: Sartorius  
Modelo: YIB01-0UR
- Repipetador Eletrônico  
Marca: Brand  
Modelo: HandyStep® S
- Banho de Ultrassom  
Marca: Branson  
Modelo: 5800
- Ultra purificador de água  
Marca: Merck Millipore  
Modelo: Milli-Q IQ7005
- Estufa Câmara Climática  
Marca: Ethik  
Modelo: 420 – 150L
- Câmara Escura Ultravioleta  
Marca: SpaLabor  
Modelo: SP-204 (254 nm)
- Coluna Cromatográfica Purospher Star RP-18 250x4,6mm - 5µm  
Marca: Merck  
Lote: HX431554
- Coluna Cromatográfica Ascentis Express C18 150x4,6mm – 2,7µm  
Marca: Supelco  
Lote: USHW008815
- Coluna Cromatográfica Chromolith High Resolution RP-18 100x4,6mm

Marca: Merck

Lote: HX02314222

- Coluna Cromatográfica Chromolith High Resolution RP-18 100x4,6mm

Marca: Merck

Lote: HX16525922

- Filtro de Membrana Millex PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  – 33 mm de diâmetro

Marca: Merck

## 3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ÁCIDO ACETILSALÍCILICO

#### 3.2.1.1 Metodologia Original

Inicialmente, foram preparadas soluções padrão de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico de forma independente, seguindo todo procedimento preconizado pela farmacopeia brasileira.

Os padrões foram pesados em balança analítica, previamente calibrada na faixa de trabalho e transferidos quantitativamente para balões volumétricos, onde foram solubilizados em uma mistura de acetonitrila, água ultrapura e ácido fosfórico na proporção de 400:600:2. Em seguida, os balões foram levados ao banho de ultrassom por 5 minutos para garantir a solubilização completa. Após equalizar a temperatura, completaram-se os volumes dos balões até o menisco com a mistura diluente.

Com as soluções padrão prontas e previamente filtradas em Millex® PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ , realizou-se a análise cromatográfica utilizando-se as condições do método farmacopeico IF010-00 e uma coluna Purospher Star RP-18 250 mm x 4,6 mm – 5  $\mu\text{m}$ , tal qual descreve a metodologia registrada, de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 8 – Parâmetros da Metodologia Original do AAS®.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Configuração</b>
<b>Comprimento de Onda</b>	237 nm

<b>Temperatura do Forno</b>	25°C
<b>Fluxo de Fase Móvel</b>	1 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Tempo de Corrida</b>	10 minutos
<b>Volume de Injeção</b>	10 µL
<b>Composição da Fase Móvel</b>	ACN:H <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (400:600:2)

---

Fonte: Próprio Autor, 2022.

Após o fim da análise, com todos dados tratados e as integrações realizadas, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempos de retenção, resolução, assimetria e desvio padrão relativo entre as áreas dos picos.

### 3.2.1.2 Transferência para Metodologia com Etanol – Coluna Original

Seguindo com os testes para o desenvolvimento e aceleração da metodologia, realizou-se a análise cromatográfica utilizando os mesmos parâmetros da Tabela 8, porém mudando-se a acetonitrila pelo etanol na composição da fase móvel e no preparo de amostras. Vale ressaltar que, a fim da redução de gasto de solvente, trabalhou-se com preparo de amostras diretamente em vials, com uso de repipetadores eletrônicos.

Foram realizadas uma sequência de análises de forma a encontrar a composição ideal de etanol que ajustasse o tempo de retenção do ácido acetilsalicílico para o mesmo tempo de retenção da condição farmacopeica, ou seja, utilizando acetonitrila na composição da fase móvel.

Da mesma forma, após o fim da análise, com todos dados tratados e as integrações realizadas, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempos de retenção, resolução, assimetria e desvio padrão relativo entre as áreas dos picos.

### 3.2.1.3 Aceleração da Metodologia – Coluna de Núcleo Rígido

Com o objetivo de acelerar a metodologia de análise, a primeira coluna a ser testada foi uma Ascentis Express® C18 150 mm x 4,6 mm – 2,7 µm de tamanho de partícula. O primeiro teste realizado foi a análise com os mesmos parâmetros definidos

pelo item 3.2.1.2., apenas com a mudança da coluna cromatográfica.

Como um segundo teste, realizou-se a mesma análise, com uma alteração na temperatura do forno de 25°C para 45°C e as mudanças foram avaliadas.

Da mesma forma, após o fim da análise, com todos dados tratados e as integrações realizadas, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempos de retenção, resolução, assimetria e desvio padrão relativo entre as áreas dos picos.

#### **3.2.1.4 Aceleração da Metodologia – Coluna de Bloco Monolítico**

Ainda trabalhando na aceleração da metodologia analítica, a segunda coluna a ser testada foi uma Chromolith® High Resolution RP-18 100 mm x 4,6 mm. O primeiro teste foi realizar a análise com os mesmos parâmetros definidos pelo item 3.2.1.2., apenas com a mudança da coluna cromatográfica.

Como um teste subsequente, realizou-se um ensaio com mudança de fluxo, onde foram testados fluxos de 1; 1,5; 2 e 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. Após avaliação do fluxo ótimo, um terceiro ensaio foi realizado trabalhando-se com alteração da temperatura do forno de colunas, onde foram realizados testes com 25, 30, 35 e 40°C.

Da mesma forma, após o fim da análise, com todos dados tratados e as integrações realizadas, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempos de retenção, resolução, assimetria e desvio padrão relativo entre as áreas dos picos.

### **3.2.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA OTIMIZADA**

#### **3.2.2.1 Seletividade**

A seletividade da metodologia analítica desenvolvida foi avaliada comparando-se os cromatogramas do Parteck® SI 200, da solução padrão e das fases móveis – etanol, água ultrapura e ácido fosfórico. As alíquotas foram filtradas e transferidas para vials para análises cromatográficas. A comparação foi realizada pelo tempo de retenção dos cromatogramas, com sobreposição de cromatogramas.

Além do procedimento descrito acima, a seletividade também foi avaliada submetendo as soluções padrão a condições de estresse durante 48 horas, de modo a verificar se produtos de degradação interfeririam na quantificação do analito. As condições testadas foram:

- Alta temperatura (35°C): a solução padrão foi submetida a aquecimento em uma estufa à 35°C durante 48 horas;
- Meio ácido: a solução padrão foi preparada e adicionaram-se 5 gotas de ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>;
- Meio básico: a solução padrão foi preparada e adicionaram-se 5 gotas de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>;
- Luz ultravioleta: a solução padrão foi preparada e submetida à luz ultravioleta em câmara (UV, 254 nm) durante 48 horas em temperatura ambiente.

O solvente utilizado nos preparos das soluções foi o mesmo sistema de solventes da fase móvel. Os tempos de coleta das soluções foram: 0, 12, 24 e 48 horas.

#### 3.2.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada em triplicata em cinco pontos de concentração, contemplando a faixa de 80% a 120% (400 a 600 mg/comprimido) da concentração nominal do analito de interesse (ácido acetilsalicílico). Para realização desse ensaio, foram preparadas, em balões volumétricos de 10 mL, cinco soluções padrão nos seguintes níveis de concentração: 80%, 90%, 100%, 110% e 120% da concentração esperada do ácido acetilsalicílico (500 mg/comprimido). Além do preparo em balões volumétricos, para avaliação da linearidade, também preparam-se os pontos da curva de calibração em vials de 2 mL, de modo à reduzir o gasto de solvente e para comprovar estatisticamente que essa mudança no preparo não prejudica a análise cromatográfica.

As áreas registradas em cada nível de concentração foram submetidas à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ), utilizando-se o software de validação Neolicy®. Segundo a norma RDC n° 166, o critério de aceitação é que o coeficiente de correlação esteja acima de 0,990.

### 3.2.2.3 Precisão - Repetibilidade

A precisão foi avaliada por meio do ensaio de repetibilidade, executando-se a metodologia analítica desenvolvida utilizando-se o mesmo equipamento, mesmo analista e mesmo dia. Para isso, foram preparadas seis soluções padrão independentes em 100% da concentração nominal (500 mg/comprimido) em balão volumétrico de 10 mL e analisado em unicata. O mesmo preparo foi realizado diretamente em vials pela mesma justificativa descrita no item 3.2.2.2.

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR=(DP/CMD) \times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

### 3.2.2.4 Precisão - Reprodutibilidade

Além da repetibilidade, a precisão também foi avaliada pelo ensaio de reprodutibilidade. Para a realização do parâmetro reprodutibilidade para validação, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, também equipado com bomba quaternária e detector DAD. Os dados foram obtidos e processados com software OpenLab e posteriormente avaliados pelo Neolicy®. O teste de reprodutibilidade foi feito sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, mudando-se o equipamento, o dia de análise, o analista e o laboratório. O preparo das amostras seguiu o mesmo procedimento do item 3.2.2.3. A reprodutibilidade foi avaliada da mesma forma que a repetibilidade.

### 3.2.2.5 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção foi avaliado utilizando o cromatograma do primeiro ponto da curva analítica, ou seja, em 80%, sendo determinado pela razão sinal-ruído, que deve ser maior ou igual a 2:1.

O limite de quantificação foi avaliado da mesma forma, porém deve ser maior ou igual a 10:1.

### 3.2.2.6 Exatidão

O parâmetro de exatidão foi avaliado fortificando-se o Parateck® SI 200 em três níveis diferentes com concentrações conhecidas do analito de interesse: 80%, 100% e 120% (400, 500 e 600 mg/comprimido) da concentração nominal do analito. Em seguida, foram submetidas à análise nas condições pré-determinadas e obteve-se as áreas dos picos em cada nível de concentração e fez-se o cálculo do desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração.

### 3.2.3 AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE

O caráter verde da metodologia analítica desenvolvida foi avaliado por uma série de métricas: estrela-verde (EV), NEMI, eco escala analítica e AGREE. Além das avaliações baseadas em métricas já definidas, também realizou-se uma análise de dados comparando-se a metodologia desenvolvida contra a metodologia farmacopeica, levando-se em consideração a quantidade de solvente utilizada, o preço dos solventes, economia de tempo de hora/máquina, entre outros parâmetros.

Para avaliação do caráter verde pelo método da estrela-verde, trabalhou-se com um modelo automático disponível em um catálogo digital de verdura de atividades laboratoriais para o ensino da Química Verde do Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto em união com outros grupos de pesquisa na área da Química Verde. Nesse modelo, foi realizado o preenchimento dos critérios para classificação dos perigos das substâncias de acordo com o GHS, onde são inseridos perigos físicos, ambientes e de saúde e o modelo pontua com base nas frases de perigo e códigos GHS. Pela pontuação e avaliação de cada princípio da Química Verde, o próprio modelo gera a estrela-verde referente ao processo avaliado ([http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao\\_ev](http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao_ev)).

Para avaliação utilizando a NEMI, cada metodologia foi avaliada pelos critérios que estão descritos detalhadamente nos resultados e o pictograma foi desenhado utilizando *Paint*.

A eco escala analítica também foi avaliada seguindo os procedimentos descritos e calculadas as pontuações de penalidade que, em seguida, foram descontadas do valor ideal de 100 pontos.

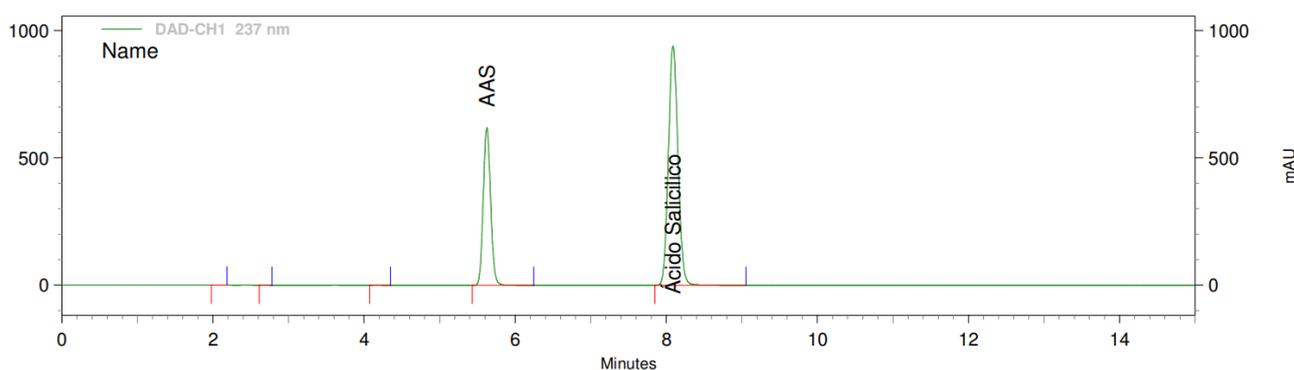
Para avaliação utilizando a métrica AGREE, foi utilizado o *software The Analytical Greenness Calculator*, uma ferramenta para avaliar os riscos ambientais e ocupacionais associados a um procedimento analítico específico baseado nos 12 princípios da Química Analítica Verde. Este resultado é traduzido em um gráfico de fácil interpretação e contém uma pontuação geral, além de uma indicação do grau de conformidade do procedimento avaliado com cada um dos 12 princípios. Ele pode ser usado para comparar diferentes métodos para selecionar aquele com o menor impacto ambiental ou para identificar possíveis pontos problemáticos em termos de "verde" durante a conceituação e desenvolvimento de novos procedimentos analíticos (<https://mostwiedzy.pl/wojciech-wojnowski,174235-1/AGREE>).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ÁCIDO ACETILSALÍCILICO

#### 4.1.1 Metodologia Original

Como ponto de partida, fez-se necessário analisar os analitos – ácido acetilsalicílico e ácido salicílico – utilizando-se a metodologia analítica farmacopeica, de modo a obter uma métrica dos parâmetros que deveriam ser melhorados ou mantidos com a mesma qualidade que o método registrado. A Figura 20 representa o cromatograma referente ao padrão de AAS e ácido salicílico e a Tabela 9 mostra os parâmetros de *system suitability* avaliados (pratos teóricos, fator de capacidade, resolução e assimetria):



**Figura 20 – Cromatograma referente à metodologia original IF010-00 do AAS.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.**

O cromatograma acima mostra picos bem definidos, com um tempo de corrida suficiente de 10 minutos e tempo de retenção do AAS e do ácido salicílico de 5,8 e 8,1 minutos, respectivamente. Os valores de *suitability* mostram que a cromatografia está satisfatória, com pratos teóricos acima de 2000, indicando boa eficiência da coluna cromatográfica para essa análise, fator de capacidade satisfatório, resolução entre os picos maior que 6, como prevê a farmacopeia brasileira, indicando boa

separação entre os dois picos e assimetria entre 1 e 1,1, que indica que os picos se apresentam simétricos.

**Tabela 9 - Dados de *system suitability* referente à Figura 20.**

DAD-CH1 – 237 nm				
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria
AAS	15786	1,96	8,85	1,07
Ácido Salicílico	19086	3,26	11,90	1,11

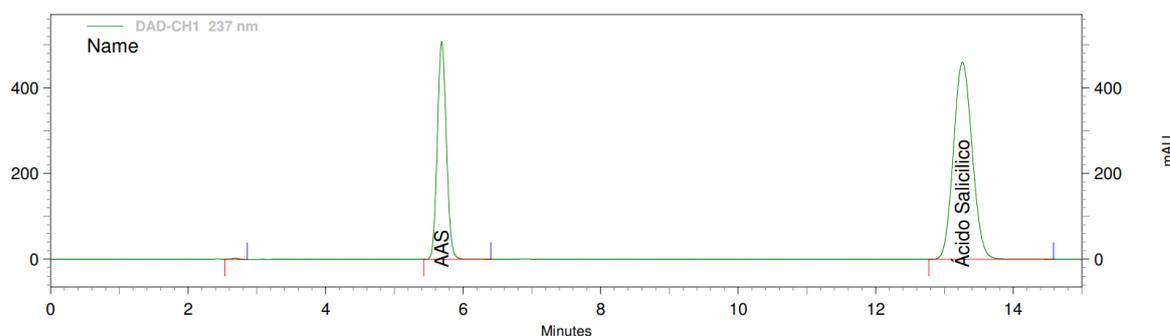
Fonte: Próprio Autor, 2022.

Vale destacar que a metodologia original é passível de uma otimização de tempo de corrida, já que apenas o analito AAS irá ser considerado. Aqui foi realizado um teste inicial considerando o ácido salicílico de forma a medir a qualidade da metodologia registrada. Além disso, como é o principal objetivo deste trabalho, otimizar o método para utilizar solventes verdes.

#### 4.1.2 Transferência para Metodologia com Etanol – Coluna Original

A segunda etapa para desenvolvimento da metodologia seguiu com a transferência do método original tal qual descrito no item 4.1.1. com os mesmos parâmetros e mesma coluna, porém trocando-se a acetonitrila pelo etanol para avaliar o comportamento dos analitos com a mudança do solvente.

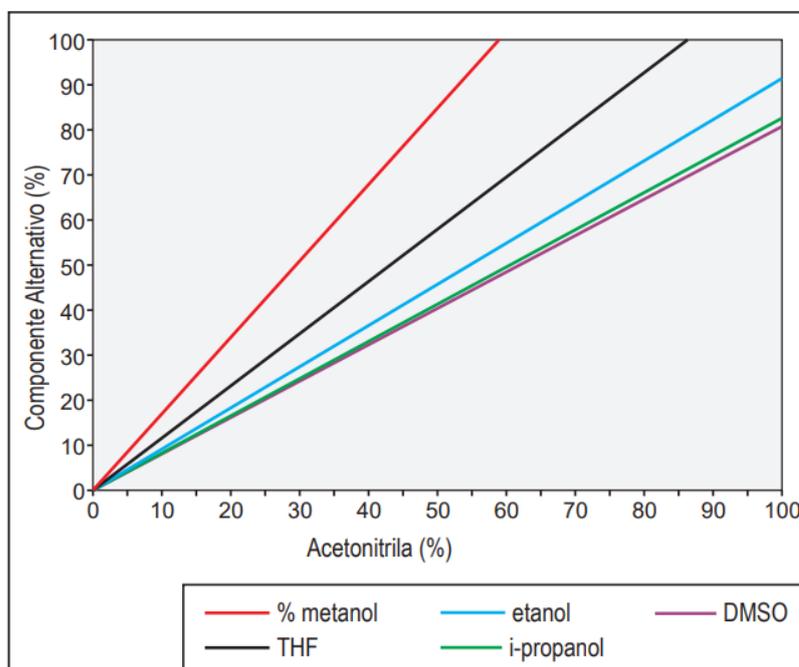
O desafio nessa etapa foi ajustar a composição de etanol de forma que o tempo de retenção do AAS coincidissem com o tempo de retenção do mesmo composto na metodologia original. Além disso, atingir valores satisfatórios para os parâmetros de *system suitability* avaliados. O cromatograma da Figura 21 representa a análise do AAS e do ácido salicílico utilizando 38% de etanol em substituição da acetonitrila.



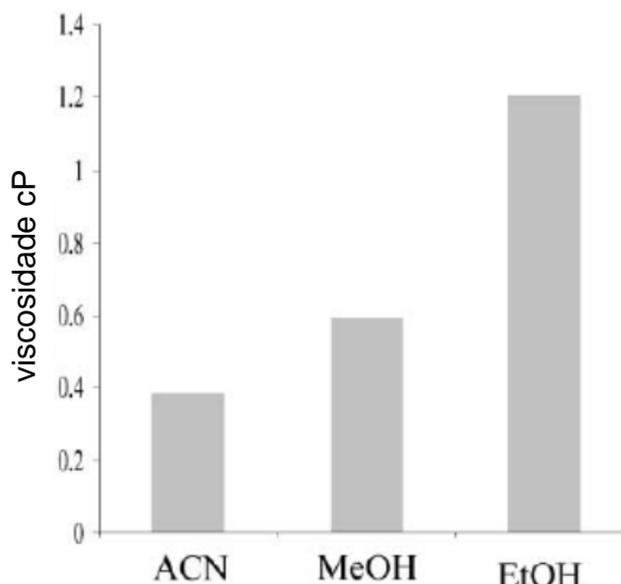
**Figura 21 – Cromatograma referente à análise do AAS com a substituição de ACN por EtOH.**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

Diversas composições foram testadas, porém a interação dos analitos de interesse utilizando-se etanol é diferente da interação com acetonitrila, o que já era esperado, pois o etanol e a acetonitrila possuem características diferentes. Como a metodologia a ser desenvolvida é relacionada ao AAS, então buscou-se coincidir o tempo de retenção deste composto, que com 38% de etanol, teve seu tempo em torno de 5,8 minutos, como na metodologia original.

A composição de acetonitrila utilizada na metodologia original era de 40% e a composição relacionada de etanol foi de 38%, ou seja, uma diferença muito pequena. Esse comportamento já era esperado segundo o normógrafo da Figura 22, que mostra a porcentagem necessária dos principais solventes utilizados em cromatografia líquida para obter-se fases móveis similares àquelas empregando acetonitrila. Um ponto de extrema importância que vale a pena destacar está relacionada à diferença de viscosidade dos solventes, (Figura 23) afetando diretamente a pressão do sistema. Dessa forma, o normógrafo representado na Figura 22 deve ser trabalhado como um guia e não como um resultado final para a substituição das fases, já que outros fatores devem ser avaliados.



**Figura 22 – Normógrafo que relaciona % de ACN x % de solvente alternativo (MeOH, EtOH, THF, DMSO e i-propanol).  
Fonte: Lanças, 2009.**



**Figura 23 - Gráfico de Viscosidade da Acetonitrila, MeOH e EtOH.**  
**Fonte: SKOOG et al., 2009.**

Os parâmetros de *system suitability* também foram avaliados e mostram picos bem definidos, com um tempo de corrida suficiente de 15 minutos e tempo de retenção do AAS e do ácido salicílico de 5,8 e 13,2 minutos, respectivamente. Os valores de *suitability* mostram que a cromatografia está satisfatória, com pratos teóricos acima de 2000, indicando boa eficiência da coluna cromatográfica para essa análise, fator de capacidade satisfatório, resolução entre os picos maior que 6, como prevê a farmacopeia brasileira, indicando boa separação entre os dois picos e assimetria entre 1 e 1,1, que indica que os picos se apresentam simétricos. Os dados estão dispostos na Tabela 10.

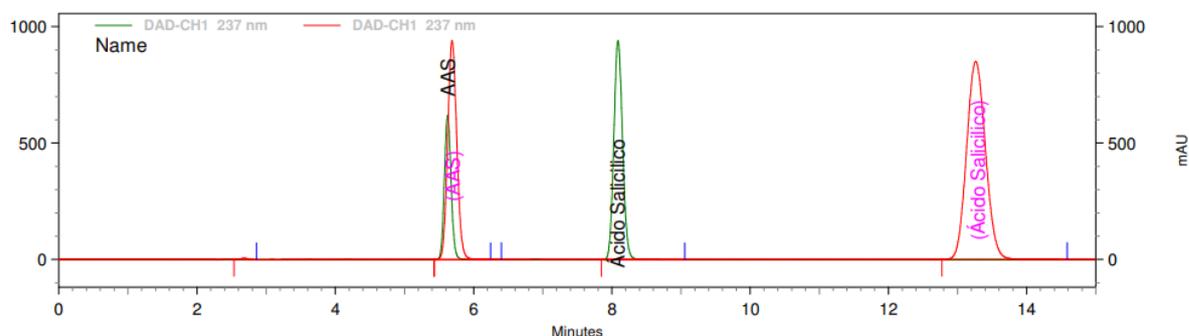
**Tabela 10 - Dados de *system suitability* referente à Figura 21.**

DAD-CH1 – 237 nm				
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria
AAS	8729	1,99	12,73	1,10
Ácido Salicílico	10915	5,98	20,16	1,10

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Comparando-se os valores obtidos entre as análises com acetonitrila e etanol, nota-se uma diminuição de pratos teóricos para a cromatografia com solvente verde (viscosidade da acetonitrila 0,34 cP) A explicação para isso é viscosidade elevada do

etanol (1,11 cP) promove uma menor transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, ocasionando perda de pratos teóricos.



**Figura 24 – Sobreposição dos Cromatogramas Metodologia Original (Verde) e com EtOH (vermelho).**

Fonte: Próprio Autor, 2022.

#### 4.1.3 Aceleração da Metodologia – Coluna de Núcleo Rígido

Com a composição de etanol ajustada na coluna original da metodologia farmacopeica, seguiram-se os testes de forma a acelerar o método analítico utilizando colunas com novas tecnologias. A primeira aposta foi utilizar uma coluna de núcleo rígido com um tamanho de partícula menor (2,7  $\mu\text{m}$ ), esperando-se ter uma melhor resolução e assimetria dos picos, além da diminuição do tempo de análise.

A variação do tempo de retenção de um analito em função do tamanho das partículas da fase estacionária, mantendo-se os demais parâmetros fixos, é dada pela Equação 14.

$$t_r = \frac{(1+k)Nh}{D_m \cdot \mu} dp^2 \quad (14)$$

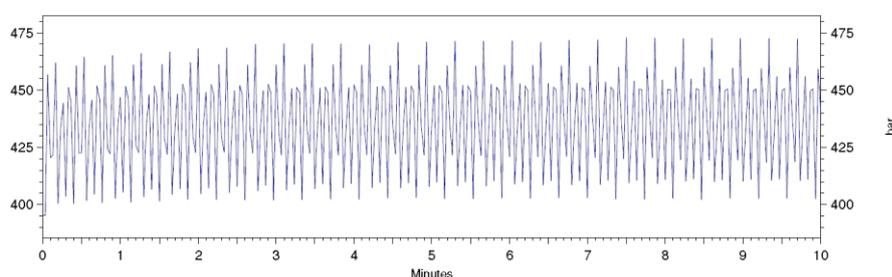
Onde  $t_r$  é o tempo de retenção,  $k$  é o fator de retenção,  $N$  é o número de pratos,  $h$  é a altura de um prato,  $D_m$  é a difusão do analito na fase móvel,  $\mu$  é a velocidade linear da fase móvel e  $dp$  é o tamanho de partícula da fase estacionária.

Observa-se que o  $t_r$  e, portanto o tempo de análise, diminuirá com o quadrado do tamanho das partículas. Com isso, é fato a mudança no tempo de retenção em decorrência da diminuição do tamanho de partícula. Entretanto, essa diminuição de partícula acarreta um aumento na pressão do sistema:

$$\Delta P = \frac{\phi L \eta}{100 dp^2} \quad (15)$$

Onde  $\Delta P$  é a variação da pressão na coluna (entrada e saída), também conhecida como queda da pressão na coluna. A maneira ideal encontrada para balancear todos estes parâmetros foi diminuir-se o tamanho das partículas ( $d_p$ ) e do comprimento da coluna ( $L$ ), mantendo-se as pressões dentro de valores razoáveis e obtendo-se análises mais rápidas e com menor consumo de solventes.

Além da diminuição do tamanho de partícula naturalmente ocasionar um aumento de pressão do sistema, o uso do etanol como solvente evidenciou ainda mais esse aumento de pressão, mantendo uma pressão de trabalho entre 400 e 500 bar, demonstrado na Figura 25.

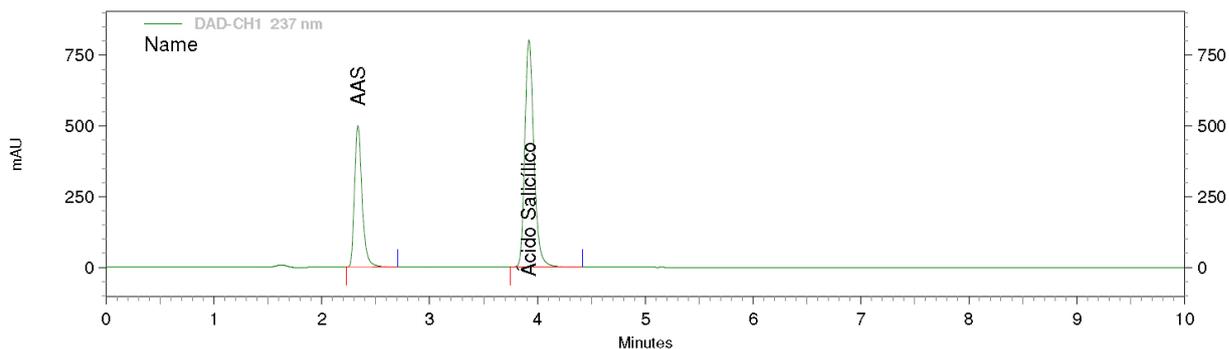


**Figura 25 – Gráfico do acompanhamento de pressão durante a análise com coluna de núcleo rígido.**

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Devido à maior viscosidade do etanol, a pressão de trabalho elevou-se a um ponto que operava próximo ao limite operacional do equipamento. A formação de ligações de hidrogênio, seja com a água, com o etanol ou com a própria sílica da fase móvel, faz com que ocorra um aumento muito elevado da viscosidade.

A Figura 26 mostra o cromatograma da análise utilizando-se uma coluna de núcleo rígido. Os picos apresentaram valores de *system* satisfatórios, apenas os valores de assimetria ligeiramente fora do critério de aceitação, em torno de 2,1 (Tabela 11).



**Figura 26 – Cromatograma do AAS utilizando coluna de núcleo rígido.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.**

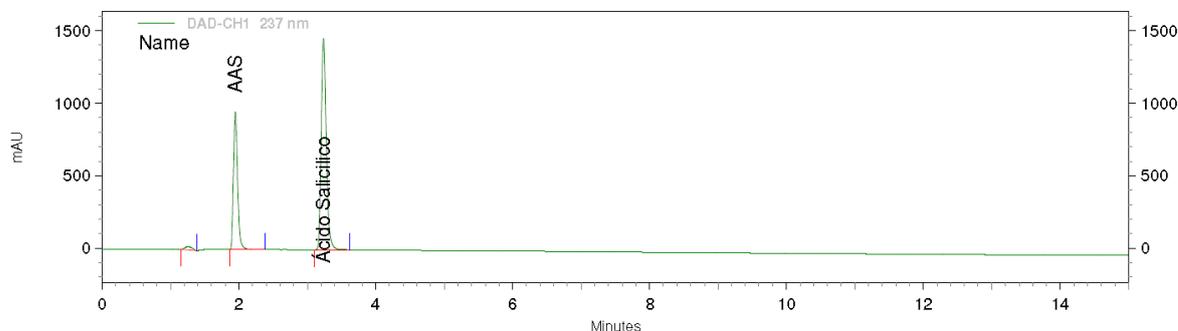
**Tabela 11 - Dados de *system suitability* referente à Figura 26.**

DAD-CH1 – 237 nm				
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria
AAS	7392	0,60	4,93	2,04
Ácido Salicílico	10231	1,55	11,01	2,00

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Na tentativa de manter a qualidade da cromatografia, mas diminuir a pressão do sistema, utilizou-se a abordagem de aumento de temperatura do forno para diminuição da viscosidade da fase móvel e, conseqüentemente, diminuição da pressão de trabalho.

Com isso, para o teste seguinte, a temperatura do forno foi elevada até 45°C e avaliados os resultados, como mostra a Figura 27.



**Figura 27 – Cromatograma do AAS utilizando coluna de núcleo rígido à 45°C.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.**

O resultado foi uma cromatografia com tempo de corrida mais curto, picos mais finos e pressão mais baixa, em torno de 280 bar. Com relação aos parâmetros de *system suitability*, todos os parâmetros se apresentaram dentro do esperado (Tabela 12). Os valores de assimetria ficaram em torno de 1,2, porém ainda dentro dos critérios especificados pela farmacopeia brasileira.

**Tabela 12 - Dados de *system suitability* referente à Figura 27.**

DAD-CH1 – 237 nm				
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria
AAS	5160	0,62	4,66	1,26
Ácido Salicílico	9339	1,69	10,62	1,29

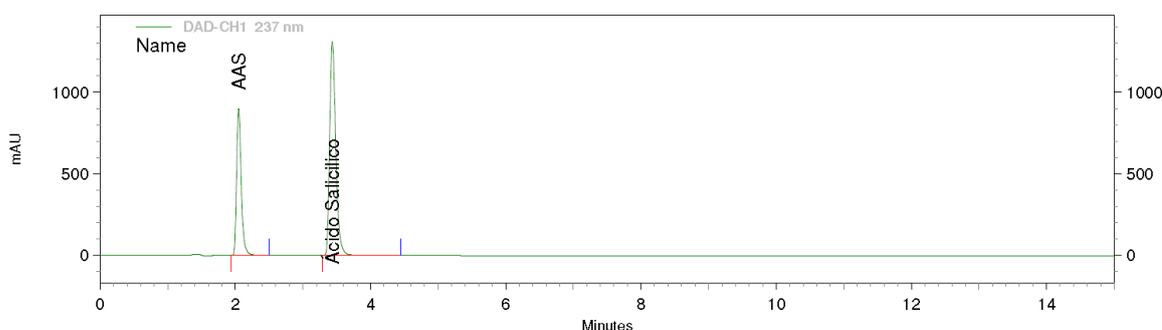
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Como o intuito desse trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia o mais sustentável possível e, apesar dos resultados com a coluna de núcleo rígido utilizando temperatura terem sido satisfatórios, seguiu-se com um teste subsequente trabalhando-se com colunas cromatográficas de bloco monolítico.

#### 4.1.4 Aceleração da Metodologia – Coluna de Bloco Monolítico

Devido à estrutura e o processo inovador de fabricação das colunas de bloco monolítico, era esperada uma alta eficiência das análises, podendo-se trabalhar com fluxos maiores em baixa pressão, acelerando o tempo de corrida.

Dessa forma, realizou-se a análise utilizando 38% de etanol como já definido anteriormente e avaliou-se o cromatograma e seus parâmetros de *system suitability* (Figura 28).



**Figura 28 – Cromatograma do AAS utilizando colunas de bloco monolítico.**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

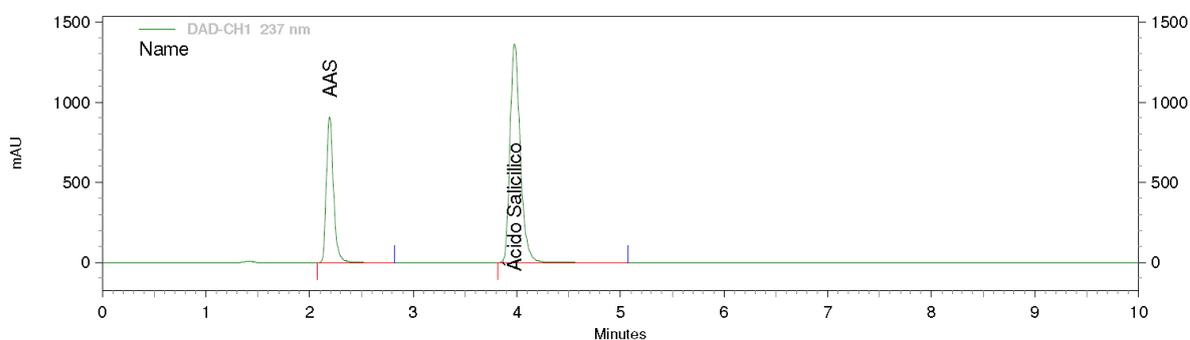
O resultado foi uma cromatografia com tempo de corrida mais curto, picos mais finos e pressão mais baixa, em torno de 90 bar. Com relação aos parâmetros de *system suitability*, também se apresentaram satisfatórios (Tabela 13). A assimetria variou entre 1,2 e cerca de 1,4, porém ainda dentro dos critérios especificados pela farmacopeia brasileira de 2,0 de assimetria.

**Tabela 13 - Dados de *system suitability* referente à Figura 28.**

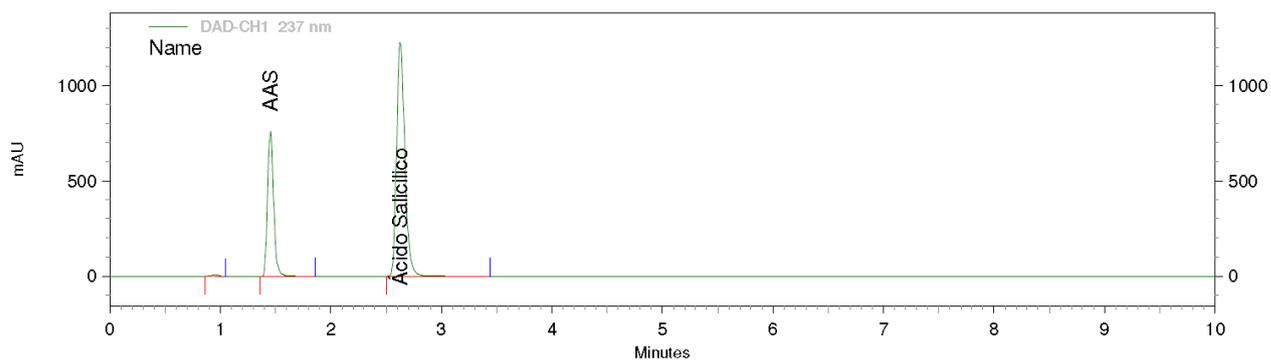
DAD-CH1 – 237 nm					
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria	
AAS	4544	0,42	0,00	1,27	
Ácido Salicílico	7290	1,37	9,76	1,37	

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

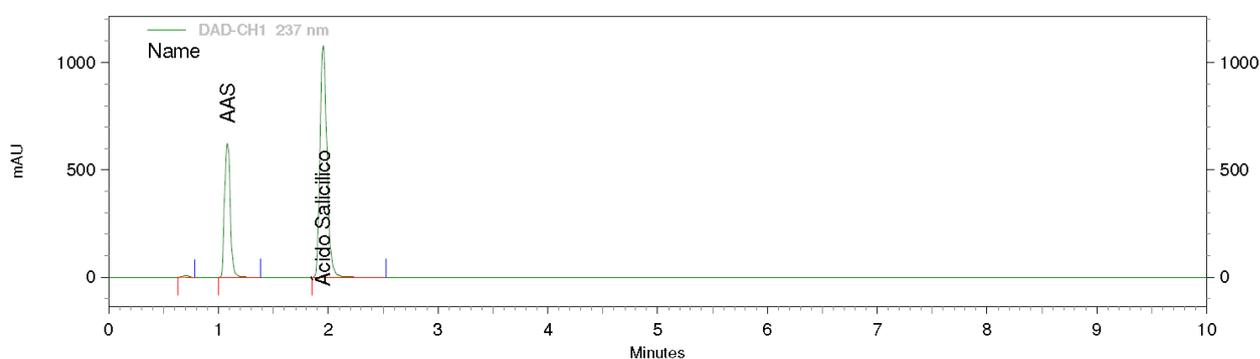
Na tentativa de acelerar ainda mais a metodologia desenvolvida, realizou-se um ensaio com variação de fluxos: 1 mL.min<sup>-1</sup>, 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, 2 mL.min<sup>-1</sup> e 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas desses testes estão dispostos nas Figuras 29 a 32 com os fluxos citados, respectivamente:



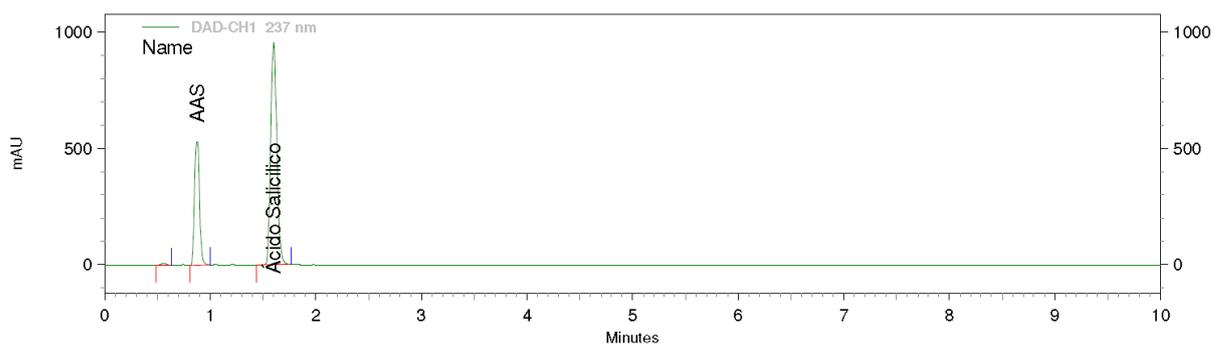
**Figura 29 – Ensaio de Fluxo 1 mL.min<sup>-1</sup>**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**



**Figura 30 - Ensaio de Fluxo 1,5 mL.min<sup>-1</sup>**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 31 - Ensaio de Fluxo 2 mL.min<sup>-1</sup>**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 32 - Ensaio de Fluxo 2,5 mL.min<sup>-1</sup>**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

Avaliando-se os parâmetros de *system* para o ensaio realizado com fluxos, todos os valores se apresentaram satisfatórios, porém ao avaliar o tempo de análise, os fluxos de 2 e 2,5 mL.min<sup>-1</sup> obviamente apresentaram corridas mais curtas (Tabela 14).

Tabela 14 - Dados de *system suitability* referente à Figura 31.

DAD-CH1 – 237 nm					
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria	
AAS	2285	0,80	3,66	1,19	
Ácido Salicílico	4494	2,26	8,44	1,24	

Fonte: Próprio Autor, 2022.

A faixa de fluxo ótimo para as colunas de bloco monolítico é bem extensa, como mostra a curva de Van Deemter na Figura 33. Mesmo com o aumento de fluxo, o fator de capacidade se mantém devido à ampla faixa de equilíbrio, comparado às colunas particuladas comuns.

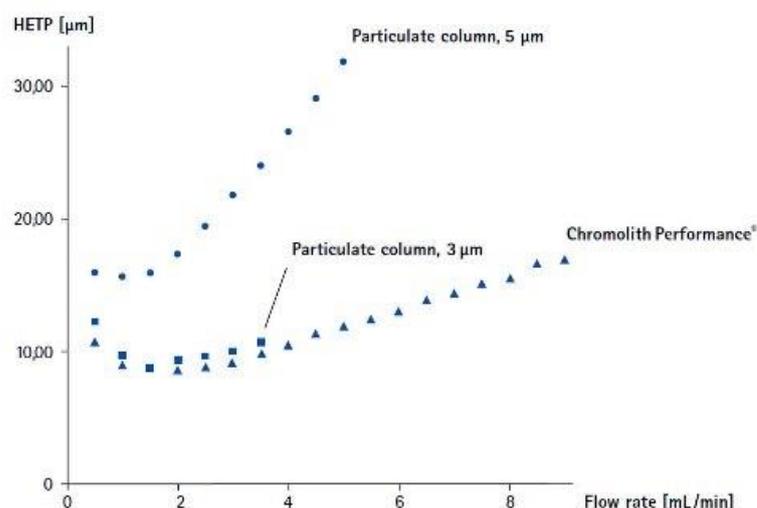
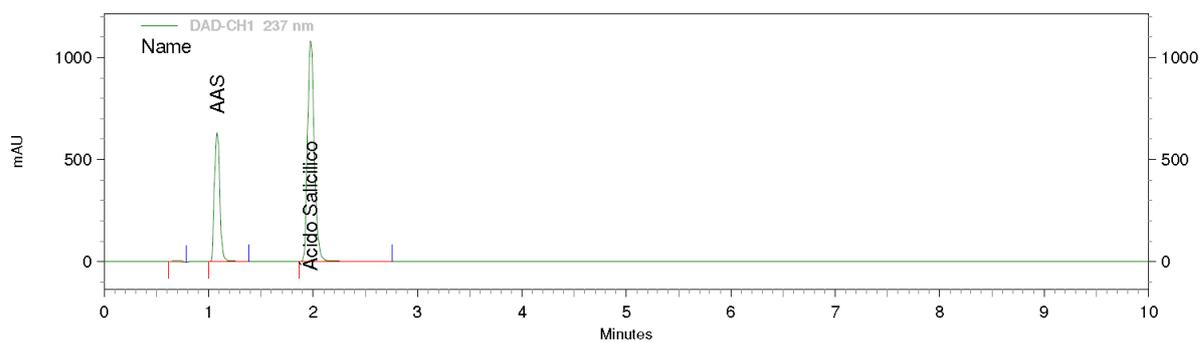
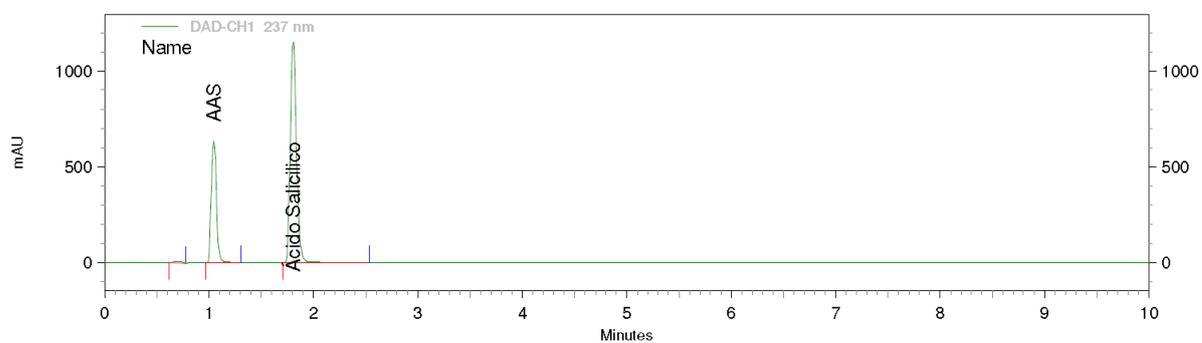


Figura 33 – Curva de Van Deemter bloco monolítico versus colunas particuladas  
Fonte: Merck, 2022.

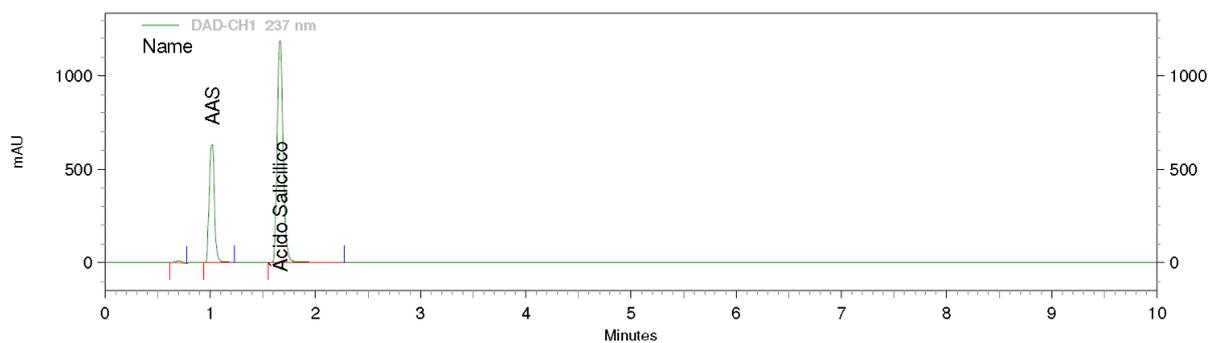
Após o ensaio de fluxo, de forma complementar, realizou-se um ensaio de temperatura, testando-se 25°C, 30°C, 35°C e 40°C, mantendo o fluxo ótimo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados dos testes desse ensaio estão demonstrados nos cromatogramas apresentados nas Figuras 34 a 37 e os dados de *system suitability* estão dispostos na Tabela 15.



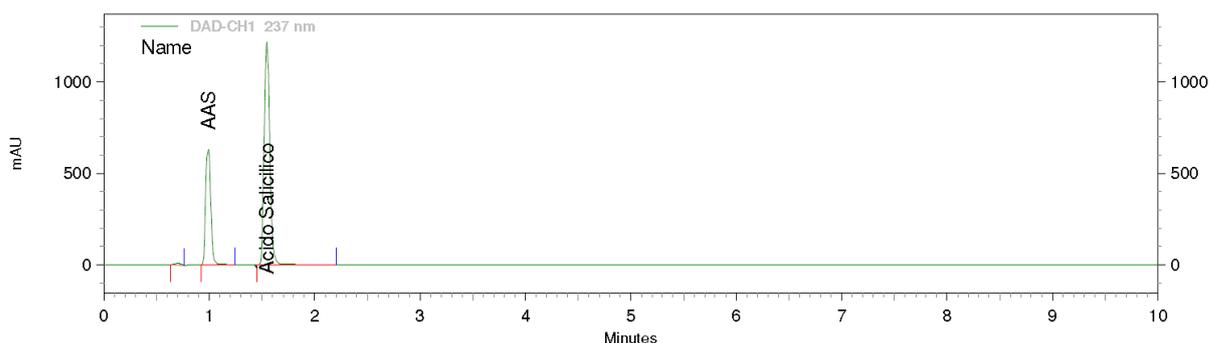
**Figura 34 – Ensaio de Temperatura 25°C**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 35 - Ensaio de Temperatura 30°C**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 36 - Ensaio de Temperatura 35°C**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 37 - Ensaio de Temperatura 40°C**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

**Tabela 15 - Dados de *system suitability* referente à Figura 35.**

DAD-CH1 – 237 nm				
Ativo	Pratos teóricos	Fator de Capacidade	Resolução	Assimetria
AAS	2237	0,50	3,35	1,10
Ácido Salicílico	4367	1,58	7,68	1,17

**Fonte: Próprio Autor, 2022**

Mantendo a abordagem de desenvolvimento de uma metodologia mais sustentável possível, seguiu-se com a temperatura de 30°C, já que o ganho com aumento de temperatura não foi tão evidente ao ponto de optar por trabalhar com temperatura. Além disso, houve uma melhora nos dados de assimetria.

Com isso, a metodologia final otimizada para a quantificação de teor de ácido acetilsalicílico em Aspirina® está descrita na Tabela 16.

**Tabela 16 – Parâmetros Metodologia Desenvolvida.**

Parâmetro	Configuração
<b>Comprimento de Onda</b>	237 nm
<b>Temperatura do Forno</b>	30°C
<b>Fluxo de Fase Móvel</b>	2 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Composição da Fase Móvel</b>	EtOH:H <sub>2</sub> O/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 380:620:2
<b>Volume de Injeção</b>	10 µL
<b>Tempo de Corrida</b>	3,5 min
<b>Coluna</b>	Chromolith High Resolution RP-18 100x4,6mm

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

## 4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA OTIMIZADA

### 4.2.1 Seletividade

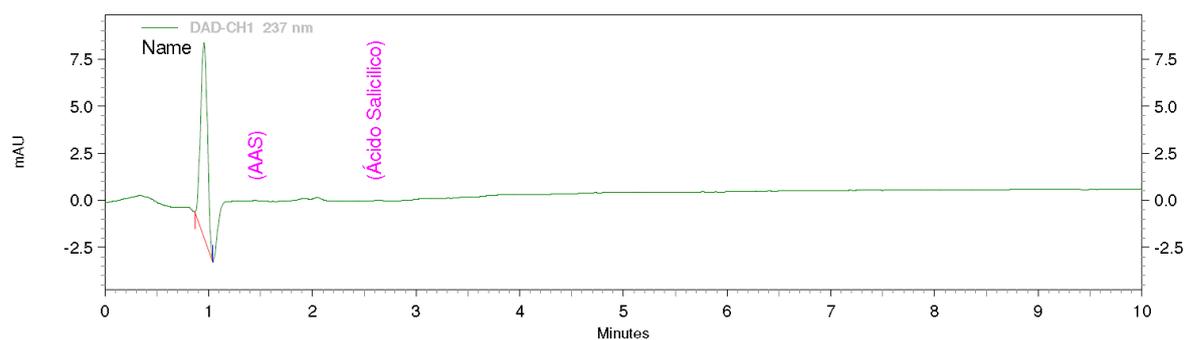
O primeiro critério avaliado na validação foi a seletividade do método. Este parâmetro foi provado através da comparação dos cromatogramas do AAS e ácido salicílico, da mistura de solventes utilizados na análise e do Parateck® SI 200 como placebo, na qual nenhuma interferência foi observada conforme as Figuras 38 a 41. Após avaliação dos cromatogramas, pode-se inferir que a metodologia analítica desenvolvida é seletiva, já que não houve nenhuma interferência das fases móveis e do placebo nos mesmos tempos de retenção dos analitos.

O Parateck® SI 200 é um produto que age como um excipiente para combinar muitos ingredientes em uma formulação de comprimido. Possui propriedades muito semelhantes ao placebo de fármacos, com alta capacidade para compressão direta, alta capacidade de diluição e adsorção e baixa higroscopicidade. Com superfície porosa, permite misturas de pós mais homogêneas e uniformes. Muitos comprimidos são feitos com Parateck® SI 200, onde apresentam uma absorção de água muito mais lenta do que os comprimidos feitos com outros tipos de excipientes. Dessa forma, o Parateck® SI 200 se apresenta muito bem como um similar do placebo da Aspirina® (Tabela 17).

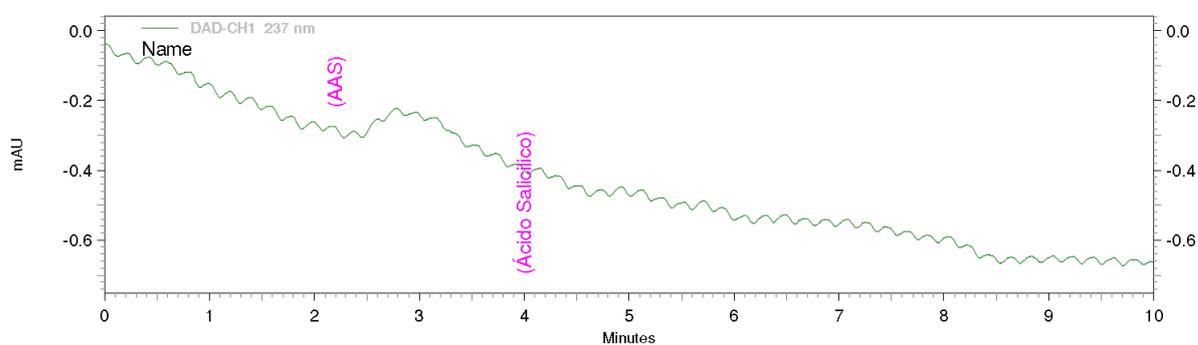
**Tabela 17 - Propriedades Parateck® SI 200**

Fórmula Molecular	$C_6H_{14}O_6$
Estado Físico	Sólido
Cor	Incolor
Solubilidade em água	$182 \text{ g.L}^{-1}$
Densidade	$1,49 \text{ g.cm}^{-3}$
pH	5-7 em $182 \text{ g.L}^{-1}$

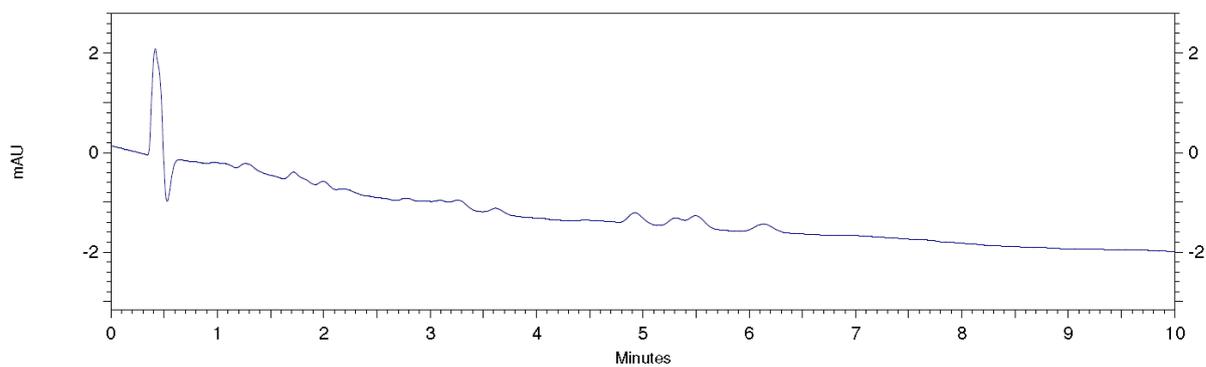
Fonte: Ficha de Segurança do Parateck® SI 200, Merck – 2022.



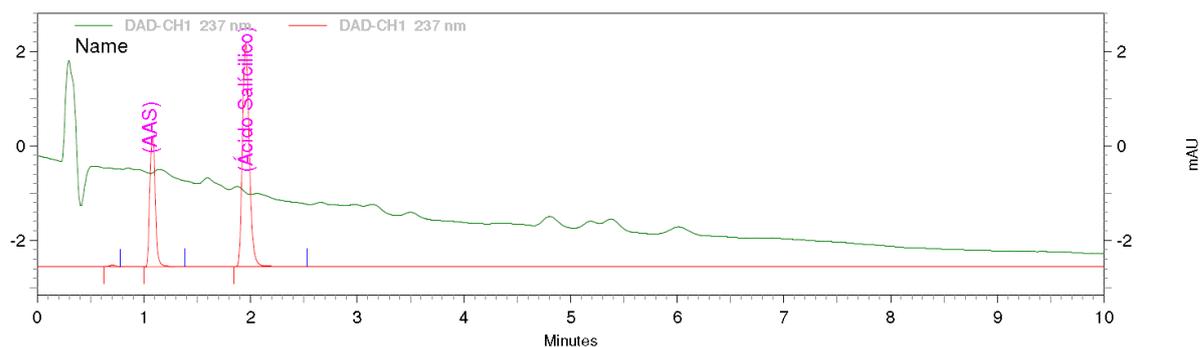
**Figura 38 – Cromatograma da Fase Móvel EtOH:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 38:62:2**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 39 – Cromatograma Branco Etanol**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



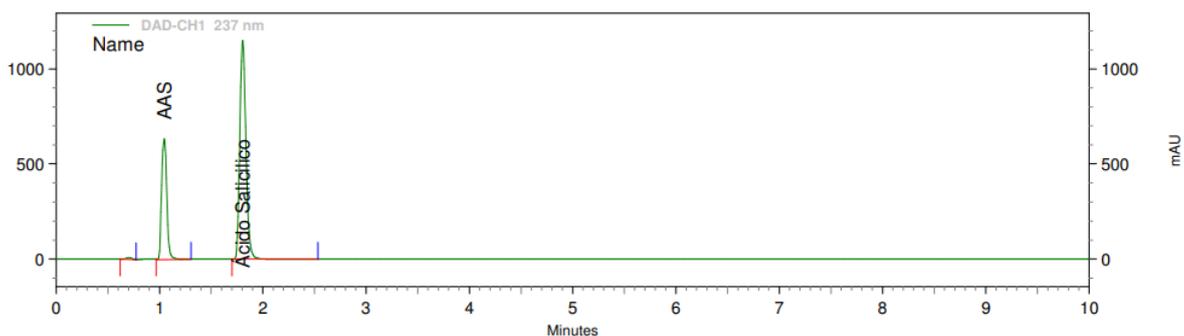
**Figura 40 – Cromatograma Parteck® SI 200**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 41 – Sobreposição dos Cromatogramas do Parateck® SI 200 e Padrão**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

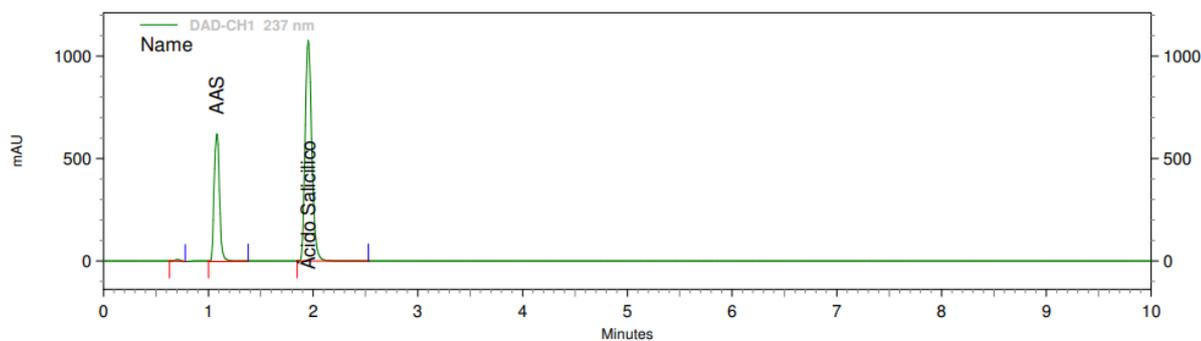
Com relação aos testes de estresse, os resultados obtidos estão descritos:

- Alta temperatura (35°C): não houveram mudanças no cromatograma da solução padrão após 48 horas em estufa (Figura 42).



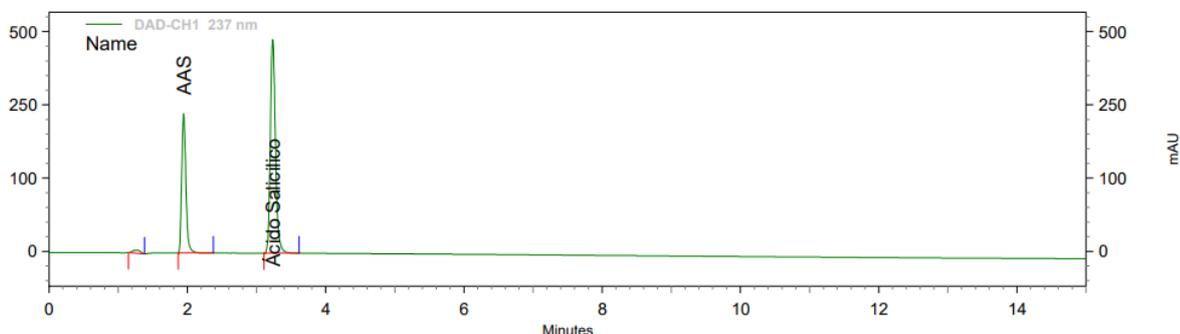
**Figura 42 – Cromatograma Teste de Estresse – Alta Temperatura**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

- Meio ácido: não houveram mudanças no cromatograma da solução padrão após ser contaminada com ácido (Figura 43).



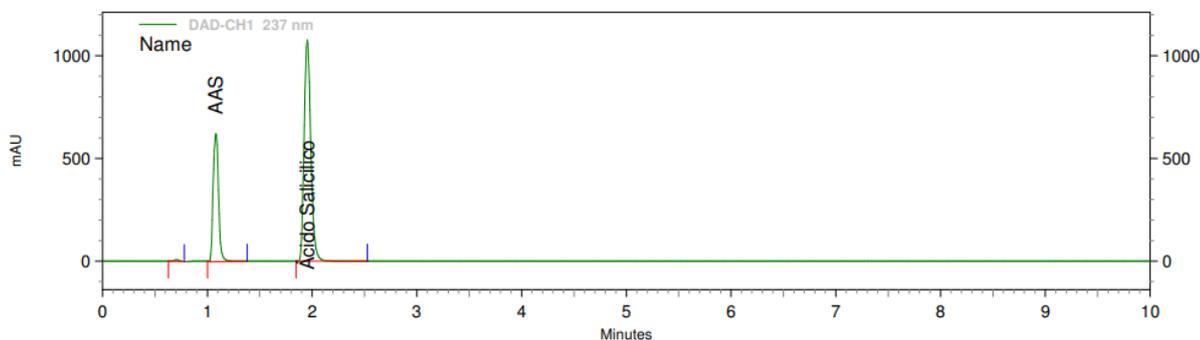
**Figura 43 - Cromatograma Teste de Estresse – Meio Ácido**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

- Meio básico: a cromatografia da solução padrão após contaminação com base apresentou uma perda de intensidade e perda de assimetria (Figura 44).



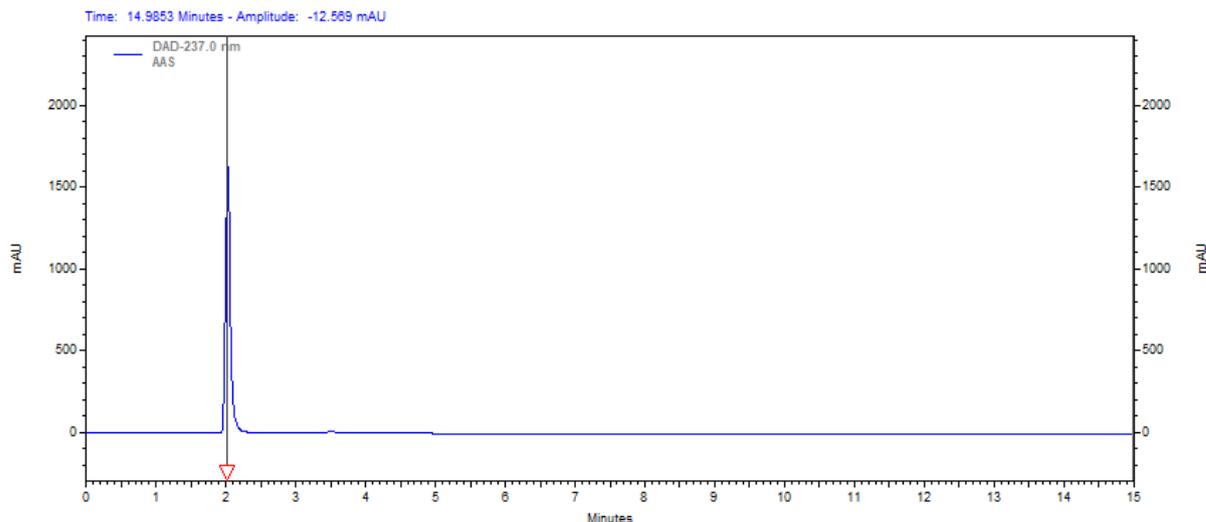
**Figura 44 - Cromatograma Teste de Estresse – Meio Básico**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

- Luz ultravioleta: não houveram mudanças no cromatograma da solução padrão após ter sido submetida à luz ultravioleta (Figura 45).



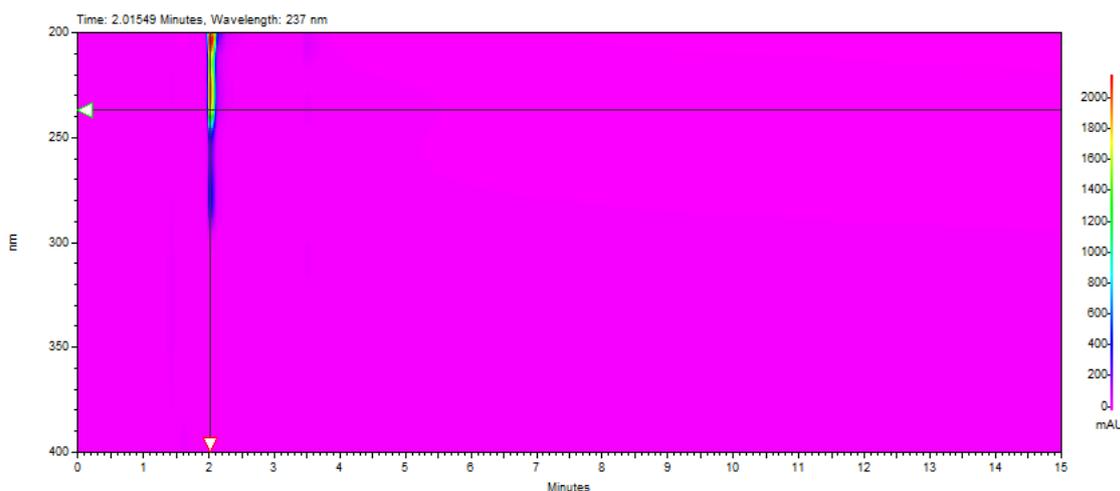
**Figura 45 - Cromatograma Teste de Estresse – Luz UV**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

Com relação à escolha do comprimento de onda trabalhado (237 nm), fez-se uma análise espectral de forma a confirmar a adequabilidade deste comprimento de onda. Inicialmente, ajustou-se o cursor do eixo x no tempo de retenção do pico do ácido acetilsalicílico, como mostra a Figura 46.



**Figura 46 - Ajuste do cursor sobre o pico do AAS.**

Com o cursor ajustado no eixo x, seguiu-se com o ajuste do cursor do eixo y em 237 nm para avaliação do espectro, como mostra a Figura 47.



**Figura 47 - Ajuste do cursor no eixo y - 237 nm**

A Figura 48 mostra o espectro de absorção do ácido acetilsalicílico. Em 227 nm é o ápice da absorção, porém o comprimento de onda em 237 nm ainda apresenta uma absorção adequada para a análise.

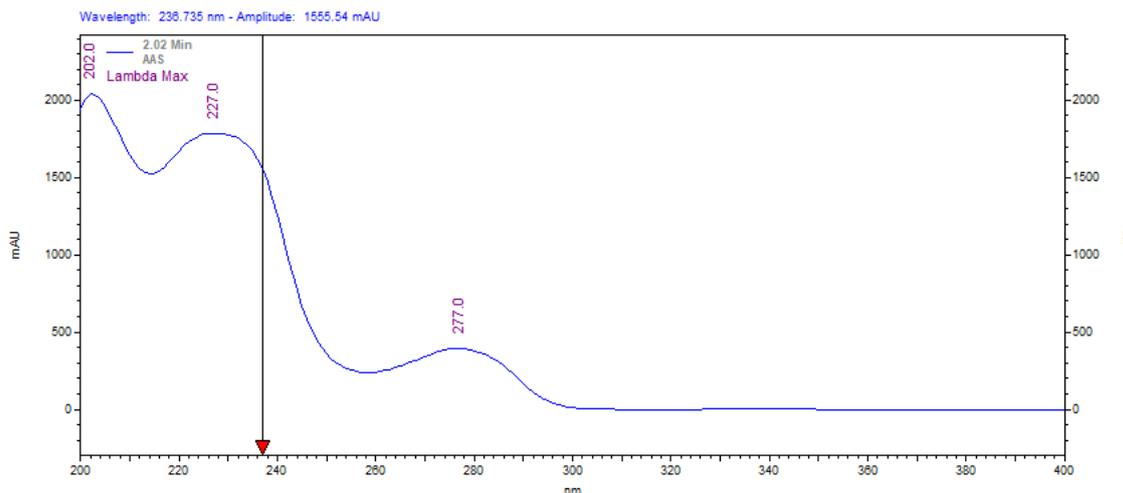


Figura 48 - Análise Espectral AAS

#### 4.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada em triplicata em cinco pontos de concentração, contemplando a faixa de 80% a 120% da concentração nominal do analito de interesse (ácido acetilsalicílico). Na Tabela 18 estão especificadas as pesagens e áreas referentes a cada nível de concentração do ácido acetilsalicílico. Os dados de massa corrigida correspondem à massa pesada de cada analito corrigida com a pureza. A Figura 49 mostra a curva de calibração para o ingrediente ativo estudado. Já a Figura 50 mostra o gráfico de resíduos da linearidade do AAS.

Tabela 18 – Dados da Curva de Linearidade AAS.

Nível de Concentração	Massa (mg)	Massa corrigida (mg)	Área [mAu*s]	CV (%)	Área Média [mAu*s]
80%	8,21	<b>8,20</b>	55,918	0,8	<b>55,20</b>
400 mg/comp			55,110		
			55,207		
90%	9,33	<b>9,32</b>	61,914	0,3	<b>62,18</b>
450 mg/comp			62,176		
			62,345		
			69,564		
100%	10,38	<b>10,37</b>	69,564	0,6	<b>69,60</b>
500 mg/comp			69,012		
			69,767		
			74,005		

110%	11,02	<b>11,01</b>	74,099	0,1	<b>74,10</b>
550 mg/comp			74,198		
120%	12,57	<b>12,56</b>	82,934	0,6	<b>82,91</b>
600 mg/comp			82,866		
			82,031		

Fonte: Próprio Autor, 2022.

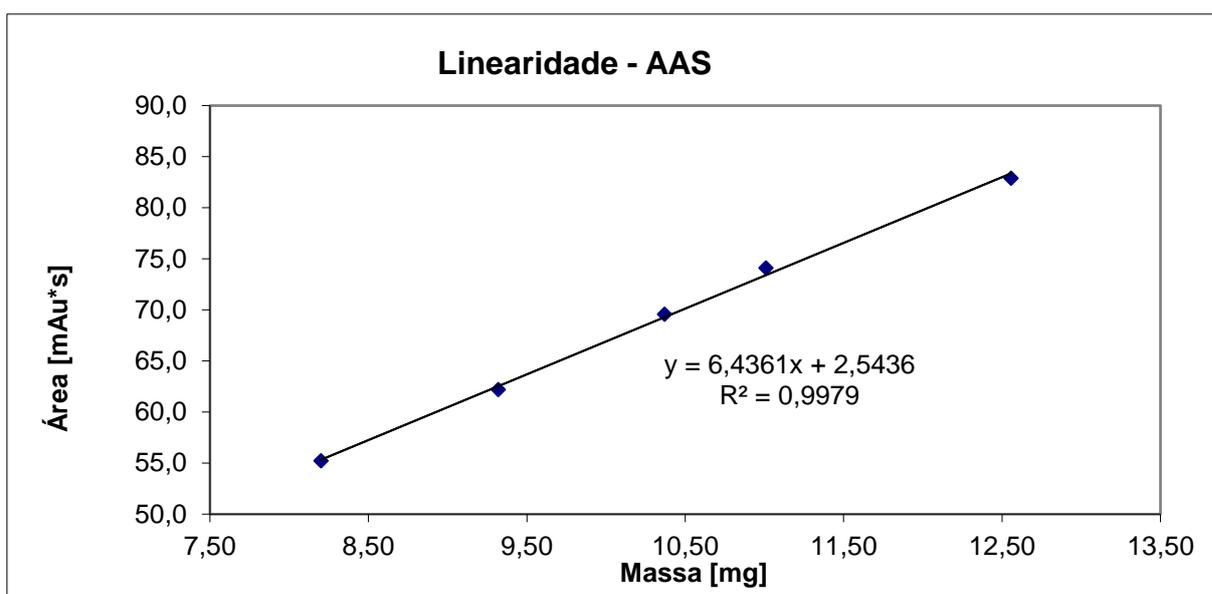
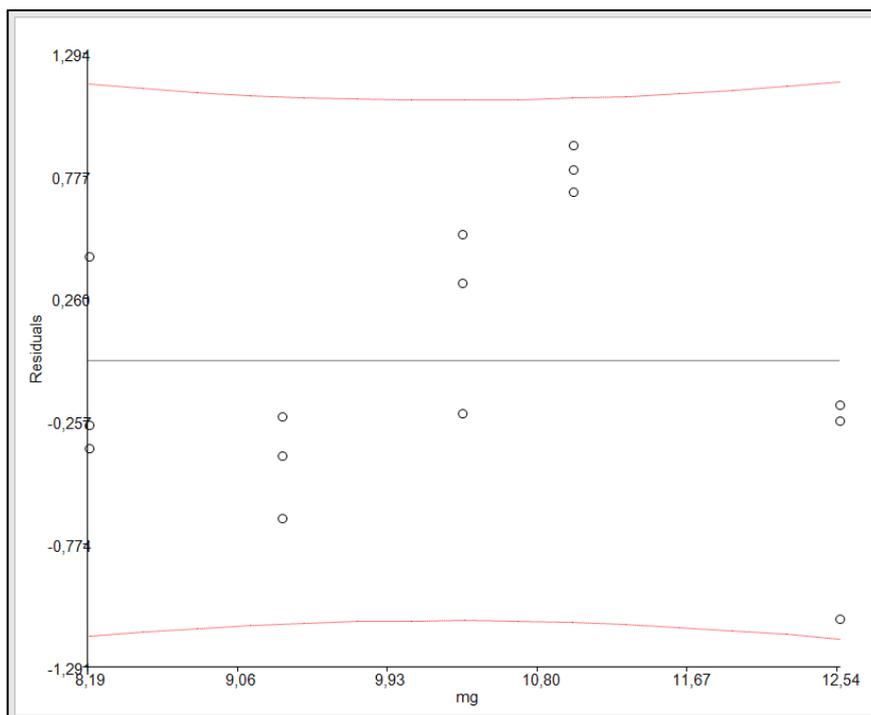


Figura 49 – Curva de Calibração AAS.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.



**Figura 50 – Gráfico de Resíduos da Linearidade AAS/  
Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Após avaliação estatística, a curva de calibração para o AAS se apresentou linear, analisando-se as soluções padrão em cinco níveis de concentração. A Figura 49 mostra o comportamento linear da curva, indicada pelo coeficiente de correlação calculado de 0,998. Como o coeficiente de correlação é maior que 0,99, que é o exigido pela RDC n°166, pode-se inferir que o método é linear, ou seja, a área encontrada do AAS é diretamente proporcional à massa pesada. Dessa forma, o parâmetro linearidade está dentro dos critérios de aceitação determinados pela norma utilizada.

Ademais, plotou-se os gráficos de resíduos da linearidade, que permite avaliar a variância da metodologia desenvolvida, ou seja, avalia se uma determinada reta de regressão estimada explica satisfatoriamente a relação existente entre a concentração e o sinal. Essa avaliação foi realizada de forma mais qualitativa e visual, observando-se se, no gráfico plotado (Figura 50) era possível notar um comportamento tendencioso dos pontos. Os gráficos de resíduos apresentaram uma distribuição aleatória dos pontos, não apresentando um padrão, que significa que o modelo é representativo dos dados avaliados, ou seja, a calibração se mostra homocedástica.

The image shows two side-by-side statistical test result panels. The left panel is titled 'F1 Fisher test' and contains the following data: Confidence level (95,00), degrees of freedom 1 (1), degrees of freedom 2 (13), F table (4,670), and F1 calc. (3617,356). The right panel is titled 'Y intercept' and contains: Confidence level (95,00), degrees of freedom (13), t table (1,771), and t calc. (0,610). Both panels have a green bar at the bottom with a checked radio button for 'Satisfactory' and an unchecked radio button for 'Not satisfactory'.

**Figura 51 – Teste de Fisher e de intercepto**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Os testes F e do intercepto foram satisfatórios, como mostra a Figura 51, indicando que os valores são significativos e que a linha ajustada cruza o eixo y.

#### 4.2.3 Precisão Repetibilidade

Os ensaios de repetibilidade foram realizados como descrito: 6 pesagens da amostra seguindo o mesmo preparo, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento e no mesmo dia. A Tabela 19 mostra as massas pesadas e as respectivas áreas encontradas. A avaliação dos resultados foi demonstrada pela dispersão dos dados, calculando-se o desvio padrão relativo.

**Tabela 19 – Dados Repetibilidade.**

Repetibilidade	Massa (mg)	Área [mAu*s]	DPR (%)
REP 1	10,15	69,887	<b>0,08</b>
		69,987	
		69,990	
REP 2	10,01	69,732	<b>0,17</b>
		69,675	

		69,908	
REP 3	10,65	70,098	
		70,022	<b>0,08</b>
		70,135	
REP 4	9,99	69,543	
		69,698	<b>0,19</b>
		69,431	
REP 5	10,21	69,952	
		70,001	<b>0,83</b>
		70,982	
REP 6	10,09	69,854	
		69,770	<b>0,08</b>
		69,871	

Fonte: Próprio Autor, 2022.

A Figura 52 mostra o coeficiente de variação de 0,36 entre as seis repetições e se demonstrou satisfatória, sendo aprovada para validação.

Mean		Precision	
No. values	18	number of series	6
Confidence level	95,00	Inter-series variance	4,75182e-02
degrees of freedom	17	<b>Variance of</b>	
t table	1,740	repeatability	6,33364e-02
Mean	69,919	intermediate precision	1,10855e-01
Interval	0,137	<b>Coefficient of Variation of</b>	
Interval(%)	0,20	repeatability (spec.)	1,00
		intermediate precision (spec.)	2,00
		repeatability	0,36
		intermediate precision	0,48
		<input checked="" type="radio"/> Satisfactory <input type="radio"/> Not satisfactory	

Figura 52 – Avaliação da Repetibilidade Neolicy®  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

#### 4.2.4 Precisão Reprodutibilidade

Os ensaios de reprodutibilidade foram realizados como descrito: 6 pesagens da amostra seguindo o mesmo preparo, mesmo procedimento, mudando-se o

analista, o equipamento e o dia de análise. A Tabela 20 mostra as massas pesadas e as respectivas áreas encontradas. A avaliação dos resultados foi demonstrada pela dispersão dos dados, calculando-se o desvio padrão relativo.

**Tabela 20 – Dados Reprodutibilidade.**

Repetibilidade	Massa (mg)	Área [mAu*s]	DPR (%)
REP 1	10,71	69,887	<b>0,08</b>
		69,987	
REP 2	10,26	69,990	<b>0,17</b>
		69,732	
		69,675	
REP 3	10,09	69,908	<b>0,08</b>
		70,098	
		70,022	
REP 4	10,13	70,135	<b>0,19</b>
		69,543	
		69,698	
REP 5	10,18	69,431	<b>0,83</b>
		69,952	
		70,001	
REP 6	10,22	70,982	<b>0,08</b>
		69,854	
		69,770	
		69,871	

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

A Figura 53 mostra o coeficiente de variação de 0,55 entre as seis repetições e se demonstrou satisfatória, sendo aprovada para validação.

Mean		Precision	
No. values	18	number of series	6
Confidence level	95,00	Inter-series variance	7,51828e-02
degrees of freedom	17	<b>Variance of</b>	
t table	1,740	repeatability	7,10183e-02
Mean	69,945	intermediate precision	1,46201e-01
Interval	0,157	<b>Coefficient of Variation of</b>	
Interval(%)	0,22	repeatability (spec.)	1,00
		intermediate precision (spec.)	2,00
		repeatability	0,38
		intermediate precision	0,55
		<input checked="" type="radio"/> Satisfactory <input type="radio"/> Not satisfactory	

**Figura 53 – Avaliação da Reprodutibilidade Neolicy®**  
**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

#### 4.2.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados diretamente via software OpenLab® e os valores encontrados estão descritos na Tabela 21:

**Tabela 21 - Valores de LOD e LOQ.**

DAD-CH1 – 237 nm		
Ativo	LOD (mg.mL <sup>-1</sup> )	LOQ LOD (mg.mL <sup>-1</sup> )
AAS	0,04	0,52

**Fonte: Próprio Autor, 2022.**

## 4.2.6 Exatidão

Tabela 22 – Dados de Exatidão.

Recuperação	Fortificação	Massa corrigida (mg)	Áreas [mAu*s]	Áreas Médias [mAu*s]	Massa encontrada (mg)	Recuperação (%)	DPR %
REC 1		8,13	55,143 54,997	55,0	8,16	100,31%	
REC 2	80% (400 mg/comprimido)	8,20	55,032 55,468 55,789	55,5	8,22	100,28%	0,50
REC 3		8,04	55,121 54,897 54,821	54,9	8,13	101,17%	
REC 4		10,15	54,902 69,345 69,876	69,4	10,38	102,29%	
REC 5	100% (500 mg/comprimido)	10,33	69,363 69,879 69,056	69,6	10,42	100,91%	0,68
REC 6		10,27	69,631 69,999 69,346	69,7	10,43	101,56%	
REC 7		12,61	69,671 82,345 82,201	82,2	12,38	98,19%	
REC 8	120% (600 mg/comprimido)	12,65	82,236 83,001 83,111	83,0	12,50	98,82%	1,04
REC 9		12,32	82,999 82,001 82,111	82,0	12,35	100,21%	
			81,999				

Fonte: Próprio Autor, 2022.

O ensaio de recuperação está relacionado com a exatidão da metodologia analítica desenvolvida. Esse parâmetro reflete a quantidade do analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra.

Como descrito no item 3.2.2.6, nesse caso, utilizou-se como placebo o Pardeck® SI 200 e realizaram-se 9 pesagens fortificando-se em três níveis diferentes de concentração: 80%, 100% e 120%, 3 pesagens em cada nível de concentração.

A Tabela 22 mostra os dados obtidos no ensaio de recuperação. Como as amostras foram fortificadas com padrão de pureza diferente de 100%, as massas adicionadas do padrão estão corrigidas com a pureza do ativo.

O critério de aceitação da exatidão, sendo a RDC nº166 depende do objetivo do método, da variabilidade intrínseca do método, da concentração de trabalho e da concentração do analito na amostra. Como o DPR calculado em cada nível se mostrou abaixo de 2,0%, pode-se inferir que o parâmetro de exatidão está aprovado, já que se verificou a capacidade do método de recuperar a massa adicionada de padrão e comprovou-se a exatidão da metodologia, conforme Figura 54.

The image displays a software interface for accuracy evaluation. It consists of several interconnected components:

- Levels:** A list box containing 'Level 1', 'Level 2', and 'Level 3'. 'Level 3' is currently selected and highlighted in blue.
- Level:** A status box with the title 'Level'. It contains two radio buttons: 'Accepted' (which is selected) and 'Rejected'.
- F1 Fisher test:** A box containing input fields for statistical parameters:
  - Confidence level: 95,00
  - degrees of freedom 1: 1
  - degrees of freedom 2: 25
  - F table: 4,240
  - F1 calculated: 1,20511e+04At the bottom, there are two radio buttons: 'Satisfactory' (selected) and 'Not satisfactory'.
- The parameter is:** A box with the text 'The parameter is' and two radio buttons: 'Validated' (selected) and 'Not validated'.

**Figura 54 – Avaliação da Exatidão Neolicy®**  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

## 4.3 AVALIAÇÃO DO CARÁTER VERDE

### 4.3.1 Avaliação Métrica Estrela-Verde

A Estrela-Verde é uma análise qualitativa visual do grau verde de um determinado processo. É uma metodologia geralmente utilizada para sínteses orgânicas, porém realizou-se uma adaptação dos critérios, para que pudesse ser aplicada para avaliação das metodologias cromatográficas deste trabalho, tanto a metodologia original quanto a desenvolvida com etanol. Seguem os 12 princípios da Química Analítica Verde e como cada um deles foi avaliado adaptando-se para análises cromatográficas (GAŁUSZKA *et al.*, 2013)

- 1) **Prevenção:** foi avaliada a toxicidade e a quantidade de resíduos gerados;
- 2) **Eficiência Atômica:** foi avaliado o volume de injeção de amostras utilizado, bem como a forma de preparo de amostras, de forma a minimizar a quantidade de amostras;
- 3) **Análise Segura:** foi avaliada a utilização e geração de substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente;
- 4) **Desenvolvimento de Metodologias Robustas:** foi avaliada a aplicação da metodologia em outros laboratórios e outros equipamentos;
- 5) **Solventes e Auxiliares Seguros:** foi avaliado o uso dos produtos químicos utilizados durante a análise cromatográfica, já que segundo esse critério, devem ser inócuas ou facilmente reutilizáveis;
- 6) **Eficiência Energética:** foi avaliada a pressão e temperatura utilizada durante todo processo cromatográfico, além do tempo de análise;
- 7) **Uso de Fontes Renováveis de Solventes e Produtos Biodegradáveis:** foi avaliado o uso de produtos químicos mais sustentáveis e biodegradáveis além da reutilização de colunas cromatográficas;
- 8) **Evitar Tratamento Desnecessário de Amostras:** avaliar como foi conduzido o preparo de amostras e as etapas envolvidas;
- 9) **Catálise:** não se aplica ao processo avaliado;
- 10) **Derivatização da amostra:** não se aplica ao processo avaliado;

**11) Análise em Tempo Real:** O monitoramento e o controle de processos químicos em tempo real, que utilizem técnicas analíticas e algoritmos computacionais adequados, é essencial para a otimização desses processos.

**12) Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes:** avaliou-se a periculosidade dos produtos químicos utilizados a fim de minimizar risco de acidentes, vazamentos, incêndios e explosões.

Dois dos doze princípios da Química Verde não são aplicáveis para o caso em questão: os itens 9 e 10, utilização de catalisadores e utilização de produtos biodegradáveis, respectivamente. Por isso, a estrela-verde que se utilizou é a de 10 pontas ao invés de 12. As metodologias foram avaliadas tomando-se como base uma corrida com três pontos de curva de calibração em triplicata e duas amostras, também em triplicata, totalizando 15 corridas. Para auxiliar nessa avaliação, utilizou-se um modelo automático para atribuição dos pontos e construção das estrelas-verdes (RIBEIRO, 2022).

#### **Metodologia Farmacopeica (Figura 55)**

**1) Prevenção:** Foram utilizados 150 mL de uma mistura de acetonitrila, água e ácido fosfórico durante a análise cromatográfica com resíduo (acetonitrila) que envolve perigo moderado para a saúde e meio ambiente, segundo GHS, por isso, foi considerado como parcialmente verde;

**2) Eficiência Atômica:** injeção de 5 µL, ou seja, volumes baixos e preparo de amostras em balões volumétricos, com gasto de cerca de 250 mL para o preparo, considerando 3 padrões e 2 amostras. O preparo de amostras é uma etapa passível de otimização, então foi considerado como parcialmente atendido;

**3) Análise Segura:** foi avaliada a utilização e geração de substâncias e suas toxicidades, sendo considerado parcialmente verde, pois a acetonitrila apresenta risco moderado para a saúde;

**4) Desenvolvimento de Metodologias Robustas:** metodologia se apresenta robusta em diferentes equipamentos, por isso, critério completamente atendido;

**5) Solventes e Auxiliares Seguros:** foi avaliada a utilização de substâncias seguras, sendo considerado parcialmente verde, pois a acetonitrila apresenta risco moderado para a saúde e ambiente;

**6) Eficiência Energética:** foi avaliada a pressão e temperatura utilizada durante todo processo cromatográfico, considerado como não cumprido esse critério, pois em CLAE, utilizamos altas pressões, nesse caso, cerca de 200 bar;

**7) Uso de Fontes Renováveis de Solventes e Produtos Biodegradáveis:** considerado como parcialmente atendido pois, apesar de reutilização de colunas cromatográficas, não trabalhou-se com nenhuma fonte renovável de solventes;

**8) Evitar Tratamento Desnecessário de Amostras:** o preparo de amostras pode ser otimizado com utilização de repipetadores eletrônicos e preparo direto em vials, reduzindo o consumo de solvente e minimizando erros dos analistas. Por isso, foi considerado como parcialmente atendido;

**9) Catálise:** não se aplica ao processo avaliado;

**10) Derivatização da amostra:** não se aplica ao processo avaliado;

**11) Análise em Tempo Real:** completamente atendido, pois em CLAE, já é comum o uso de softwares de controle;

**12) Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes:** foi considerado não atendido pois a acetonitrila apresenta perigo elevado quanto à perigos físicos;

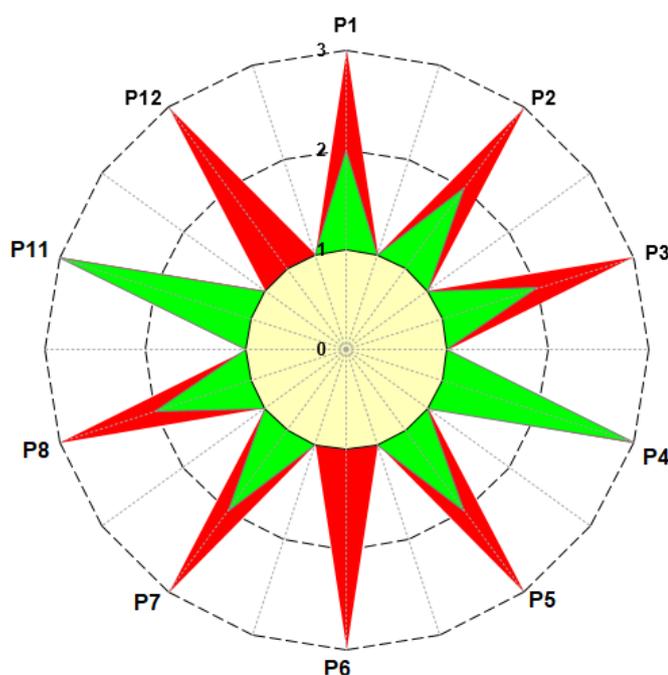


Figura 55 - Estrela-Verde para a Metodologia Farmacopeica do AAS.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

### **Metodologia Desenvolvida (Figura 56)**

**1) Prevenção:** Foram utilizados 105 mL de uma mistura de etanol, água e ácido fosfórico durante a análise cromatográfica com resíduo (etanol) que envolve perigo moderado para a saúde e meio ambiente, segundo GHS, por isso, foi considerado como parcialmente verde;

**2) Eficiência Atômica:** injeção de 10 µL, ou seja, volumes baixos e preparo de amostras diretamente em vials, com gasto de cerca de 10 mL para o preparo, considerando 3 padrões e 2 amostras. Com essa otimização de preparo, esse critério foi considerado completamente atendido;

**3) Análise Segura:** foi avaliada a utilização e geração de substâncias e suas toxicidades, sendo considerado parcialmente verde, pois o etanol apresenta risco moderado para a saúde;

**4) Desenvolvimento de Metodologias Robustas:** metodologia se apresenta robusta em diferentes equipamentos, por isso, critério completamente atendido;

**5) Solventes e Auxiliares Seguros:** foi avaliada a utilização de substâncias seguras, sendo considerado parcialmente verde, pois o etanol apresenta risco moderado para a saúde e ambiente;

**6) Eficiência Energética:** foi avaliada a pressão e temperatura utilizada durante todo processo cromatográfico, considerado como não cumprido esse critério, pois em CLAE, utilizamos altas pressões, nesse caso, cerca de 200 bar;

**7) Uso de Fontes Renováveis de Solventes:** considerado como completamente atendido pois, além da reutilização de colunas cromatográficas, trabalhou-se com etanol, que é um solvente sustentável e biodegradável;

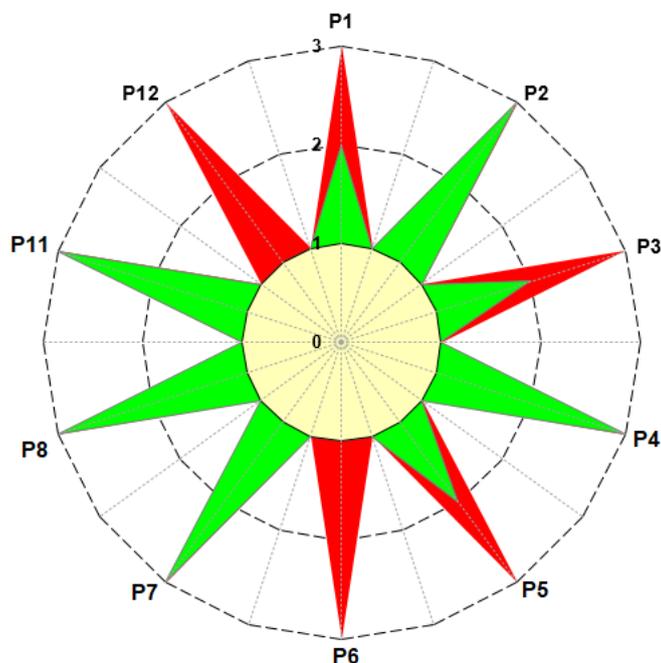
**8) Evitar Tratamento Desnecessário de Amostras:** o preparo de amostras foi otimizado com utilização de repipetadores eletrônicos, por isso, foi considerado como completamente atendido;

**9) Catálise:** não se aplica ao processo avaliado;

**10) Derivatização da Amostra:** não se aplica ao processo avaliado;

**11) Análise em Tempo Real:** completamente atendido, pois em CLAE, já é comum o uso de softwares de controle;

**12) Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes:** foi considerado não atendido pois o etanol apresenta perigo elevado quanto à perigos físicos.



**Figura 56 - Estrela-Verde para a Metodologia Desenvolvida neste trabalho.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.**

Comparando-se as estrelas-verdes, nota-se que a EV para a metodologia farmacopeica (Figura 55) apresenta dois critérios completamente atendidos, seis parcialmente atendidos e dois não atendidos. Já a EV da metodologia desenvolvida (Figura 56) apresenta cinco critérios completamente atendidos, três parcialmente preenchidos e dois não atendidos. Com essa simples análise, pode-se inferir que a metodologia desenvolvida apresenta maior caráter verde quando comparado com a metodologia farmacopeica.

A dificuldade da avaliação do grau verde e construção da estrela-verde utilizando essa métrica é um ponto que vale a pena citar. Apesar de ser baseado por pontuações atreladas ao Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), ainda assim é uma avaliação muito qualitativa, sem um direcionamento claro, o que não torna totalmente confiável a conclusão dessa avaliação, requerendo o uso de outras métricas que ratifiquem esse resultado.

### 4.3.2 Avaliação Métrica NEMI

Os critérios de classificação da avaliação NEMI traduzem as informações e características de um determinado método analítico em um caráter verde. Os critérios que avaliam o caráter verde são expressos por quatro termos: (I) PBT (persistentes, bioacumulativos e tóxicos); (II) corrosivo; (III) perigoso; e (IV) resíduos. Os produtos químicos PBT integram a lista *Toxic Release Inventory* (TRI), estabelecida pela *Environmental Protection Agency* (EPA), dos EUA. O *Resource Conservation and Recovery Act* (RCRA) organizou as categorias (D, F, O ou U) de produtos e resíduos químicos perigosos, corrosivos e definiu suas características (KEITH *et al.*, 2007).

Conforme informações na página da base de dados NEMI, os critérios do perfil que determinam se um método é “menos verde” são os seguintes:

- PBT: utiliza reagentes químicos identificados como PBT na lista TRI da EPA;
- Perigoso: quando reagentes químicos utilizados no método estão na lista TRI ou pertencem à uma das categorias (D, F, O ou U) da lista RCRA;
- Corrosivo: se o pH durante a análise for  $< 2$  ou  $> 12$ ;
- Resíduos: se a quantidade de resíduos gerados for  $> 50$  g.

Com base nos critérios dispostos acima, realizou-se a avaliação NEMI da metodologia farmacopeica e da metodologia desenvolvida neste trabalho, de forma a comparar o caráter verde entre as duas. Tomando como exemplo o primeiro critério (PBT), se a metodologia utiliza algum reagente químico que consta na lista TRI da EPA, então o seu quadrante se apresentará na cor branca. Se não utilizar nenhum reagente da lista TRI, o quadrante apresentará cor verde, indicando caráter verde para aquele critério. E assim segue-se para os outros três critérios, ou seja, quanto mais quadrantes verdes, maior é o caráter verde da metodologia avaliada, segundo a métrica NEMI. As metodologias foram avaliadas tomando-se como base uma corrida com três pontos de curva de calibração em triplicata e duas amostras, também em triplicata, totalizando 15 corridas.

#### **Metodologia Farmacopeica (Figura 57)**

- PBT: Acetonitrila, Água, Ácido Fosfórico e AAS não constam como PBT na lista TRI da EPA (Quadrante Verde)

- Perigoso: Acetonitrila consta na lista RCRA (*Hazardous Waste* No U003) – (Quadrante Branco)
- Corrosivo: Fase Móvel pH  $\approx$  4 (Quadrante Verde).
- Resíduos: Resíduos > 50 g (Quadrante Branco).

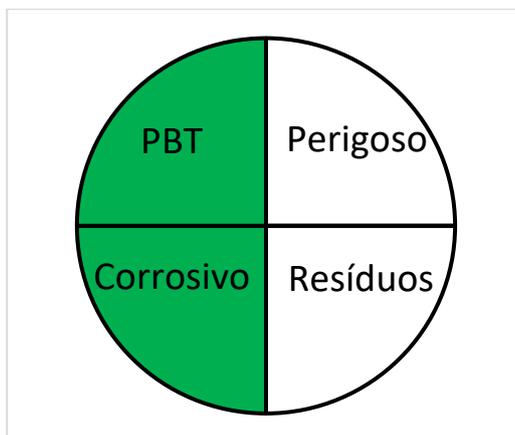


Figura 57 - NEMI para Metodologia Farmacopeica.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

#### **Metodologia Desenvolvida (Figura 58)**

- PBT: Etanol, Água, Ácido Fosfórico e AAS não constam como PBT na lista TRI da EPA (Quadrante Verde).
- Perigoso: Etanol, Água, Ácido Fosfórico e AAS não constam na lista TRI da EPA nem na lista RCRA (Quadrante Verde).
- Corrosivo: Fase Móvel pH  $\approx$  4 (Quadrante Verde).
- Resíduos: Resíduos > 50 g (Quadrante Branco).



Figura 58 - NEMI para a Metodologia Desenvolvida.  
Fonte: Próprio Autor, 2022.

De forma bem clara e visual, pode-se observar e inferir que a metodologia desenvolvida apresenta maior caráter verde com relação à metodologia farmacopeica, devido à troca do solvente orgânico acetonitrila por etanol, já que o primeiro está presente na lista RCRA, considerando a metodologia como perigosa e colorindo de verde apenas dois quadrantes. Já a metodologia desenvolvida, apresenta três quadrantes verdes, sendo considerado 75% verde, segundo a avaliação NEMI.

#### 4.3.3 Avaliação Métrica Eco Escala Analítica

As metodologias também foram avaliadas e comparadas em função do cálculo da eco escala analítica, utilizando o procedimento mostrado na Figura 18. As Tabelas 23 e 24 mostram os pontos de penalidade (PP) calculados e associados aos reagentes utilizados, consumo de energia e resíduos gerados para as metodologias em questão (farmacopeica e desenvolvida).

A quantidade foi avaliada segundo o volume de solvente utilizado na análise e o parâmetro perigo foi avaliado pela ficha de segurança dos produtos. Para a energia utilizada, calculou-se através da potência de cada equipamento multiplicado pelo tempo de uso, encontrando-se o gasto de energia. Os riscos ocupacionais listados para essa métrica não existem para as metodologias avaliadas e o resíduo foi pontuado segundo a quantidade gerada e sua respectiva característica (reciclável, degradável, passivo ou não admite tratamento).

#### Metodologia Farmacopeica

Tabela 23 - Avaliação e atribuição de pontos à metodologia farmacopeica.

	Reagentes	Pontuação	Sinal	PP
<b>Quantidade</b>	ACN >100 mL	2,0	Perigo	4,0
<b>Perigo</b>	ACN (Risco mais grave)	2,0		
<b>Energia</b>	Ultrassom (180 W – 5 min)	≤1kWh (0)	-	0,0
	HPLC (450 W – 150 min)	≤1,5kWh (1)	-	1,0
<b>Risco</b>	Processo analítico hermético	-	-	0,0
<b>Ocupacional</b>	Emissão de vapores e gases	-	-	0,0
<b>Resíduo</b>	ACN >10 mL	5,0	-	15,0

<b>Característica</b>	Não admite tratamento	3,0	-	
<b>Somatório PP</b>				20,0
<b>Eco Escala Analítica</b>			100 - PP	80

Fonte: Próprio Autor, 2022.

### Metodologia Desenvolvida

Tabela 24 - Avaliação e atribuição de pontos à metodologia desenvolvida.

	Reagentes	Pontuação	Sinal	PP
<b>Quantidade</b>	EtOH 10-100 mL	1,0		
<b>Perigo</b>	EtOH (Risco menos grave)	2,0	Perigo	2,0
<b>Energia</b>	Ultrassom (180 W – 5 min)	≤1kWh (0)	-	0,0
	HPLC (450 W – 52,5 min)	≤1kWh (0)	-	0,0
<b>Risco Ocupacional</b>	Processo analítico hermético	-	-	0,0
	Emissão de vapores e gases	-	-	0,0
<b>Resíduo</b>	EtOH >10 mL	5,0	-	5,0
<b>Característica</b>	Biodegradável	1,0	-	
<b>Somatório PP</b>				7,0
<b>Eco Escala Analítica</b>			100 - PP	93,0

Fonte: Próprio Autor, 2022.

Resumidamente, um método verde ideal tem uma pontuação de 100 pontos na escala ecológica e o valor real de eco escala para um método é calculado pela subtração da soma de PP do valor ideal. De acordo com a eco escala, os valores calculados para as metodologias farmacopeica e desenvolvida foram 80 e 93, respectivamente, o que classifica ambos os métodos com um excelente caráter verde, caracterizado com pontuação acima de 75 pontos. Analisando apenas os valores encontrados, a conclusão é que ambos possuem caráter verde excelente, tendo a metodologia desenvolvida uma pontuação mais próxima da ideal, caracterizando-a com um caráter mais verde. Porém, tem-se conhecimento da toxicidade de solventes orgânicos como a acetonitrila frente ao etanol. Além disso, um ponto de destaque é a

biodegradabilidade do etanol enquanto a acetonitrila é um solvente que não admite tratamento, o que torna a metodologia com etanol bem mais atraente quando se pensa em sustentabilidade. Com isso, entende-se que, comparativamente, a metodologia desenvolvida com etanol apresenta maior caráter verde.

#### 4.3.4 Avaliação Métrica GCFR – AGREE

Inicialmente, realizaram-se os cálculos para avaliação seguindo a métrica GCFR, porém os dados encontrados não forneceram informações importantes, já que essa métrica é muito utilizada e aplicada para metodologias que quantifiquem um número considerável de analitos (mais de 10). Dessa forma, a avaliação seguiu-se com o AGREE e os parâmetros de entrada no software estão representados na Tabela 25 e os pictogramas resultantes estão representados na Figura 59 (PENA-PEREIRA *et al.*, 2015, 2020).

**Tabela 25 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do score referente ao método cromatográfico desenvolvido e o método farmacopeico.**

<b>Parâmetros de Entrada (AGREE)</b>			
<b>Método Farmacopeico (ACN)</b>		<b>Método Desenvolvido (EtOH)</b>	
<b>Princípio</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Princípio</b>	<b>Parâmetro</b>
1	Análise <i>Off-line</i>	1	Análise <i>Off-line</i>
2	10 mL	2	2 mL
3	<i>Off-line</i>	3	<i>Off-line</i>
4	3 etapas ou menos	4	3 etapas ou menos
5	Análise Semi-Automática e Preparo Não Miniaturizado	5	Análise Semi-Automática e Preparo Miniaturizado
6	Sem derivatização	6	Sem derivatização
7	60 mL	7	40 mL
8	2/6	8	2/16
9	LC	9	LC
10	Nenhum dos reagentes <i>bio-based</i>	10	Todos reagentes <i>bio-based</i>
11	Sim, 60 mL	11	Sem resíduos tóxicos

12 Altamente inflamável/ tóxico para a vida aquática/ bioacumulável

12 Altamente inflamável

Fonte: Próprio Autor, 2022.

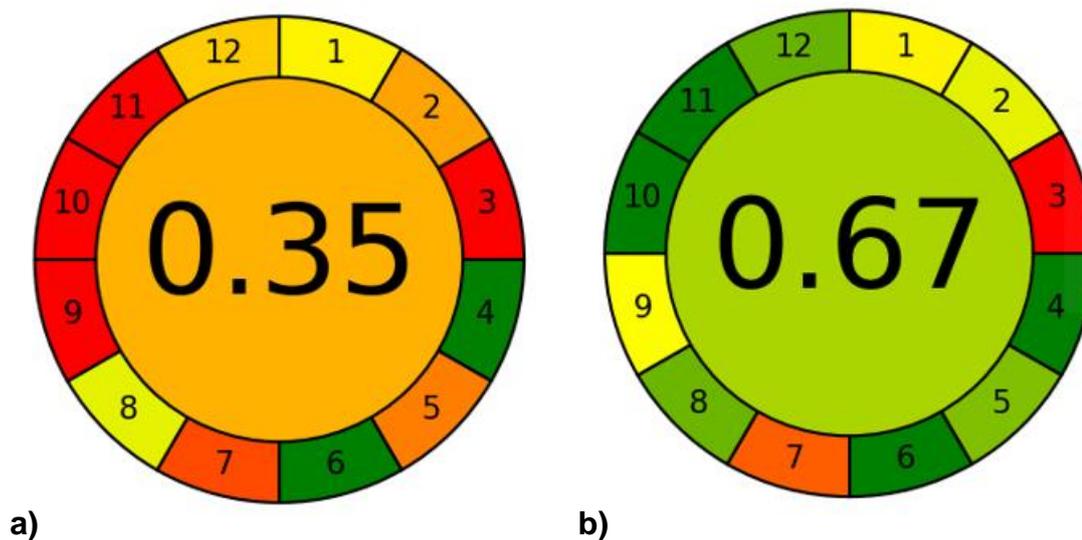


Figura 59 - Pictogramas contendo os scores apresentados na métrica AGREE para (a) o método farmacopeico e (b) método com etanol desenvolvido no presente trabalho. Fonte: Próprio Autor, 2022 (AGREE).

No que tange aos parâmetros de entrada, considerou-se que não foram empregados solventes tóxicos para o método de eluição desenvolvido com etanol visto que, comparativamente, o etanol é muito menos tóxico do que a acetonitrila, modificador orgânico empregado no método de referência. Ambos os métodos receberam elevada penalidade no que tange aos princípios 1 (em amarelo nos pictogramas) e 3 da Química Analítica Verde (em vermelho nos pictogramas) considerando o posicionamento *off-line* da instrumentação empregada para ambos os métodos de eluição. O princípio 5 também trouxe uma penalidade considerável ao método farmacopeico (e está em laranja em ambos os pictogramas) considerando que a metodologia foi semiautomática e o preparo de amostra não foi miniaturizado. Já para a metodologia desenvolvida, o princípio 5 se apresenta na cor verde, pois trabalhou com preparo miniaturizado, com utilização de repipetadores eletrônicos. No entanto, o método de eluição verde desenvolvido no presente trabalho apresentou superioridade em aspectos ambientais em comparação com o método de referência:

Em oposição ao método farmacopeico, o etanol possui uma toxicidade muito reduzida se comparada com a acetonitrila, um solvente que apresenta um risco associado muito maior do que o anterior. Assim, o método verde está em maior consonância com os princípios 10,11 e 12 da Química Analítica Verde.

Sob uma perspectiva global, portanto, o método desenvolvido é mais ambientalmente amigável, apresentando um valor geral de 0,67 frente a 0,35 da metodologia farmacopeica.

#### 4.3.5 Avaliação Geral – Custo e Tempo

De forma a avaliar custo e tempo, realizou-se uma análise comparativa entre a metodologia farmacopeica, utilizando acetonitrila e a metodologia proposta, utilizando etanol. Partindo-se das marcas dos solventes realmente utilizados nesse projeto, o valor tanto do etanol quanto da acetonitrila grau HPLC foi de R\$809,00 cada frasco de 2,5 L. Lembrando que as metodologias foram avaliadas tomando-se como base uma corrida com três pontos de curva de calibração em triplicata e duas amostras, também em triplicata, totalizando 15 corridas. O ácido fosfórico e a água não foram considerados nos cálculos, já que são comuns as duas metodologias.

#### Metodologia Farmacopeica

15 análises

Tempo de cada análise: 10 minutos

Fluxo: 1 mL.min<sup>-1</sup> - 40% ACN

O cálculo foi feito utilizando a Equação 15, onde utilizamos o número de análises, o tempo de corrida de cada análise, o fluxo trabalhado e a porcentagem de acetonitrila utilizada na composição da fase móvel:

$$Vol_{ACN} = n^{\circ}_{Análises} \cdot t_{corrida} \cdot fluxo \cdot \%_{Solv} \quad (15)$$

O volume gasto de acetonitrila para 15 corridas é de 60 mL que, convertendo, tem-se o valor de R\$19,42 para cada lote de análise. Pensando em preparo de amostras em balões volumétricos, utiliza-se o volume de 100 mL de acetonitrila, ou seja, R\$32,36. Em todo o processo de preparo e análise, gastaram-se 160 mL de acetonitrila, totalizando um valor de R\$51,78.

Com relação ao tempo, de forma bem simples, cada corrida tem um tempo de 10 minutos e a partindo-se de 15 corridas, têm-se o tempo de 150 minutos de análise.

### **Metodologia Desenvolvida**

15 análises

Tempo de cada análise: 3,5 minutos

Fluxo: 2 mL.min<sup>-1</sup> - 38% EtOH

Utilizando-se a Equação 15, o volume gasto de etanol para 15 corridas é de 40 mL que, convertendo, tem-se o valor de R\$12,94 para cada lote de análise. Pensando em preparo de amostras em vials como uma sugestão de melhoria, utiliza-se o volume de 4 mL de etanol, ou seja, R\$1,29. Em todo o processo de preparo e análise, gastaram-se 44 mL de etanol, totalizando um valor de R\$14,24.

Com relação ao tempo, de forma bem simples, cada corrida tem um tempo de 3,5 minutos e a partindo-se de 15 corridas, têm-se o tempo de 52,5 minutos de análise.

Comparando-se as duas metodologias em relação à custo e tempo, o método desenvolvido neste trabalho traz uma redução de 72,5% de custo e 65% de ganho de tempo em relação à metodologia farmacopeica. Este resultado disposto na Tabela 26 traz um aumento de produtividade importante e uma redução de custo significativa, mostrando a relevância em trabalhar no desenvolvimento de metodologias com novas tecnologias de colunas, trabalhar com preparos de amostras minimizados, além do fator de sustentabilidade, já discutido nas avaliações anteriores.

**Tabela 26 - Análise de Custo e Tempo Metodologia Farmacopeica vs. Desenvolvida.**

	<b>Custo</b>	<b>Tempo</b>
<b>Metodologia Farmacopeica</b>	R\$51,78	150 min
<b>Metodologia Desenvolvida</b>	R\$14,24	52,5 min
<b>Redução</b>	<b>72,5%</b>	<b>65,0%</b>

Fonte: Próprio Autor, 2022.

Como discorrido ao longo desse trabalho, o desenvolvimento de metodologias analíticas com solventes verdes e novas tecnologias de colunas mostra-se muito importante e significativo quando avaliados custo, tempo e sustentabilidade. Todo procedimento descrito pode ser aplicado para o desenvolvimento de outras

metodologias de análise de diversos âmbitos: farmacêutico, agro, cosmético, alimentício, de forma que, gradativamente, os métodos sejam cada vez mais sustentáveis ambientalmente e economicamente.

A grande possibilidade de aplicação desse procedimento desenvolvido neste trabalho mostra o quão abrangente essa metodologia pode ser, pois pode funcionar como um guia para otimização de diversas outras metodologias, sendo um multiplicador de caráter verde, sustentabilidade e redução de custos para outros processos.

## 5. CONCLUSÕES

A metodologia analítica de quantificação do teor de ácido acetilsalicílico foi desenvolvida utilizando os conceitos da química verde e provou ser adequada para a determinação do AAS, uma vez que demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato, além de ter apresentado maior caráter verde em relação à metodologia farmacopeica IF010-000.

Para validação da metodologia desenvolvida, foram realizados os testes dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão, limites de detecção e quantificação. A metodologia se mostrou seletiva, já que não houve nenhum interferente no mesmo tempo de retenção do ácido acetilsalicílico, utilizando o Parateck® SI 200 como placebo. A curva de calibração se apresentou linear, com coeficiente de correlação maior que 0,99. Ensaios de precisão foram avaliados pela repetibilidade e reprodutibilidade, que apresentaram coeficientes de variação de 0,36 e 0,55, respectivamente. A exatidão também apresentou resultados dentro dos critérios de aceitação estipulados pela RDC nº166/2017, onde foram avaliadas a recuperação em 80, 100 e 120% (400, 500 e 600 mg/comprimido). Limites de detecção e quantificação também foram avaliados, apresentando valores de 0,04 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,52 mg.mL<sup>-1</sup>. Portanto, o método desenvolvido pode ser aplicado com sucesso para análises de teor em comprimidos de Aspirina®.

Além disso, a metodologia desenvolvida foi medida quanto ao caráter verde, sendo avaliada por cinco métricas: estrela-verde, NEMI, AGREE, eco escala analítica e análise de custo e tempo. Em todas as métricas, a metodologia foi avaliada com um grau verde maior em relação à metodologia farmacopeica. Pela estrela-verde, o método desenvolvido apresentou cinco princípios completamente atendidos frente à dois da metodologia farmacopeica. Quanto à métrica NEMI, a metodologia proposta apresentou três quadrantes verdes frente à dois da metodologia farmacopeica. Para a eco escala analítica, ambos apresentaram pontuação para excelente grau verde, porém é a metodologia com etanol apresentou maior pontuação, mais próxima do ideal. Para a métrica AGREE, seguiu-se o mesmo racional, com uma pontuação de 0,67 para a metodologia proposta e 0,35 para a farmacopeica. A análise de custo e tempo mostrou 72,5% de ganho em custo e 65% de ganho em tempo, já que as corridas passaram de 10 para 3,5 minutos, além da redução do gasto de solvente. Por fim, vale destacar a importância da eliminação do uso da acetonitrila como solvente e

substituição total por etanol, visto a sustentabilidade deste e as crises de acetonitrila que têm sido enfrentadas nos últimos anos. Outro ponto de bastante relevância é a extensão dessa forma de trabalho para outras metodologias analíticas, podendo ser desenvolvidas com utilização de solventes verdes e novas tecnologias de colunas, de forma que, progressivamente, os métodos de análise migrem para métodos mais viáveis economicamente e mais sustentáveis.

## 6. REFERÊNCIAS

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 17.16** de Abril de 2010. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html). Acesso em: 15 Nov 2020.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise: Um Experimento de Fácil Aplicação Utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Os Princípios Da Química Verde Na Determinação de Metilxantinas em Bebidas**. Química Nova, vol. 32, no 9, 2009, p. 2476–81.

BATLOUNI, M. **Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, vol. 94, no. 4, Abr 2010, p. 556–63.

BAYER. **Histórico da Aspirina**. 2020. Disponível em: <https://www.aspirina.com.br/pt/sobreaspirina/historia/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

Becker, J.; Masnke, C.; Randl, S. **Green Chemistry and Sustainability Metrics in the Pharmaceutical Manufacturing Sector**. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, vol. 33, fev. de 2022, p. 100562.

CÂMARA FILHO, L. A. **A História da Aspirina**. 2020. Disponível em: <https://hospitaldocoracao.com.br/novo/midias-e-artigos/artigos-nomes-da-medicina/aspirina-uma-biografia/#:~:text=Teofrasto%2C%20bot%C3%A2nico%20pioneiro%20que%20sucedeu,de%20aliviar%20dores%20e%20febre..> Acesso em: 14 fev. 2022.

CANEVAROLO, S.V.Jr. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artibler Editora, 340 p., 2017.

Cardoso, M. H. W. M.; Gouvêa, A. V.; Nóbrega, A. W.; Abrantes, S. M. P. **Validação de Método Para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos Em Tomate: Uma Experiência Laboratorial**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 30, maio de 2010, p. 63–72.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; SANTOS, F. R. **Analgésicos Inibidores Específicos Da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos**. Revista Brasileira de Anestesiologia, vol. 54, no 3, 01 Jun. 2004, p. 448–64.

CLAYDN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. 1 ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO CEARÁ. **Breve Histórico da Aspirina**. 2020. CRF-CE. Disponível em: <https://crfce.org.br/farmaceutico/conheca-sua-profissao/atribuicoes-e-esclarecimentos/#:~:text=Esse%20pioneirismo%2C%20mais%20tarde%2C%20origina%20ria,prepara%C3%A7%C3%A3o%20e%20guarda%20dos%20medicamentos.Acesso em: 11 mar. 2021>.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **História da Farmacologia**. 2021. CRF-SP Disponível em: [http://www.crfsp.org.br/joomla/index.php?option=com\\_content&view=article&id=290%3Asurgimento-dasboticas&catid=51%3Anossa-historia&Itemid=115](http://www.crfsp.org.br/joomla/index.php?option=com_content&view=article&id=290%3Asurgimento-dasboticas&catid=51%3Anossa-historia&Itemid=115). Acesso em: 25 nov. 2021.

DOGAN, A.; EYLEM, C. C.; AKDUBAM, N. B. **Application of green methodology to pharmaceutical analysis using eco-friendly ethanol-water mobile phases**. *Microchemical Journal*. Turquia, p. 1-5. set. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X20301119?via%3Dihub>. Acesso em: 15 fev. 2021.

El-Kafrawy, D. S.; Abo-Gharam, A. H.; Abdel-Khalek, M. M.; Belal, T. S. **Comparative Study of Two Versatile Multi-Analyte Chromatographic Methods for Determination of Diacerein Together with Four Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Greenness Appraisal Using Analytical Eco-Scale and AGREE Metrics**. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 28, set. de 2022, p. 100709.

Ferreira, S.S.; Brito, T. A.; Santana, A. P. R.; Guimarães, T. G. S.; Lamarca, R. S.; Ferreira, K. C.; Gomes, P. C. F. L.; Oliveira, A.; Amaral, C. D. B.; Gonzalez, M. H. **Greenness of Procedures Using NADES in the Preparation of Vegetal Samples: Comparison of Five Green Metrics**. *Talanta Open*, vol. 6, dez. de 2022, p. 100131.

FOYE, W.; LEMKE, T.; WILLIAMS, D. **Foyes's Principles of Medicinal Chemistry**. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 6ed., p. 954-1003, 2008.

FUNARI, C.; CARNEIRO, R.; CAVALHEIRO, A.; HILDER, E. **A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprint**. *Journal of Chromatography A*, 1354, p. 34-42, ago. 2014a. Disponível em: Acesso em: 30 set. 2020.

**Fused-Core Columns Technology**. 2020. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/analyticalchromatography/hplc/columns/ascentis->

express/fused-core-advantage.html. Acesso em: 25 nov. 2020.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J.. **Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures**. Elsevier: TrAC Trends in Analytical Chemistry., p. 61-72. jul. 2012. 11 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993612001525>. Acesso em: 18 jan. 2021.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. **The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices**. Trends in Analytical Chemistry, v.50, p.78-84, 2013.

Hessel, V.; Tran, N. N.; Asrami, M. R.; Tran, Q. D.; Long, N. V. D.; Escribà-Gelonch, M.; Tejada, J. O.; Linke, S.; Sundmacher, K. **Sustainability of Green Solvents – Review and Perspective**. Green Chemistry, vol. 24, no 2, 2022, p. 410–37.

IBRAHIM, A. E.; SALEH, H.; ELHENAWEE, M. **Assessment and validation of green stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of timolol and latanoprost in pharmaceutical dosage forms using eco-friendly chiral mobile phase**. Microchemical Journal. Egito, p. 21-26. jul. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X19304709?via%3Dihub>. Acesso em: 21 mar. 2021.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). **Orientação sobre validação de métodos analíticos** – Documento de caráter orientativo. DOQ–CGCRE–008. Revisão: 07, jul. 2018.

**Inovações em Cromatografia**. 2019. Disponível em: <https://www.hitachi.com.br/> Acesso em: 25 fev. 2022.

KEITH, L.; GRON, L.; YOUNG, J. **Green Analytical Methodologies**. **Chemical Reviews**, Washington, v. 6, n. 107, p. 2695-2708, 24 maio 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr068359e>.

KIEFER, D. M., **Today`s Chemistry at Work**. 1997.

KIRKLANDA, J.; SCHUSTER, S.; JOHNSON, W.; BOYES, B. **Fused-core particle technology in highperformance liquid chromatography: An overview**. Journal Of Pharmaceutical Analysis. Estados Unidos, p. 303-312. Out 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177913000245?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jan. 2021.

Kokilambigai, K. S.; K. S. Lakshmi. **Analytical Quality by Design Assisted RP-HPLC Method for Quantifying Atorvastatin with Green Analytical Chemistry**

**Perspective.** Journal of Chromatography Open, vol. 2, novembro de 2022, p. 100052.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M.; BATISTA, A. F.; SILVEIRA, C. C. **Green Chemistry: Os 12 Princípios Da Química Verde e Sua Inserção Nas Atividades de Ensino e Pesquisa.** Química Nova, vol. 26, no 1, janeiro de 2003, p. 123–29.

LEONARDI, E.; MATOS, J. **Indústria Farmacêutica tem Crescimento Acelerado.** ICTQ - Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade, São Paulo, abr. 2020. Disponível em: [https://www.ictq.com.br/industriafarmaceutica/1380-industria-farmaceutica-tem-crescimentoacelerado#:~:text=Depois%20de%20tr%C3%AAs%20meses%20seguidos,Geografia%20e%20Estat%C3%ADstica%20\(IBGE\).&text=A%20informa%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A9%20do%20Guia,Farmac%C3%AAutica%20de%20Pesquisa%20\(Interfarma\)](https://www.ictq.com.br/industriafarmaceutica/1380-industria-farmaceutica-tem-crescimentoacelerado#:~:text=Depois%20de%20tr%C3%AAs%20meses%20seguidos,Geografia%20e%20Estat%C3%ADstica%20(IBGE).&text=A%20informa%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A9%20do%20Guia,Farmac%C3%AAutica%20de%20Pesquisa%20(Interfarma).). Acesso em: 05 Nov 2020.

LIMA, M. F. B.; PATRÍCIO, L. S.; SILVA FILHO, F. J. N.; CAVALCANTE, R. M. **Experimento didático abordando a importância da validação metodológica no estudo da química do sulfato no meio ambiente.** Educación Química, v.28, n.4, p.295–301, 2017.

LUVIZON, F. **Aplicação da eco-escala para avaliação do caráter verde de procedimentos de preparo de amostras para determinação de metais por técnicas espectrométricas.** 2020. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/218572/TCC%20II-%20Fabiana%20Reposit%C3%B3rio.pdf?sequence=1>. Acesso em: 25 fev. 2021.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, D. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,** (2a. ed. 2014).

MALDANER, L.; COLLINS, C.; JARDIM, I. **Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.** Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n.7, p. 1559-1568, 2010. Disponível em: Acesso em: 5 out. 2020.

Martínez, J.; Cortés, J. F.; Miranda, R. **Green Chemistry Metrics, A Review Processes,** vol. 10, no 7, junho de 2022, p. 1274.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. **A importância da síntese de fármacos.** QNesc, São Paulo, caderno temático, n. 3, 2001. Disponível em: <<http://qnesc.s bq.org.br/online/cadernos/03/sintese.pdf>>. Acesso em: 12 março 2012.

OLIVEIRA, M. **Entre açúcares e genes: Aplicação do conhecimento científico da cana deverá servir ao desenvolvimento de novas ferramentas para a produção de etanol.** ed. 200, São Paulo, SP: Pesquisa FAPESP, out. 2012. Disponível em: Acesso em: 24 jan. 2021.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. **Validação de Métodos Cromatográficos Para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários Em Alimentos.** Química Nova, vol. 31, no. 5, 2008, p. 1190–98.

PENA-PEREIRA, F.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. **Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives.** Green Chemistry, v. 17, n. 7, p. 3687-3705, 2015.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. **AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software.** Analytical Chemistry, v. 92, n. 14, p. 10076-10082, 2020.

PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY BRASIL. **Cannabis e seus desafios analíticos.** São Paulo, v. 24, n. 4, p. 28-28, abr. 2020. Disponível em: <http://edicoesvr.com.br/descargas/Ed-4-20/2/index.html#zoom=z>. Acesso em: 01 nov. 2020.

PRADO, A. **Química Verde, Os Desafios da Química do novo milênio.** Química Nova, Brasília - Df, v. 26, n. 5, p. 738-744, set. 2003.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. **A survey of solvent selection guides.** GreenChem., 16, p. 4546-4551, jul. 2014. Disponível em: Acesso em: 16 out. 2020.

PROCÓPIO, A. M. S. **Avaliação da eficiência de remoção do hormônio 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em águas utilizando como biossorvente um resíduo agroindustrial.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Física e Química, MG, 2017.

**Química verde no Brasil: 2010-2030** - Ed. rev. e atual. - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

Rahman, A. A.; Abdul, M.; Xavier, C.; Santos, D. M.; Daam, M. A.; Azevedo, E. B.; Brigante, J.; Vieira, E. M. **Modified-QuEChERS Method for Extracting Thiamethoxam and Imidacloprid from Stingless Bees: Development, Application, and Green Metrics.** Environmental Toxicology and Chemistry, junho de 2022, p.5419.

RASHED, N. S.; ZAYED, S.; ABDELAZEEM, A.; FOUAD, F. **Development and validation of a green HPLC method for the analysis of clorsulon, albendazole,**

**triclabendazole and ivermectin using monolithic column: Assessment of the greenness of the proposed method.** *Microchemical Journal*. Egito, p. 1-10. Set 2020, v.157. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X20308675?via%3Di> hub. Acesso em: 20 jan. 2021.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química Nova*, v.27, n.5, p.771–780, 2004.

RIBEIRO, M. G. T. C. **Catálogo digital de verdura de atividades laboratoriais para o ensino da Química Verde.** 2022. Disponível em: [http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao\\_ev](http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao_ev). Acesso em: 20 jun. 2022.

Ribeiro, M. G. T.C.; Costa, D. A.; Machado, A. A. S. C. **Green Star: a holistic Green Chemistry metric for evaluation of teaching laboratory experiments,** *Green Chemistry Letters and Reviews*, vol. 3: 2, 149 — 159, 2010.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, D.; MACHADO, A. **Uma Métrica Gráfica Para Avaliação Holística Da Verdura de Reações Laboratoriais - 'Estrela Verde.** *Química Nova*, vol. 33, nº 3, 2010, p. 759–64.

Sajid, M.; Plotka-Wasyłka, J. **Green Analytical Chemistry Metrics: A Review.** *Talanta*, vol. 238, Fev. de 2022, p. 123046.

Santos, L. B.; Assis, R. S.; Barreto, J. A.; Bezerra, M. A.; Novaes, C. G.; Lemos, V. A. **Deep Eutectic Solvents in Liquid-Phase Microextraction: Contribution to Green Chemistry.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 146, Jan. de 2022, p. 116478.

SERHAN, C.; CHIANG, N.; DYKE, T. V. **Resolving Inflammation: Dual Anti-inflammatory and Pro-resolution Lipid Mediators.** *Nature Reviews*, v. 8, p. 349-361, 2008.

Shirkhedkar, A. A.; Chaudhari S. R. **Exploring an Experimental Combination of Analytical Quality by Design and Green Analytical Chemistry Approaches for Development of HPTLC Densitometric Protocol for the Analysis of Barnidipine Hydrochloride.** *Biomedical Chromatography*, vol. 36, no 1, Jan. de 2022.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JONES, J. **Desenvolvimento Sustentável e Química Verde.** *Química Nova*, vol. 28, no 1, p. 103–10, Fev. 2005.

SINDUSFARMA. **Alta do mundo farmacêutico**.2021. Disponível em:  
<https://sindusfarma.org.br/>

SKOOG, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. Ed. Porto Alegre: Bookman, 1056 p., 2009.

TONHI, E.; COLLINS, K.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. **Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados**. Química Nova, Campinas - Sp, v. 25, n. 4, p. 616-623, jul. 2002.

VANE, J. **Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs**. *Nature New Biology* **231**, 232–235 (1971).

YABRÉ, M.; FERREY, L.; SOMÉ, I. T.; GAUDIN, K. **Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis**. *Molecules*, 23, n. 5, p. 1065, mai. 2018. Disponível em:  
Acesso em: 21 set. 2020.

Zidny, R.;Ingo, E. **Learning about Pesticide Use Adapted from Ethnoscience as a Contribution to Green and Sustainable Chemistry Education**. *Education Sciences*, vol. 12, no 4, p. 227, mar. 2022.