



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – Estágio Supervisionado

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO PERINI EM SÃO JOSÉ/SC**

PAULO JULIANO PITZ

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Supervisor: Lucas de Oliveira

Florianópolis
Novembro/2024

Paulo Juliano Pitz

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM FORMULAÇÃO
FARMACÊUTICA POR HPLC-DAD**

Projeto de Estágio Supervisionado (QMC 5515) apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina desenvolvido na empresa Laboratório Perini em São José – SC, como obtenção do grau de bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Supervisor: Lucas de Oliveira

Florianópolis
Novembro/2024

Pitz, Paulo Juliano

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NO
LABORATÓRIO PERINI EM SÃO JOSÉ/SC :DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR
HPLC-DAD / Paulo Juliano Pitz ; supervisor, Luciano
Vitali, coorientador, Lucas de Oliveira, 2024.

57 p.

Relatório de Estágio - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

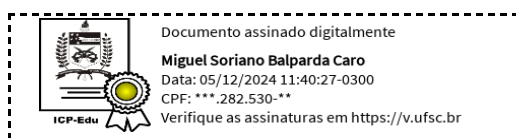
1. Química - Bacharelado. 2. medicamento veterinário.
3. vitaminas lipossolúveis. 4. método analítico. 5.
controle de qualidade. I. Vitali, Luciano . II. Oliveira,
Lucas de. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

Paulo Juliano Pitz

Relatório de Estágio Supervisionado desenvolvido no Laboratório de Controle de
Qualidade do Laboratório Perini.

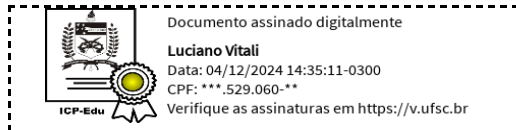
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título
de Bacharel em Química Tecnológica e aprovado em sua forma final pelo Curso de
Química.

Florianópolis, 28 de novembro de 2024.



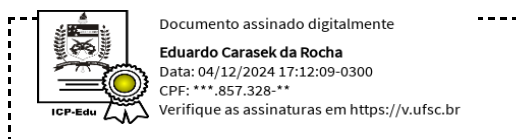
Coordenação do Curso

Banca Examinadora



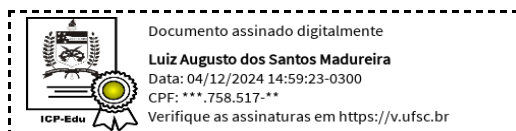
Prof. Dr. Luciano Vitali

Orientador



Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	8
2. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA.....	9
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1. Produtos de uso veterinário.....	10
3.2. Vitaminas.....	11
3.2.1. Vitamina A.....	11
3.2.2. Vitamina D.....	13
3.2.3. Vitamina E.....	14
3.3. Metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de vitamina lipossolúveis.....	16
3.4. Validação de metodologias analíticas para controle de qualidade.....	20
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo geral.....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
5. METODOLOGIA.....	24
5.1. Reagentes e Equipamentos.....	24
5.2. Preparo das soluções estoque das vitaminas A, D e E.....	24
5.3. Preparo da solução padrão.....	25
5.4. Preparo de amostra.....	25
5.5. Determinação das vitaminas lipossolúveis por HPLC-DAD.....	25
5.6. Parâmetros de mérito do método.....	26
5.6.1. Seletividade.....	26
5.6.2. Linearidade.....	27
5.6.3. Precisão.....	28
5.6.3.1. Repetibilidade.....	28
5.6.3.2. Precisão intermediária.....	28
5.6.4. Limites de detecção e quantificação.....	28
5.6.5. Exatidão.....	29

5.6.6. Robustez.....	29
5.7. Segurança no laboratório e destino dos resíduos gerados.....	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência.....	31
6.1.1. Seleção da fase estacionária e fase móvel.....	31
6.1.2. Efeito da temperatura e vazão na separação das vitaminas lipossolúveis..	36
6.1.3. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico.....	37
6.2. Validação da metodologia analítica.....	39
6.2.1. Seletividade.....	39
6.2.2. Linearidade.....	41
6.2.3. Precisão.....	42
6.2.4. Limites de detecção e quantificação.....	44
6.2.5. Exatidão.....	45
6.2.6. Robustez.....	46
6.3. Determinação do teor das vitaminas A, D e E na formulação farmacêutica...	48
7. CONCLUSÃO.....	50
8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL.....	51
9. REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do retinol.....	12
Figura 2: Estrutura dos ésteres de retinol.....	12
Figura 3: Estruturas do colecalciferol.....	13
Figura 4: Estrutura para a molécula de α -tocoferol.....	15
Figura 5: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 65% metanol e 35% acetonitrila.....	32
Figura 6: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 90% metanol e 10% acetonitrila.....	33
Figura 7: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 90% metanol e 10% isopropanol.....	34
Figura 8: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 70% metanol e 30% isopropanol.....	35
Figura 9: Avaliação da influência da temperatura da coluna na separação das vitaminas A, D e E.....	36
Figura 10: Cromatograma para a condição cromatográfica otimizada.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metodologias analíticas para vitaminas lipossolúveis conforme a USP 43-NF 38.....	17
Tabela 2: Condições cromatográficas para determinação das vitaminas A, D e E descritas na literatura.....	19
Tabela 3: Descrição dos instrumentos e reagentes.....	24
Tabela 4: Preparo das soluções amostra de degradação para avaliação da seletividade.....	26
Tabela 5: Preparação da curva de calibração.....	27
Tabela 6: Concentrações da curva de calibração.....	27
Tabela 7: Concentração dos analitos usados no estudo de exatidão.....	29
Tabela 8: Parâmetros alterados para avaliação da robustez do método proposto....	30
Tabela 9: Condição cromatográfica selecionada para a determinação dos analitos.	37
Tabela 10: Parâmetros de conformidade do sistema.....	38
Tabela 11: Parâmetros para avaliação da seletividade.....	40
Tabela 12: Coeficientes da curva de calibração para as vitaminas A, D e E.....	41
Tabela 13: Desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária a partir da área dos analitos.....	43
Tabela 14: Desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária a partir do tempo de retenção dos analitos.....	44
Tabela 15: Valores de LOD e LOQ para as vitaminas lipossolúveis a partir do método proposto.....	44
Tabela 16: Resultados de recuperação obtidos para as vitaminas A, D e E.....	45
Tabela 17: Parâmetros para avaliação da robustez e resultados obtidos para vitamina A.....	46
Tabela 18: Parâmetros para avaliação da robustez e resultados obtidos para vitamina D.....	47
Tabela 19: Parâmetros para avaliação da robustez e resultados obtidos para vitamina E.....	47
Tabela 20: Teor para as vitaminas A, D e E na amostra.....	49

RESUMO

Os produtos de uso veterinário são definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como substâncias ativas ou produtos elaborados destinados à prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças dos animais. Entre eles, estão os suplementos injetáveis compostos por vitaminas e que devem cumprir parâmetros de qualidade e segurança associados à identidade, eficácia, potência e segurança. Diante disso, foi proposto desenvolver e validar um método analítico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para a determinação das vitaminas A, D e E em uma nova formulação farmacêutica injetável. Além disso, a validação seguiu os critérios apresentados no Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela RDC n° 166 de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O método proposto emprega uma coluna C18 como fase estacionária e os solventes álcool isopropílico e álcool metílico na composição da fase móvel. O método proposto apresentou linearidade (vitamina A: 0,308 até 0,528 mg mL⁻¹; vitamina D: 0,0035 até 0,0060 mg mL⁻¹; vitamina E: 0,21 até 0,36 mg mL⁻¹), precisão (desvio padrão relativo menor que 1,20%), exatidão (recuperação entre 98,28% e 101,77%), limites de detecção e quantificação (LOD entre $1,00 \cdot 10^{-4}$ e $2,52 \cdot 10^{-2}$ mg mL⁻¹; LOQ entre $3,03 \cdot 10^{-4}$ e $7,64 \cdot 10^{-2}$ mg mL⁻¹), seletividade e robustez de acordo com os critérios exigidos pela legislação vigente. As atividades no laboratório de controle de qualidade do Laboratório Perini foram essenciais para compreender a função do químico em uma indústria farmacêutica, as etapas relacionadas ao processo produtivo dos medicamentos veterinários e as ações tomadas para garantir a qualidade dos medicamentos produzidos. As atividades no laboratório de controle de qualidade contribuíram para o desenvolvimento de habilidades relacionadas à organização do estoque de reagentes e das análises dos produtos utilizando a técnica de HPLC-DAD.

Palavras-chaves: medicamento veterinário, controle de qualidade, método analítico, vitaminas lipossolúveis.

1. JUSTIFICATIVA

O Laboratório Perini é uma indústria farmacêutica destinada à produção de medicamentos para uso veterinário. Os seus produtos tem como objetivo o tratamento da carência de vitaminas e minerais, favorecendo o desenvolvimento e o bem-estar dos animais. A garantia da qualidade é um conjunto de ações que tem como objetivo assegurar a segurança e a eficácia dos medicamentos fabricados, onde o controle de qualidade está inserido nas ações destinadas à garantia da qualidade do medicamento. Atualmente, o laboratório de controle de qualidade do Laboratório Perini atua na inspeção de matérias-primas, produtos em processo produtivo e produto acabado.

O desenvolvimento e validação de metodologias analíticas é uma etapa determinante na produção e controle de qualidade de novas formulações farmacêuticas. O método desenvolvido deve ser capaz de apresentar respostas proporcionais à concentração do analito e determinar a quantidade do analito presente na amostra com exatidão, precisão e sem interferências de matriz.

O estágio realizado teve como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para a determinação das vitaminas A (palmitato de retinol), D₃ (colecalciferol) e E (acetato de α -tocoferol) utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). O desenvolvimento foi conduzido com o intuito de verificar as condições instrumentais e de preparo de amostra adequadas para a separação, detecção e quantificação dos compostos de interesse. Na sequência, o método foi submetido aos ensaios descritos em documentos oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para validação de metodologias analíticas. Dessa forma, foi possível verificar a conformidade da metodologia analítica desenvolvida em relação aos critérios descritos pelos órgãos reguladores.

2. APRESENTAÇÃO DA EMPRESA

O Laboratório Perini é uma indústria farmacêutica fundada no ano de 1962 e está localizada no bairro Praia Comprida, em São José, Santa Catarina. O portfólio de produtos da empresa contém 8 produtos e são compostos por suplementos vitamínicos e minerais na forma de produtos injetáveis. Os produtos são comercializados em todo o território nacional e indicados para animais de produção (aves, bovinos e suínos) em situações de carência de vitaminas ou minerais e na prevenção de doenças, visando o bem-estar dos animais e o aumento da produtividade.

A empresa apresenta 10 funcionários distribuídos nos setores administrativo, produtivo e de garantia da qualidade. As instalações da empresa incluem depósito de matéria prima, sala de pesagem, sala de manipulação, sala de envase, área de esterilização, sala de quarentena para produto a granel, sala de embalagem e área para armazenamento do produto acabado. Além disso, a empresa possui duas salas destinadas ao setor de controle de qualidade. A primeira sala contém as bancadas e todos os instrumentos e vidrarias necessárias para a realização das análises físico-químicas. A segunda sala apresenta câmaras climáticas que possuem controle de temperatura e umidade, sendo destinadas aos estudos de estabilidades das formulações farmacêuticas. Ainda, também existe um armário e uma geladeira para armazenamento de reagentes controlados e sensíveis à temperatura, respectivamente.

O setor de controle de qualidade é responsável pela amostragem das matérias-primas adquiridas pela empresa, que são inicialmente armazenadas na área de quarentena para inspeção e realização das análises físico-químicas pertinentes. As análises variam de acordo com a natureza do material, incluindo as análises de aparência, densidade, pH, ponto de fusão e determinação do teor. Os produtos fabricados são avaliados durante e após o processo produtivo. As análises de teor no produto acabado para vitaminas são realizadas por meio de um HPLC-DAD, enquanto que as análises dos metais são realizadas em um espectrômetro de absorção atômica em chama (F AAS). Os ensaios realizados no laboratório de controle de qualidade visam assegurar a qualidade da matéria-prima recebida e dos medicamentos produzidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Produtos de uso veterinário

Os produtos de uso veterinários são definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio do Decreto nº 8.840 de 2016 como toda substância química, biológica, biotecnológica ou produto elaborado, sendo a sua aplicação de forma individual ou coletiva, direta ou acompanhada de alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais. Assim, são incluídos os aditivos, suplementos promotores, melhoradores de produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de ambiente e de equipamentos, pesticidas e outros produtos que possam ser utilizados nos animais ou no ambiente para proteção, restauração ou modificação de funções orgânicas e fisiológicas, ou ainda os produtos destinados ao embelezamento dos animais.¹

O MAPA estabelece requisitos de qualidade e segurança para as matérias-primas utilizadas e os produtos de uso veterinário fabricados. Dessa forma, as indústrias devem garantir as características dos produtos quanto à identidade, atividade, pureza, inocuidade, esterilidade, contagem e identificação de patógenos, eficácia, potência e segurança de acordo com a natureza do produto. Portanto, as partidas de produtos farmacêuticos estão sujeitas a caracterização físico-química (aparência, densidade e pH), dosagem dos princípios ativos na formulação e análise microbiológica (esterilidade e endotoxinas).²

O controle de qualidade é o setor responsável pela elaboração de ações com o objetivo de garantir as características de qualidade pré-estabelecidas para os lotes dos produtos fabricados.³ A determinação da concentração dos princípios ativos nos lotes de produto acabado deve empregar metodologias analíticas descritas em compêndios oficiais reconhecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ou metodologias analíticas desenvolvidas e validadas pelo laboratório responsável pela análise.^{3,4}

Os suplementos injetáveis usados no desenvolvimento e preservação da saúde animal contemplam uma grande variedade de vitaminas e minerais. Entre esses produtos existem os suplementos contendo as vitaminas A, D e E fabricados

em matriz oleosa e utilizados no tratamento da carência dessas vitaminas e no ganho de produtividade para animais de produção.

3.2. Vitaminas

As vitaminas são compostos imprescindíveis para o desenvolvimento e manutenção da saúde animal, atuando em processos metabólicos como cofatores de enzimas ou elementos reguladores. A necessidade dessas vitaminas ocorre em pequenas quantidades e que normalmente são obtidas a partir da ingestão dos alimentos ou através da síntese por microrganismos presentes no sistema digestivo.⁵ Contudo, a deficiência de vitaminas pode ocorrer em função de dieta inadequada, problemas de saúde e diferentes condições ambientais. A exposição inadequada dos animais à luz solar direta, por exemplo, pode promover níveis de vitamina D insuficientes e causar problemas associados à sua deficiência.⁶

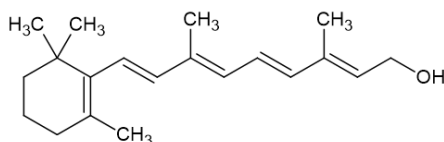
As vitaminas são divididas em dois grupos principais: as hidrossolúveis e as lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis compreendem as vitaminas do complexo B e a vitamina C. Por outro lado, as vitaminas lipossolúveis contêm as vitaminas A (retinol e carotenóides), D (ergocalciferol e colecalciferol), E (tocoferóis e tocotrienóis) e K (filoquinona, menaquinona e menadiona). As vitaminas lipossolúveis são encontradas na porção lipídica dos alimentos e nos animais são armazenadas no fígado e no tecido adiposo.^{5,7}

3.2.1. Vitamina A

A vitamina A é uma família de compostos baseados na estrutura do retinol (Figura 1) e dos carotenóides. As formas ativas no organismo animal são o ácido retinóico e o retinaldeído, onde a manutenção dos níveis de vitamina A em bovinos está diretamente relacionada à resposta imunológica, função reprodutiva e ao funcionamento da visão. As fontes naturais de vitamina A utilizam os carotenóides para produção da molécula de retinol e isso ocorre por meio de plantas superiores e outros organismos fotossintéticos. Em bovinos, a conversão de β -caroteno e outros carotenóides obtidos através da alimentação também pode ocorrer por meio de enzimas liberadas por células presentes na mucosa intestinal, mas a eficiência

dessa conversão é baixa devido a rápida degradação da vitamina A no organismo.^{7,8,9}

Figura 1: Estrutura do retinol.

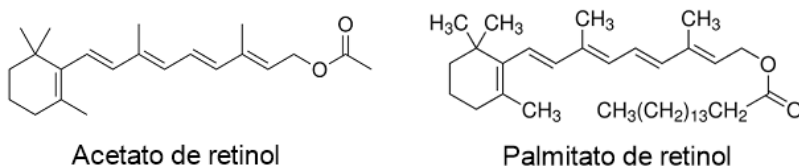


Fonte: O autor.

Em relação a reprodução de bovinos, a vitamina A promove o desenvolvimento e maturação dos espermatozóides. Ainda, contribui para a regulação do desenvolvimento folicular, ovulação e manutenção da gestação animal. Durante o desenvolvimento embrionário de bovinos, o retinol é essencial para a diferenciação celular, pois garante a formação adequada de tecidos e órgãos. Além disso, também promove a produção e ativação de osteoblastos, que são células que participam do desenvolvimento do tecido ósseo.^{7,9}

Os ésteres de retinol são derivados sintéticos do retinol, onde o acetato de retinol e o palmitato de retinol (Figura 2) são as duas formas mais empregadas na suplementação animal. As moléculas de palmitato de retinol e acetato de retinol podem ser obtidas através da esterificação do retinol com ácido palmítico e ácido acético, respectivamente.

Figura 2: Estrutura dos ésteres de retinol.



Fonte: O autor.

A determinação do retinol e seus derivados pode ser realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Dessa forma, pode ser empregada a cromatografia em fase normal ou fase reversa, sendo que a cromatografia em fase reversa gera picos mais definidos e apresenta maior reprodutibilidade do tempo de retenção.¹⁰

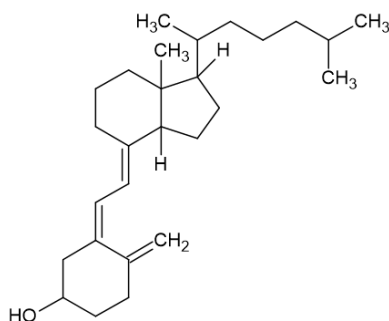
O coeficiente de partição ($\text{Log}P$) expressa a lipofilicidade da molécula e, consequentemente, a molécula é mais apolar se o seu valor de coeficiente de partição for maior. Assim, pode-se afirmar que o palmitato de retinol é mais apolar que o retinol, pois os valores de $\text{Log}P$ para as moléculas de retinol e palmitato de retinol são 7,6 e 15,5, respectivamente. A partir disso, o palmitato de retinol deve ser solúvel em solventes orgânicos (hexano, metanol, acetona e isopropanol) e insolúvel em água. Além disso, na cromatografia em fase reversa, a molécula de palmitato de retinol deve apresentar um tempo de retenção maior quando comparada com a molécula de retinol, pois haverá maior interação com a fase estacionária apolar.^{10, 11}

A detecção da molécula de vitamina A pode ocorrer pela absorção de radiação na região do UV-Vis em função das ligações duplas conjugadas presentes na molécula do retinol e seus derivados. A presença das ligações duplas conjugadas é responsável pela máxima absorção da molécula no comprimento de onda igual a 325 nm.¹⁰

3.2.2. Vitamina D

O grupo da vitamina D é composto pelas moléculas de ergocalciferol e colecalciferol (Figura 3). A obtenção do ergocalciferol (vitamina D₂) ocorre através da ingestão de alimentos de origem vegetal e o colecalciferol (vitamina D₃) é obtido pela ingestão de alimentos de origem animal. Além disso, os mamíferos são capazes de sintetizar a molécula de colecalciferol em suas peles pela exposição à luz solar.^{6,7}

Figura 3: Estruturas do colecalciferol.



Fonte: O autor.

A vitamina D desempenha uma função importante no crescimento ósseo e na manutenção do sistema imunológico de mamíferos. A suplementação de vitamina D favorece a absorção de minerais como cálcio e fósforo por meio do estímulo à produção de proteínas na mucosa intestinal e pelo aumento da taxa de reabsorção desses minerais nos túbulos renais. Dessa forma, ocorre o fortalecimento dos ossos e a diminuição da chance de fraturas. A paratuberculose é uma infecção causada pela bactéria *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) e pode ser associada a deficiência de vitamina D em bovinos. A infecção causa inflamação intestinal que afeta o ganho de peso dos animais e a produção de leite no caso das vacas leiteiras.^{6,12}

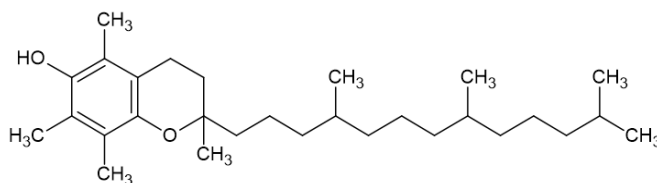
O desenvolvimento de métodos precisos e robustos para a determinação da vitamina D em medicamentos veterinários é um desafio devido a sua baixa concentração nas formulações farmacêuticas. A cromatografia líquida acoplada aos detectores de espectrometria de massas ou arranjo de diodos pode ser utilizada na determinação de vitamina D, sendo que o detector de arranjo de diodos apresenta menor sensibilidade, mas é mais acessível em função do seu menor custo. Em geral, os métodos que utilizam a cromatografia líquida em fase reversa apresentam longo tempo de análise e isso pode ser associado ao caráter apolar da vitamina D ($\text{Log}P = 8,7$)¹³ que favorece as interações com a fase estacionária apolar. Porém, a utilização da fase reversa produz picos mais definidos e apresenta maior reprodutibilidade. Devido ao seu caráter apolar, a vitamina D apresenta solubilidade em solventes orgânicos (hexano, metanol e isopropanol) e é insolúvel em água. Ainda, após a separação por cromatografia líquida, a vitamina D pode ser detectada utilizando arranjo de diodos, pois absorve radiação na região do UV-Vis devido à presença de ligações duplas conjugadas, sendo o seu comprimento de máxima absorção igual a 265 nm.^{14, 15}

3.2.3. Vitamina E

As moléculas que compõem o grupo da Vitamina E são baseadas na estrutura do tocoferol e do tocotrienol, onde o tocoferol possui uma cadeia alquílica saturada e o tocotrienol apresenta uma cadeia alquílica insaturada. Além disso, esses compostos também são divididos em isômeros alfa (α), beta (β), delta (δ) e

gama (γ) em função dos substituintes presentes no anel cromanol. A estrutura para a molécula de α -tocoferol é exibida na Figura 4 a seguir.¹⁶

Figura 4: Estrutura para a molécula de α -tocoferol.



Fonte: O autor.

A importância da vitamina E para o desenvolvimento dos animais é dada pela sua propriedade antioxidante, aumentando a taxa de crescimento em bovinos e a qualidade dos produtos cárneos e lácteos produzidos. A atividade antioxidante ocorre por meio da neutralização de radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) produzidos durante a oxidação de ácidos graxos insaturados. A molécula de α -tocoferol (vitamina E), por exemplo, é capaz de reagir com o radical peroxila formado e interromper a reação de propagação do mecanismo de oxidação de ácidos graxos insaturados. A partir disso, é produzido o radical α -tocoferoxil ($\alpha\text{-TO}\cdot$) e que apresenta uma atividade oxidante menor quando comparado com o radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$), pois o anel aromático presente em sua estrutura é capaz de estabilizar o elétron desemparelhado, diminuindo a sua energia e interrompendo a oxidação de ácidos graxos insaturados.^{8, 16}

A vitamina E é naturalmente encontrada em diversas espécies de plantas e permite a obtenção desse micronutriente pelos animais através da alimentação. A sua quantidade varia de acordo com a espécie da planta, momento da colheita e armazenamento do produto. O conteúdo de vitamina E diminui drasticamente após a colheita da planta e a silagem empregada na alimentação animal pode sofrer uma redução de 20% a 80% na concentração de vitamina E quando comparada a planta recém colhida. Portanto, a suplementação da vitamina E é uma alternativa na complementação da ingestão deste micronutriente.⁸

As técnicas de cromatografia gasosa (GC) e HPLC podem ser empregadas na determinação da vitamina E e seus derivados. Porém, a GC tem sido substituída pela HPLC na determinação da vitamina E em função da necessidade de etapas de derivatização e também pela sua baixa volatilidade, causando a sua degradação

pela utilização de elevada temperatura. Além disso, a HPLC em fase reversa apresenta melhores resultados de reprodutibilidade quando comparada à cromatografia em fase normal. As fases estacionárias mais utilizadas são C8, C18 e C30, que apresentam forte interação com a molécula de vitamina E em função da sua natureza apolar ($\text{Log}P = 10,5$)¹³. Devido ao seu carácter apolar, a vitamina E apresenta solubilidade em solventes orgânicos (hexano, metanol e isopropanol) e é insolúvel em água. Após a separação por HPLC, a vitamina E pode ser detectada utilizando um arranjo de diodos por meio da absorção de radiação na região do UV-Vis. O anel aromático apresenta ligações duplas alternadas que permitem a absorção da radiação em um comprimento de máxima absorção próximo a 290 nm.^{17, 18}

3.3. Metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de vitamina lipossolúveis

Os métodos descritos em compêndios oficiais e na literatura empregam a cromatografia líquida de alta eficiência para a separação das vitaminas A, D e E e detecção por meio do detector de arranjo de diodos.^{19, 20, 21, 22}

A separação das vitaminas A, D e E pode ser realizada através da cromatografia em fase normal ou em fase reversa.^{19, 20, 21, 22} A cromatografia em fase normal é caracterizada pela utilização de fase estacionária composta por materiais polares (ex.: sílica) e fase móvel composta por solventes apolares (ex.: hexano, acetato de etila, diclorometano, isopropanol (IPA), etc.). Por outro lado, a cromatografia em fase reversa apresenta fase estacionária composta por materiais apolares (ex.: octadecilsilano) e fase móvel polar (ex.: metanol, acetonitrila, água, isopropanol, etc.).²³

A detecção dos analitos utilizando um arranjo de diodos é possível devido a presença de ligações duplas conjugadas presentes na estrutura das moléculas. As ligações duplas isoladas absorvem radiação em comprimentos de onda menores que 200 nm em função da grande separação energética entre os orbitais π (HOMO) e π^* (LUMO). Entretanto, a conjugação de ligações duplas na molécula diminui a separação energética entre os orbitais moleculares π (HOMO) e π^* (LUMO), permitindo que transições eletrônicas ocorram a partir da absorção de menores energias ou maiores comprimentos de onda. Portanto, observando o número de

ligações duplas presentes nos analitos é esperado que o comprimento de onda de máxima absorção para molécula de palmitato de retinol seja maior que para a molécula de α -tocoferol que, por sua vez, apresenta um comprimento de onda maior que a molécula de colecalciferol.²⁴

A Farmacopéia Americana¹⁹ (USP 43-NF 38) estabelece metodologias analíticas para a quantificação das vitaminas A, D e E em solução oral em uma matriz oleosa. Os métodos utilizam a técnica HPLC-DAD para separação e detecção dos compostos presentes na amostra. As condições propostas pela USP 43-NF 38 para as vitaminas A, D e E são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Metodologias analíticas para vitaminas lipossolúveis conforme a USP 43-NF 38.¹⁹

IFA	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Concentração do IFA	Volume de injeção (μ L)	Comprimento de onda (nm)
Vitamina A	Sílica L8 4,6 x 150 mm	Hexano	1,0	13 μ g mL ⁻¹	40	325
Vitamina D	Sílica L8 4,6 x 150 mm	Hexano:IPA (99:1)	1,0	2 μ g mL ⁻¹	100	265
Vitamina E	C18 5 μ m 4,6 x 150 mm	Metanol:(Solução H ₃ PO ₄ 1:100) (19:1)	1,0	2 mg mL ⁻¹	50	291

Fonte: O autor.

As condições cromatográficas para as vitaminas A e D são baseadas na cromatografia em fase normal, onde a coluna L8 possui a fase estacionária composta por uma monocamada de aminopropilsilano em um suporte de sílica. O grupo aminopropilsilano possui maior interação com moléculas polares e, por consequência, a coluna L8 deve exibir uma baixa retenção das vitaminas A e D pela característica apolar das estruturas. A fase móvel empregada na análise da vitamina A é hexano, enquanto que a análise da vitamina D utiliza uma mistura de hexano e isopropanol (99:1, v/v). O caráter apolar da fase móvel possibilita a interação com os analitos e a eluição ao longo da coluna.

As condições cromatográficas para a determinação de vitamina E (tocoferol) ocorrem em fase reversa por meio da utilização de uma coluna de octadecilsilano

(C18), que possui cadeias de octadecilsilano ligadas na superfície das partículas de sílica que compõem a fase estacionária. Nesse caso, a interação entre fase estacionária e analito é maior em função do caráter apolar da fase estacionária.

Os comprimentos de onda propostos para a detecção das vitaminas A, D e E a partir dos métodos encontrados na Farmacopéia Americana (USP 43-NF 38) estão de acordo com a fundamentação teórica, onde o maior número de ligações duplas conjugadas na estrutura da molécula diminui a energia necessária para ocorrer uma transição eletrônica pela absorção de radiação UV-Vis.²⁴ O palmitato de retinol apresenta o maior número de ligações duplas conjugadas e, conseqüentemente, o maior comprimento de onda de máxima absorção que é igual a 325 nm. Em seguida, temos o acetato de α -tocoferol e o colecalciferol, que possuem comprimentos de onda de máxima absorção iguais a 291 e 265 nm, respectivamente.

As metodologias descritas na literatura para a determinação das vitaminas A, D e E incluem a HPLC em fase normal e em fase reversa. Alguns dos métodos propostos para a determinação dessas vitaminas em suplementos e outros produtos são exibidos na Tabela 2. As condições cromatográficas apresentadas foram selecionadas de acordo com os materiais disponíveis no laboratório de controle de qualidade.

Tabela 2: Condições cromatográficas para determinação das vitaminas A, D e E descritas na literatura.

Analito(s)	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Temperatura da coluna	Comprimento de onda (nm)
Vit. A; Vit. E; Vit. D. ²⁰	C18, 2 µm, 3,0 x 100 mm	35% MeCN : 65% MeOH	1,5	—	Vit. A: 325; Vit. D ₃ : 254; Vit. E: 284.
	C18, 2 µm, 4,6 x 100 mm	25% MeCN : 75% MeOH	4,0	—	
Vit. A; Vit. E. ²¹	C18, 5 µm, 4,6 x 150 mm	75% [0,1% (CH ₃ CH ₂) ₃ N em MeOH] : 25% EtOH.	0,8	35 °C	Vit. A: 325; Vit. E: 284.
Vit. A. ²²	C18, 3 µm, 4,6 x 150 mm	0-10 min.: 100% MeOH; 10-14 min.: 100% MTBE; 14-19 min.: 100% MeOH.	1,0	30 °C	Vit. A: 326.

Fonte: O autor.

As metodologias propostas por *Kurdi et al.*²⁰ promovem a separação das vitaminas A, D e E em um intervalo de tempo menor que 5 minutos. O tempo de análise é reduzido através da utilização de colunas C18 com menor comprimento (100 mm) e vazão de fase móvel elevada. Além disso, o tamanho reduzido das partículas presentes na coluna aumenta a superfície de interação, permitindo a separação efetiva dos analitos mesmo com tempo de análise reduzido.

O método proposto por *Abe-Matsumoto et al.*²¹ também emprega HPLC em fase reversa com a utilização de uma coluna C18 mais longa (150 mm) e com tamanho de partícula maior (5 µm). A molécula de palmitato de retinol apresenta menor polaridade quando comparada ao retinol e isso pode ser observado pelos valores de Log*P*, onde palmitato de retinol e o retinol apresentam valores de Log*P* iguais a 15,5 e 7,6, respectivamente. Assim, é observada uma maior interação do analito com os substituintes octadecilsilano que compõem a coluna e aumento do tempo de retenção. A utilização de etanol na composição da fase móvel é uma estratégia para diminuir o tempo de retenção do palmitato de retinol, pois o etanol é um solvente com caráter mais apolar quando comparado aos solventes acetonitrila e metanol.

O método desenvolvido e validado por *RIMKUS et al.*²² utiliza a HPLC em fase reversa com uma coluna C18 (3 µm, 4,6 x 150 mm) e propõe como fase móvel um gradiente composto por metanol e éter metil-terc-butilico (MTBE). O MTBE é um solvente mais apolar quando comparado com o etanol usado no método apresentado por *Abe-Matsumoto et al.*²¹ Dessa forma, a utilização do MTBE como constituinte da fase móvel tem como objetivo aumentar a força de eluição, diminuindo a polaridade da fase móvel e o tempo de retenção do palmitato de retinol.

A partir dos métodos encontrados na Farmacopéia Americana (USP 43) e na literatura foi demonstrada uma variedade de condições cromatográficas e diferentes matrizes para a análise das vitaminas A, D e E. Dessa forma, se faz necessária a realização de ensaios a partir da variação de cada uma das condições experimentais para investigar o comportamento dos analitos na amostra estudada. Após a definição do modo de separação cromatográfico, especificação da coluna, composição da fase móvel, temperatura da coluna e vazão adequados para a separação dos compostos de interesse é iniciado o processo de validação do método proposto.

3.4. Validação de metodologias analíticas para controle de qualidade

A validação da metodologia analítica consiste em um conjunto de ensaios experimentais que utilizam substâncias químicas de referência (SQR) e amostras similares ou idênticas ao produto de interesse. A sua realização tem como objetivo fornecer evidências de que o método proposto está de acordo com os critérios de aceitação para o uso pretendido. Dessa forma, a validação analítica é capaz de assegurar a qualidade metrológica dos resultados analíticos, atribuindo rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.^{4,25}

O processo de validação ocorre de acordo com um protocolo de validação, onde estão descritos a finalidade da metodologia, as condições experimentais e os parâmetros que serão avaliados. Os parâmetros analíticos estudados para a dosagem de princípio ativo em medicamentos veterinários são especificados pelo “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica” desenvolvido pelo MAPA, pela RDC N° 166 de 2017 da ANVISA e pelo “Procedimento de Validação Analítica

Q2(R2)” do ICH. Os parâmetros exigidos são seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.^{4, 25, 26}

A seletividade de um método analítico deve ser comprovada para garantir que o sinal obtido pelo equipamento é atribuído somente ao analito e não sofre influência de outros componentes presentes na amostra. Em métodos cromatográficos utilizando detector de arranjo de diodos, a seletividade é avaliada por meio da pureza cromatográfica do sinal do analito. A avaliação experimental é realizada através da comparação do sinal da amostra com amostras armazenadas sob condições de estresse como, por exemplo, exposição à luz ou ao calor, hidrólise ácida ou básica e oxidação. Dessa forma, é possível observar produtos de degradação e verificar se as condições cromatográficas são suficientes para fornecer a resolução e a pureza de pico necessárias para utilização do método.^{4, 25, 26}

A linearidade é empregada para avaliar se a metodologia apresenta variação do sinal analítico diretamente proporcional à concentração do analito em uma faixa de trabalho. De acordo com a RDC N° 166 de 2017 da ANVISA, os métodos utilizados na determinação de teor devem considerar uma faixa de trabalho de 80% a 120% da concentração do analito na amostra. A avaliação da linearidade deve ser realizada utilizando, no mínimo, 5 concentrações da SQR e em triplicata. A análise dos resultados é feita a partir da determinação do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente angular, onde o coeficiente de determinação deve exibir um valor maior que 0,990 e coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.^{4, 25, 26}

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito em que o instrumento é capaz de produzir um sinal detectável, mas essa concentração não deve ser necessariamente quantificável pelo método utilizado. Por outro lado, o limite de quantificação (LOQ) expressa a menor concentração que o método empregado é capaz de determinar o analito garantindo os critérios de precisão e exatidão.^{4, 25, 26}

A precisão do método é determinada para demonstrar a proximidade dos resultados obtidos através da análise de amostras independentes preparadas de acordo com o procedimento do método estudado. A avaliação da precisão pode ser realizada por meio da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo os resultados apresentados na forma de desvio padrão relativo (DPR) entre as medidas realizadas.^{4, 25, 26}

O ensaio de repetibilidade deve ser desenvolvido sob as mesmas condições de operação (analista, instrumento e dia) e utilizar 9 determinações em 3 concentrações distintas (baixa, média e alta) e com 3 réplicas. Além disso, também pode ser realizada pela análise de 6 determinações individualmente preparadas com concentração a 100%.^{4, 25, 26}

A precisão intermediária tem o objetivo de avaliar a influência de erros aleatórios por meio da análise de amostras em diferentes dias, com analistas distintos ou diferentes condições ambientais em um mesmo laboratório. A avaliação da precisão intermediária deve empregar a mesma concentração e o mesmo número de determinações realizadas ao longo do estudo de repetibilidade.^{4, 25, 26}

A exatidão é determinada a partir da comparação dos resultados obtidos através da metodologia em relação aos valores teóricos esperados. No caso dos produtos veterinários acabados, o estudo de exatidão é realizado por meio da análise de amostras preparadas pela adição de quantidades conhecidas de SQR ao placebo. Os níveis de concentração de princípio ativo avaliados são 80%, 100% e 120% da concentração na amostra e cada nível de concentração é preparado em triplicata.^{4, 25, 26}

A robustez de um método possui a função de caracterizar a sensibilidade do resultado analítico em relação à variação das condições experimentais. No caso da cromatografia líquida, os parâmetros que podem ser avaliados são composição da fase móvel, diferentes fabricantes de coluna, temperatura e vazão da fase móvel. Além disso, o preparo de amostras pode ser submetido ao estudo de robustez através da avaliação da estabilidade das soluções analíticas, tempo de extração e compatibilidade de filtros.^{4, 25, 26}

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação das vitaminas A, D e E em uma formulação farmacêutica para análises de rotina no setor de controle de qualidade.

4.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento do método de separação cromatográfico utilizando HPLC-DAD;
- Avaliação das condições de preparo de amostra;
- Validação da metodologia desenvolvida;
- Aplicação do método na determinação dos compostos alvo na formulação farmacêutica.

5. METODOLOGIA

5.1. Reagentes e Equipamentos

Os equipamentos, padrões primários e reagentes utilizados durante o desenvolvimento e validação do método são listados na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos instrumentos e reagentes.

Equipamento	Modelo	Fabricante
Cromatógrafo Líquido	LC-2050C 3D	Shimadzu
Balança analítica	ATY224R	Shimadzu
Banho ultrassônico	—	Mylabor
Vórtex	K45-2820	Kasvi
Micropipeta 0,10-1,00 mL	K1-1000B	Kasvi
Micropipeta 1,00-10,00 mL	K1-P10000	Kasvi
Balão volumétrico 50,00 ± 0,05 mL	—	longlass
Balão volumétrico 25,00 ± 0,03 mL	—	longlass
Balão volumétrico 10,00 ± 0,02 mL	—	longlass
Balão volumétrico 5,000 ± 0,002 mL	—	longlass
Reagente	Marca	Lote
Palmitato de retinol (PHR1235-1G)	Supelco	LRAD8036
Colecalciferol (1131009)	USP	R07150
Acetato de tocoferol (1667701)	USP	R03530
Álcool metílico	Êxodo Científica	2403272009
Acetonitrila	Êxodo Científica	2401180319
Álcool isopropílico	Êxodo Científica	2309185125

Fonte: O autor.

5.2. Preparo das soluções estoque das vitaminas A, D e E.

A solução estoque de vitamina A (palmitato de retinol, 1700000 UI/g) foi preparada transferindo 220,0 mg do padrão da vitamina para um balão volumétrico de 50,00 mL e completando o volume com isopropanol. A concentração final de palmitato de retinol é igual a 4,4 mg mL⁻¹.

A solução estoque de vitamina D (colecalfiferol, 99,8%) foi preparada transferindo 25,0 mg do padrão da vitamina para um balão volumétrico de 50,00 mL e completando o volume com isopropanol. Em seguida, uma alíquota de 5,00 mL foi transferida para um balão de 50,00 mL e o volume completado com isopropanol. As concentrações finais das soluções estoque de colecalfiferol são iguais a 0,5 mg mL⁻¹ e 0,05 mg mL⁻¹.

A solução estoque de vitamina E (acetato de α -tocoferol, 98,5%) foi preparada transferindo 75,0 mg do padrão da vitamina para um balão volumétrico de 25,00 mL e completando o volume com isopropanol. A concentração final de acetato de α -tocoferol é igual a 3,0 mg mL⁻¹.

5.3. Preparo da solução padrão

A solução padrão foi preparada a partir da diluição das soluções estoque das vitaminas A, D e E com isopropanol para uma concentração equivalente a 100% da concentração dos analitos na amostra. Dessa forma, a solução padrão contém 0,44 mg mL⁻¹ de vitamina A, 0,005 mg mL⁻¹ de vitamina D e 0,3 mg mL⁻¹ de vitamina E. Por fim, a solução padrão foi filtrada em filtro de PTFE 0,45 μ m.

5.4. Preparo de amostra

O produto analisado possui 110 mg mL⁻¹ de vitamina A (palmitato de retinol), 1,25 mg mL⁻¹ de vitamina D (colecalfiferol) e 75 mg mL⁻¹ de vitamina E (acetato de tocoferol). A amostra foi preparada pela diluição de 0,20 mL do produto em 10,00 mL de isopropanol e homogeneizada com o auxílio de um vórtex. Em seguida, uma alíquota de 0,20 mL foi diluída com isopropanol para um volume final de 1,00 mL. Por fim, a solução da amostra foi filtrada em filtro de PTFE 0,45 μ m.

5.5. Determinação das vitaminas lipossolúveis por HPLC-DAD

A otimização do método foi realizada a partir da variação dos parâmetros de fase estacionária, composição da fase móvel, temperatura da coluna, vazão de fase móvel e volume de injeção. As condições propostas foram testadas por meio da injeção da solução padrão preparada conforme o item 5.3.

O método otimizado utiliza a coluna Agilent Zorbax XDB-C18 (5 μm , 4,6 x 250 mm), fase móvel composta por 70% de metanol e 30% de álcool isopropílico em modo isocrático, vazão igual a 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção igual a 10 μL . As vitaminas A, D e E foram monitoradas no comprimento de onda igual a 270 nm. A configuração do equipamento, a aquisição e o tratamento dos dados foram realizados utilizando o software LabSolutions CS versão 5.110.

5.6. Parâmetros de mérito do método

5.6.1. Seletividade

As amostras para o estudo de seletividade foram preparadas em balões volumétricos de 10,00 mL de acordo com a condição de estresse proposta durante um período de exposição de 24 horas. A descrição do preparo das amostras é exibida na Tabela 4.

Tabela 4: Preparo das soluções amostra de degradação para avaliação da seletividade.

	Volume Produto (mL)	Volume HCl 0,01 M (mL)	Volume NaOH 0,01 M (mL)	Volume isopropanol (mL)
Amostra degradação ácida	0,2	0,1	—	5,0
Amostra degradação básica	0,2	—	0,1	5,0
Amostra degradação 24h	0,2	—	—	5,0

Fonte: O autor.

Após o período de 24h as amostras inicialmente acidificadas e alcalinizadas foram neutralizadas com as soluções de NaOH 0,01 M e HCl 0,01 M, respectivamente. Em seguida, foi adicionado álcool isopropílico para completar o volume total de 10,00 mL. Por fim, uma alíquota de 0,20 mL de cada amostra foi diluída para 1,00 mL com álcool isopropílico, filtrada em filtro de PTFE 0,45 μm e injetada no equipamento.

5.6.2. Linearidade

As soluções utilizadas no estudo de linearidade foram preparadas a partir das soluções estoque das vitaminas descritas no item 5.2. As diluições foram realizadas em balão volumétrico de 5,00 mL utilizando isopropanol como solvente conforme exibido na Tabela 5 apresentada abaixo.

Tabela 5: Preparação da curva de calibração.

Nível	Volume Solução Estoque Vitamina A 4,4 mg mL ⁻¹ (mL)	Volume Solução Estoque Vitamina D 0,050 mg mL ⁻¹ (mL)	Volume Solução Estoque Vitamina E 3,0 mg mL ⁻¹ (mL)
1	0,35	0,35	0,35
2	0,40	0,40	0,40
3	0,45	0,45	0,45
4	0,50	0,50	0,50
5	0,55	0,55	0,55
6	0,60	0,60	0,60

Fonte: O autor.

A concentração dos analitos avaliados em cada nível da linearidade é apresentada na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6: Concentrações da curva de calibração.

Nível	Concentração nominal da amostra	Concentração de Vitamina A (mg mL ⁻¹)	Concentração de Vitamina D (mg mL ⁻¹)	Concentração de Vitamina E (mg mL ⁻¹)
1	70%	0,308	0,0035	0,21
2	80%	0,352	0,0040	0,24
3	90%	0,396	0,0045	0,27
4	100%	0,440	0,0050	0,30
5	110%	0,484	0,0055	0,33
6	120%	0,528	0,0060	0,36

Fonte: O autor.

Os diferentes níveis de concentração foram preparados em triplicata, filtrados em filtro de PTFE 0,45 µm e injetados no equipamento.

5.6.3. Precisão

5.6.3.1. Repetibilidade

O estudo de repetibilidade foi realizado a partir do preparo de 6 réplicas independentes da amostra a 100% da concentração. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 5.4, sendo todas as réplicas preparadas sob as mesmas condições e analisadas no mesmo dia. A repetibilidade foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) da área e do tempo de retenção dos analitos. O cálculo do DPR é mostrado na Equação 1.

$$DPR \% = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \cdot 100\% \quad (1)$$

5.6.3.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária do método foi avaliada a partir do preparo de 6 réplicas independentes da amostra a 100% da concentração em dois dias de análise diferentes. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 5.4, sendo todas as réplicas preparadas sob as mesmas condições. A precisão intermediária foi

avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) da área e do tempo de retenção dos analitos. O cálculo do DPR é mostrado na Equação 1.

5.6.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados a partir do desvio padrão residual (σ) e do coeficiente angular (IC) da curva de regressão linear. O cálculo do LOD foi feito a partir da Equação 2.

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{IC} \quad (2)$$

O limite de quantificação foi calculado por meio da Equação 3.

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC} \quad (3)$$

5.6.5. Exatidão

O estudo de exatidão foi realizado por meio da adição de padrão ao placebo do produto em três níveis distintos de concentração, sendo 80, 100 e 120% da concentração nominal da amostra. Assim, foi adicionado 0,20 mL de óleo vegetal (placebo) em balão de 5,000 mL e seguido pela fortificação com as soluções estoque de padrão das vitaminas. Os três níveis de concentração foram preparados em triplicata e são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Concentração dos analitos usados no estudo de exatidão.

Nível	Concentração nominal da amostra	Concentração de Vitamina A (mg mL ⁻¹)	Concentração de Vitamina D (mg mL ⁻¹)	Concentração de Vitamina E (mg mL ⁻¹)
1	80%	0,352	0,0040	0,24
2	100%	0,440	0,0050	0,30
3	120%	0,528	0,0060	0,36

Fonte: O autor.

A recuperação dos analitos para cada nível de concentração foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração calculada}}{\text{concentração nominal}} \cdot 100 \quad (4)$$

5.6.6. Robustez

O ensaio de robustez foi realizado a partir da injeção em quintuplicata de uma solução padrão preparada conforme o item 5.3 e pela injeção de uma solução amostra preparada de acordo com o item 5.4. As injeções foram realizadas para a condição cromatográfica otimizada e para as condições de desafio conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros alterados para avaliação da robustez do método proposto.

Fase móvel	72% metanol : 28% isopropanol
	68% metanol : 32% isopropanol
Temperatura da coluna	38°C
	42°C
Vazão	0,9 mL min ⁻¹
	1,1 mL min ⁻¹

Fonte: O autor.

5.7. Segurança no laboratório e destino dos resíduos gerados

O laboratório de controle de qualidade do Laboratório Perini é um local com entrada controlada e com procedimentos para garantir a segurança dos analistas. A permanência no laboratório exige o uso de jaleco, calça comprida e calçado fechado. Ainda, existe o fornecimento de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), como luvas, máscaras e óculos de proteção. Os Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC) também estão presentes como, por exemplo, a capela de exaustão de gases, lava-olhos portátil e extintor de incêndio.

Os resíduos químicos produzidos durante as análises são acondicionados em recipientes de plástico específicos e destinados para uma empresa terceirizada responsável pelo tratamento e destinação adequada dos resíduos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência

6.1.1. Seleção da fase estacionária e fase móvel

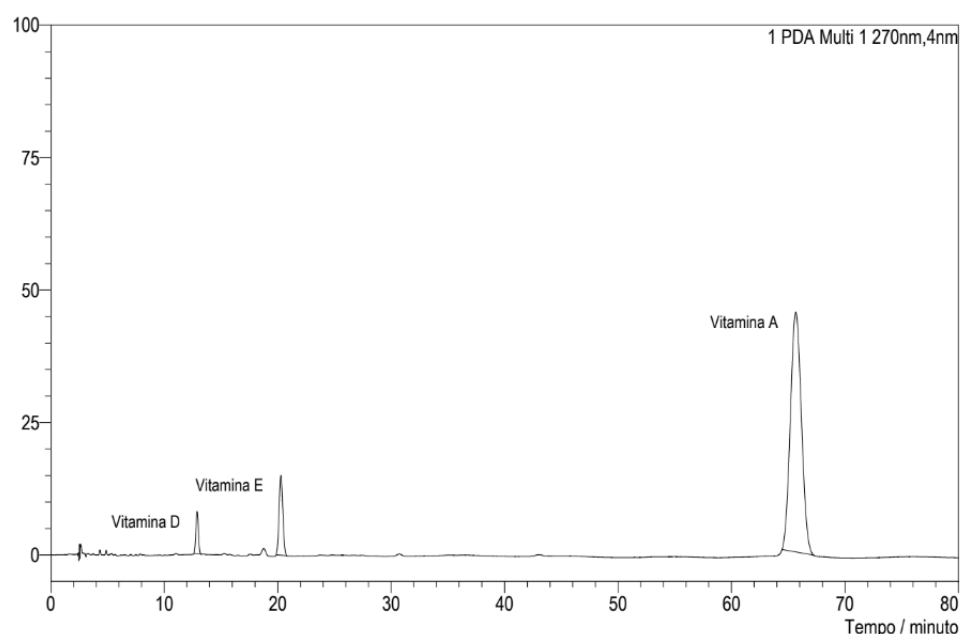
Os métodos cromatográficos apresentados pela Farmacopéia Americana (USP 43-NF 38) para a determinação das vitaminas A e D utilizam a cromatografia em fase normal. Porém, o laboratório não possui disponibilidade de colunas em fase normal e todos os métodos utilizados nas análises de rotina empregam a cromatografia em fase reversa. Dessa forma, a utilização de um método em fase normal exigiria consumo de tempo e solvente para adequar o sistema visando a análise de um único produto. Portanto, o modo cromatográfico em fase reversa utilizando uma coluna C18 foi escolhido para o desenvolvimento do método para a determinação das vitaminas A, D e E no produto em estudo.

As condições cromatográficas propostas pela Farmacopéia Americana para a determinação de vitamina E utilizam a fase reversa com uma coluna C18 (150 mm) e eluição isocrática com fase móvel composta por 95% de metanol e 5% de uma solução aquosa de ácido fosfórico (1:100). Contudo, só havia disponibilidade de colunas C18 com 250 mm de comprimento e, nesse caso, a separação dos sinais para as vitaminas A, D e E ocorreu em um tempo de análise muito longo.

Os métodos descritos na literatura por *Kurdi et al.*²⁰ e *Abe-Matsumoto et al.*²¹ para a análise das três vitaminas utilizam fases móveis compostas por misturas de metanol e acetonitrila em diferentes proporções. Essa composição de fase móvel mostrou-se adequada para colunas com menor comprimento (100 e 150 mm) e também poderia ser testada para fases estacionárias que causam menor retenção como, por exemplo, as colunas compostas por fase estacionária do tipo C8. Diante disso, misturas de metanol e acetonitrila foram testadas com uma coluna C18, dimensões iguais a 4,6 x 250 mm e tamanho de partícula igual a 5 µm.

Inicialmente, uma amostra preparada conforme o item 5.3 foi analisada em modo isocrático com fase móvel contendo 65% de metanol e 35% de acetonitrila. A vazão empregada foi de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna igual a 30 °C e volume de injeção igual a 10 µL. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 5.

Figura 5: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 65% metanol e 35% acetonitrila.

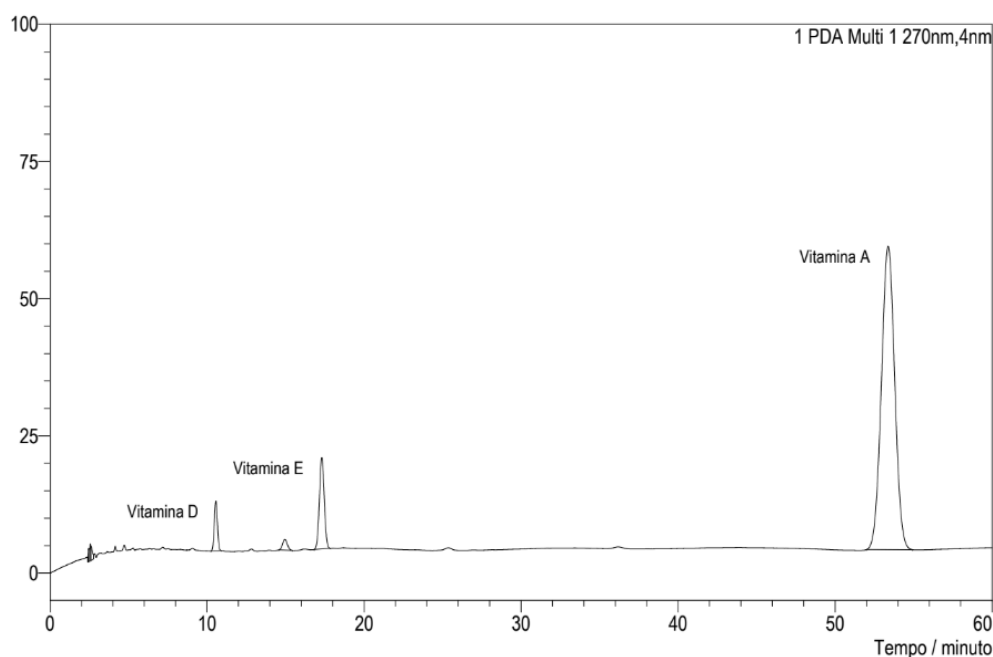


Fonte: Software LabSolutions CS.

É possível identificar três sinais no cromatograma que foram associados com os analitos estudados. A associação entre os sinais observados e os analitos foi feita a partir do espectro de absorção fornecido pelo equipamento, onde o comprimento de onda de máxima absorção para os sinais está de acordo com o comprimento de onda encontrado na literatura para cada analito. O sistema cromatográfico produziu a separação adequada dos analitos, mas necessitou de um tempo de análise de 70 minutos e que é muito elevado para análises de rotina.

Em seguida, as condições de vazão, temperatura da coluna e volume de injeção foram mantidas, mas a composição da fase móvel foi alterada para 90% de metanol e 10% de acetonitrila em modo isocrático. O cromatograma obtido é exibido na Figura 6.

Figura 6: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 90% metanol e 10% acetonitrila.



Fonte: Software LabSolutions CS.

Nessa condição foi observada uma diminuição do tempo de retenção e manutenção da separação dos analitos. A diminuição do tempo de retenção pode ser associada a menor polaridade do metanol em relação à acetonitrila. Conforme apresentado por *Snyder*²⁷, os índices de polaridade (P') para o metanol e acetonitrila são 5,1 e 5,8, respectivamente. Portanto, o menor valor de polaridade para o metanol e o aumento da sua fração na fase móvel causam uma maior competição pelos sítios da fase estacionária e uma maior interação entre as moléculas dos analitos com a fase móvel, diminuindo o tempo necessário para os analitos percorrerem a coluna cromatográfica.

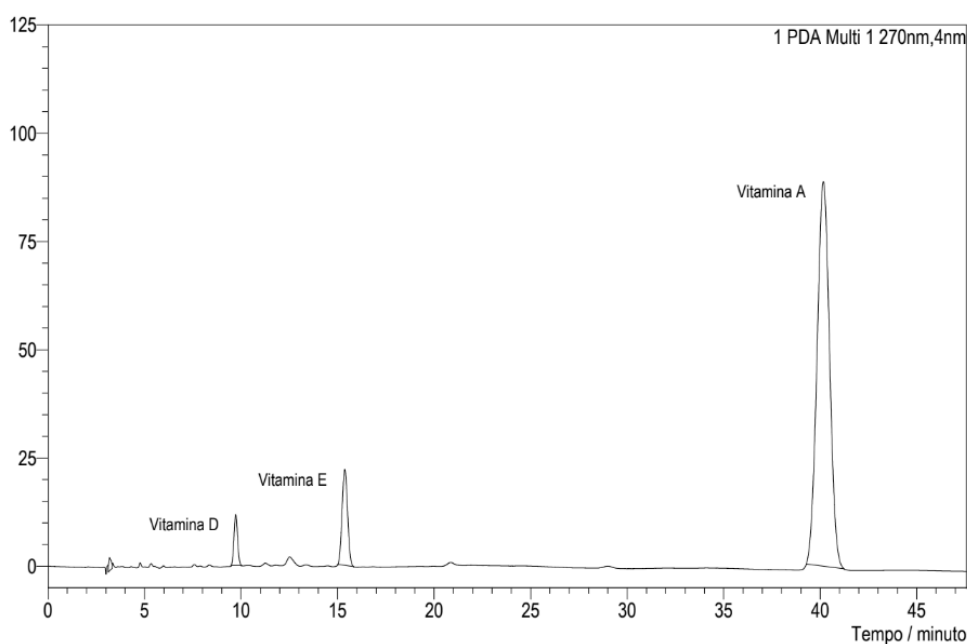
As composições de fase móvel testadas envolvendo metanol e acetonitrila apresentaram separação adequada dos analitos, mas o tempo de análise foi muito elevado considerando que o método será empregado para análises de rotina de um único produto. O principal desafio encontrado no desenvolvimento do método foi a elevada retenção para a molécula de palmitato de retinol (vitamina A). O palmitato de retinol apresenta uma maior cadeia de carbonos quando comparado ao colecalciferol (vitamina D) e ao acetato de α -tocoferol (vitamina E) e, consequentemente, é uma molécula mais apolar e possui uma maior afinidade pela

fase estacionária C18 utilizada. O maior caráter apolar do palmitato de retinol pode ser atestado a partir do seu maior valor de coeficiente de partição (LogP) igual a 15,5 quando comparado aos valores do colecalciferol e do acetato de α -tocoferol que são iguais a 8,7 e 10,5, respectivamente.

O método proposto por *RIMKUS et al.*²² utiliza uma fase móvel com caráter mais apolar formada por metanol e éter metil-terc-butilíco (MTBE) em modo gradiente. O laboratório não possui o solvente MTBE, mas foram avaliadas misturas de metanol e isopropanol como fase móvel com o intuito de reduzir o tempo de retenção do palmitato de retinol e garantir a separação dos analitos. Apesar de ser mais polar que o MTBE ($P'=2,5$) descrito na literatura, o isopropanol ($P'=3,9$) é um solvente que possui uma polaridade menor que os solventes metanol ($P'=5,1$) e acetonitrila ($P'=5,8$) testados anteriormente.²⁷ Entretanto, o isopropanol possui uma viscosidade maior quando comparado aos solventes convencionais e, por isso, deve-se monitorar a pressão do sistema ao longo das análises.

A primeira proporção avaliada para a fase móvel foi 90% de metanol e 10% de isopropanol em modo isocrático. A vazão empregada foi de 0,8 mL min⁻¹, temperatura da coluna igual a 30 °C e volume de injeção igual a 10 μ L. O cromatograma obtido é exibido na Figura 7.

Figura 7: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 90% metanol e 10% isopropanol.

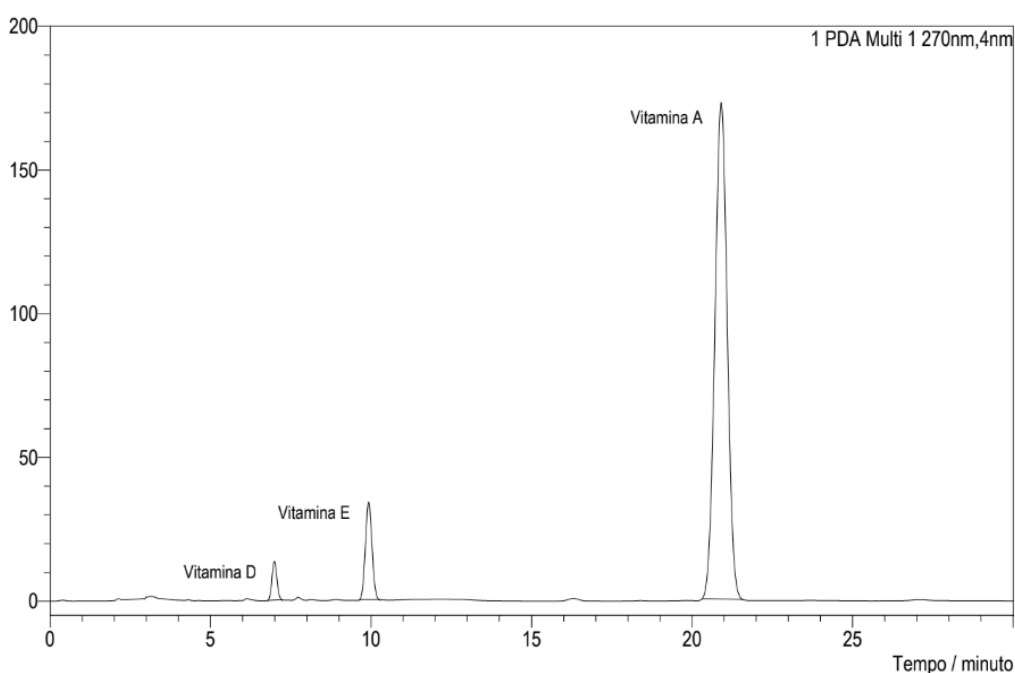


Fonte: Software LabSolutions CS.

Nessa condição foi observada a diminuição da retenção dos analitos na coluna, sendo o efeito mais pronunciado para a molécula de palmitato de retinol (vitamina A). A presença do isopropanol na fase móvel aumenta a interação dos analitos com a fase móvel em função da diminuição da polaridade. Além disso, a menor polaridade do isopropanol aumenta a competição pelos sítios da fase estacionária entre as moléculas dos analitos e da fase móvel, reduzindo o número de sítios da fase estacionária disponíveis para interação e, consequentemente, diminuindo o tempo de retenção dos analitos.

Em seguida, foram testadas proporções de fase móvel com maior concentração de isopropanol, onde foi observado que o incremento na concentração de isopropanol na fase móvel resultou em uma diminuição significativa no tempo de retenção para a vitamina A. Além disso, também foi alcançada uma separação adequada dos três analitos. Por fim, a fase móvel escolhida foi composta por 70% de metanol e 30% de isopropanol e o cromatograma obtido é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Cromatograma de separação das vitaminas para fase móvel composta por 70% metanol e 30% isopropanol.

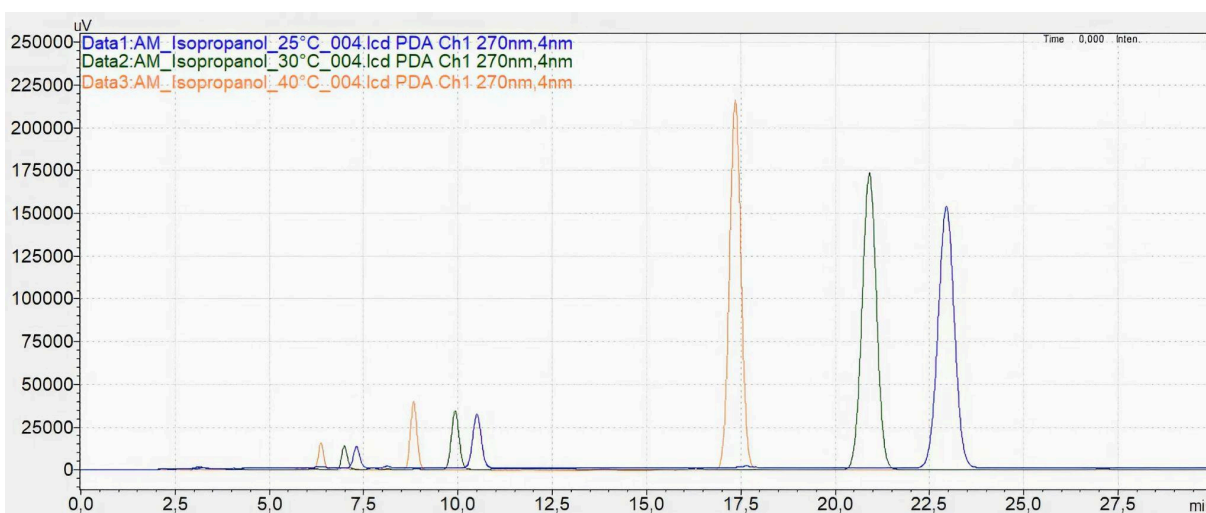


Fonte: Software LabSolutions CS.

6.1.2. Efeito da temperatura e vazão na separação das vitaminas lipossolúveis

A influência da temperatura da coluna, outro parâmetro que pode afetar as separações, também foi estudada na separação das vitaminas, onde foram avaliadas as temperaturas de 25, 30 e 40 °C. Os cromatogramas para as diferentes temperaturas avaliadas são apresentados na Figura 9.

Figura 9: Avaliação da influência da temperatura da coluna na separação das vitaminas A, D e E.



Fonte: Software LabSolutions CS.

A temperatura de 40 °C foi a condição escolhida, pois apresentou redução no tempo de retenção e aumento na intensidade do sinal para os analitos. Além disso, a utilização de uma maior temperatura auxilia na redução da viscosidade do isopropanol e diminui a pressão do sistema. A temperatura de 40 °C apresentou uma pressão de 43 bar ao longo da análise, enquanto que a temperatura de 25 °C registrou uma pressão de 53 bar durante a análise. Ainda, a vazão da fase móvel foi aumentada de 0,8 mL min⁻¹ para 1,0 mL min⁻¹ com a manutenção da separação dos analitos e diminuição do tempo de retenção.

6.1.3. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico

A descrição final das condições cromatográficas para a separação das vitaminas A, D e E é exibida na Tabela 9 a seguir.

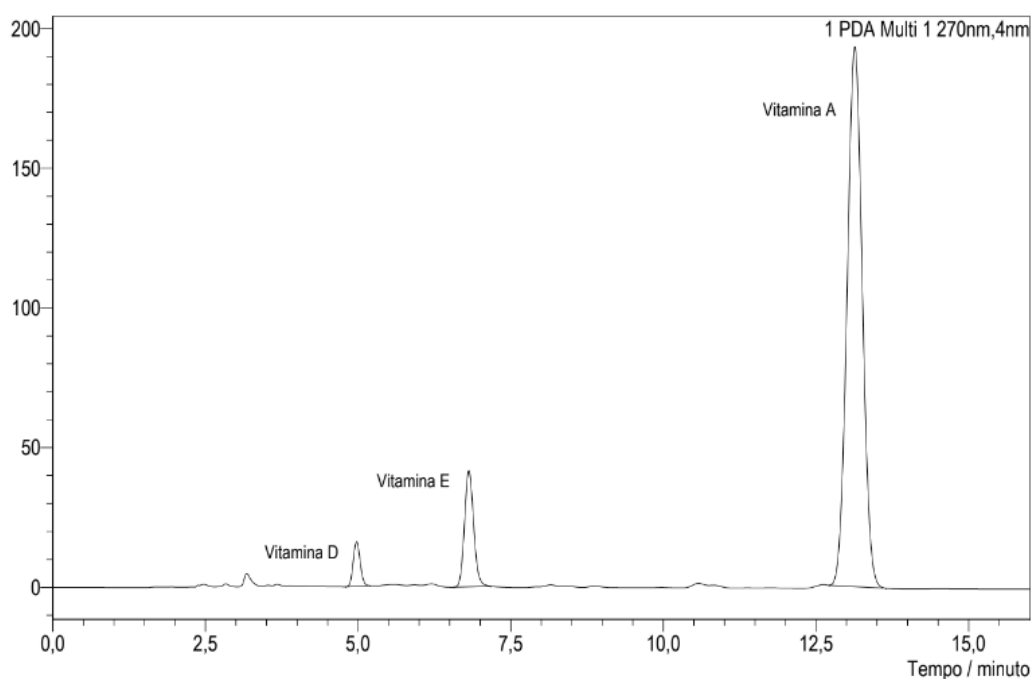
Tabela 9: Condição cromatográfica selecionada para a determinação dos analitos.

Fase estacionária coluna	Coluna Agilent Zorbax XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)
Fase móvel	Modo isocrático 70% metanol : 30% isopropanol (v/v)
Temperatura da coluna	40 °C
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL

Fonte: O autor.

O cromatograma obtido para a condição cromatográfica definida é ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Cromatograma para a condição cromatográfica otimizada.



Fonte: Software LabSolutions CS.

A identificação dos analitos ocorreu por meio do espectro de UV-Vis e também por fortificação das amostras com as soluções padrão de cada uma das vitaminas. Dessa forma, o aumento significativo de um determinado sinal indicou a identidade da vitamina enriquecida na amostra.

A adequabilidade do sistema envolve a avaliação dos fatores de assimetria, pureza de pico, número de pratos e resolução. Esses valores referentes às soluções padrão e amostra para o método proposto são fornecidos pelo software do instrumento e são exibidos na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros de conformidade do sistema.

		Pureza de pico	Fator de assimetria	Número de Pratos	Resolução
Solução Padrão	Vitamina A	1,000	1,024	12720	6,472
	Vitamina D	1,000	1,051	8184	2,764
	Vitamina E	1,000	1,066	9342	7,309
Solução Amostra	Vitamina A	1,000	1,022	12555	5,899
	Vitamina D	1,000	1,299	7451	2,214
	Vitamina E	1,000	1,064	9247	4,239

Fonte: O autor.

Os sinais obtidos para as vitaminas nas soluções padrão e amostra apresentaram pureza de pico maior que 0,99 indicando que os picos obtidos não são resultado da coeluição de moléculas e sobreposição de sinais. A pureza espectral está relacionada à homogeneidade do espectro de absorção na região do UV-Vis ao longo do período de tempo da integração do pico.

O fator de assimetria determinado para os analitos são adequados pois apresentam valores maiores que 0,8 e menores que 2,0. O fator de assimetria indica se a distribuição das moléculas de analito ao longo da eluição está concentrada em uma seção da coluna ou se ocorre a dispersão das moléculas ao longo da coluna. A dispersão das moléculas de analito ao longo da eluição causa a formação de “caudas” no sinal, onde uma cauda à esquerda do sinal no cromatograma indica que parte das moléculas está eluindo com um tempo de retenção menor e uma cauda à direita do sinal indica que parte das moléculas está eluindo com um tempo de retenção maior.

O número de pratos (NP) é outro fator importante na avaliação do cromatograma e expressa a performance e a eficiência da coluna empregada para a separação dos analitos e outros constituintes da amostra. Os valores de NP são calculados a partir da Equação 5 por meio do tempo de retenção (t_R) e da largura da base (w) do sinal. Os valores encontrados para os analitos através da coluna C18 utilizada são maiores que 2500 e, portanto, estão de acordo com os valores recomendados.

$$\text{Número de pratos} = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (5)$$

O valor de resolução reflete a eficiência das condições cromatográficas na separação dos sinais e depende da seletividade e retenção resultantes da escolha das fases estacionária e móvel. A resolução é calculada através da Equação 6 para um par de sinais utilizando os valores de tempo de retenção (t_R) e largura da base (w) para os dois sinais. Conforme os resultados exibidos na Tabela 10, os valores de resolução para o método proposto são maiores que 2,0 e estão de acordo com os critérios estabelecidos.

$$\text{Resolução} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_2 + w_1} \quad (6)$$

A escolha do comprimento de onda utilizado nas análises foi feita a partir das concentrações dos analitos na amostra. A vitamina D possui a menor concentração na amostra e para obter uma razão S/N (sinal/ruído) adequada foi necessário utilizar um comprimento de onda próximo do comprimento de máxima absorção para a vitamina D, que é igual a 265 nm. Porém, o comprimento de onda de 270 nm mostrou maior razão S/N quando comparado ao comprimento de 265 nm. Dessa forma, o valor de comprimento de onda igual a 270 nm foi escolhido para monitorar os três analitos e simplificar o tratamento de dados.

6.2. Validação da metodologia analítica

6.2.1. Seletividade

O ensaio de seletividade tem como objetivo definir se a presença de produtos de degradação na amostra são capazes de influenciar os parâmetros de adequabilidade do método e prejudicar a confiabilidade na determinação de teor dos

analitos. A formação dos produtos de degradação na amostra é forçada a partir da simulação de condições de estresse por meio da utilização de meio básico, ácido ou exposição à luz e temperatura ambiente por tempo determinado (24h). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Parâmetros para avaliação da seletividade.

Vitamina A				
	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Pureza de pico	Resolução(*)
Amostra	13,175	3140443	1,000000	16,739
Amostra 24h	13,190	3179884	1,000000	16,786
Amostra degradação ácida	13,029	3067489	1,000000	12,223
Amostra degradação básica	13,022	2909007	1,000000	12,197
Placebo	Não detectado			
Vitamina D				
	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Pureza de pico	Resolução(*)
Amostra	4,981	129233	1,000000	6,687
Amostra 24h	4,982	130511	1,000000	6,727
Amostra degradação ácida	4,967	131264	0,999999	8,446
Amostra degradação básica	4,958	133738	0,999999	3,563
Placebo	Não detectado			
Vitamina E				
	Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Pureza de pico	Resolução(*)
Amostra	6,829	368080	1,000000	7,116
Amostra 24h	6,833	371902	1,000000	7,154
Amostra degradação ácida	6,789	370963	1,000000	5,364
Amostra degradação básica	6,781	373844	1,000000	5,386
Placebo	Não detectado			

(*) O cálculo da resolução considera os sinais da vitamina e do produto de degradação mais próximo.

Fonte: O Autor.

A amostra analisada após 24h do seu preparo exibiu parâmetros semelhantes à amostra nominal e, dessa forma, é possível afirmar que a amostra apresenta estabilidade ao longo do tempo por um período de até 24h. Os valores de resolução apresentaram variações significativas para as amostras de degradação ácida e básica em função dos diferentes produtos de degradação formados. Dessa forma, a resolução foi avaliada entre os sinais dos produtos de degradação próximos aos sinais das vitaminas e que são diferentes para as amostras de degradação ácida ou básica. Assim, foi possível verificar que os produtos de degradação não interferem na determinação dos analitos, pois a pureza de pico e a resolução obtidas foram maiores que 0,99 e 2,0, respectivamente. Portanto, não há a coeluição de compostos distintos ou sobreposição de sinais nos cromatogramas indicando que o método é seletivo para a determinação dos analitos na presença de produtos de degradação.

A diminuição significativa da área para a vitamina A na presença das condições ácida e básica está associada à variação de pH imposta durante o teste, onde pode ocorrer a hidrólise do éster palmitato de retinol para formar o retinol e o ácido palmítico.

6.2.2. Linearidade

A faixa de linearidade avaliada para os analitos apresenta 6 níveis de concentração e compreende o intervalo de 70 a 120% da concentração nominal da amostra, sendo o intervalo determinado a partir dos critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conforme a RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.⁴ Os resultados de faixa linear, coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de determinação (R^2) para as vitaminas são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Coeficientes da curva de calibração para as vitaminas A, D e E.

Analito	Faixa Linear (mg mL⁻¹)	Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação (R²)
Vit. A	0,308 - 0,528	$7,89 \cdot 10^3$	$1,27 \cdot 10^2$	0,9909
Vit. D	0,0035 - 0,0060	$2,54 \cdot 10^4$	-3,03	0,9989
Vit. E	0,210 - 0,360	$1,38 \cdot 10^3$	9,85	0,9947

Fonte: O autor.

A sensibilidade do método proposto para os três compostos pode ser observada a partir dos valores elevados de coeficiente angular, indicando que as variações de concentração promovem variações significativas nos valores de área obtidos. Os valores de coeficiente de determinação (R²) maiores que 0,99 estão de acordo com os critérios exigidos e expressam a proximidade dos dados obtidos experimentalmente com a curva de regressão linear traçada pelo software.^{4,28} Além disso, é observado que esses valores são menores para as vitaminas A (R²=0,9909) e E (R²=0,9947) quando comparados com o valor encontrado para a vitamina D (R²=0,9989). Essa diminuição pode ser associada às concentrações das vitaminas A (0,44 mg mL⁻¹) e E (0,3 mg mL⁻¹) que são muito maiores que a concentração da vitamina D (0,005 mg mL⁻¹). A relação entre o sinal obtido pelo instrumento e a concentração do analito é regida pela Lei de Lambert-Beer, que relaciona a absorvância medida com a concentração do analito, absortividade molar do analito e caminho óptico. Dessa forma, desvios significativos podem ocorrer para concentrações elevadas do analito em função da alteração na absortividade molar causada pela interação entre as moléculas.

A avaliação do efeito matriz para o método proposto não foi realizada em função da natureza do produto que será analisado pelo método, onde a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que esse estudo só é necessário para insumos e produtos acabados de matriz complexa como, por exemplo, produtos fitoterápicos. As matrizes complexas são definidas como matrizes que contenham um número indefinido de substâncias não monitoradas e que não seja possível a sua obtenção sem a presença do analito. No caso do produto avaliado, a matriz pode ser obtida sem a presença dos analitos e não se faz necessário o estudo de interferência da matriz.²⁹

6.2.3. Precisão

A precisão do método proposto foi avaliada por meio da repetibilidade (precisão intradia) e da precisão intermediária (precisão interdía) com o objetivo de determinar a distribuição dos resultados de teor a partir da análise de amostras preparadas independentemente. A avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária ocorre por meio do valor de desvio padrão relativo (DPR %), que expressa a variação percentual do conjunto de dados em relação à média do conjunto. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os valores de DPR adequados devem ser definidos e justificados pelo laboratório que está desenvolvendo a metodologia em função da particularidade do método proposto e da amostra analisada. Dessa forma, os critérios adotados para a repetibilidade e a precisão intermediária são baseados na Tabela A4 do “Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements” publicado pela Association of Official Agricultural Chemist (AOAC), onde o DPR é estabelecido em função da concentração do analito na amostra. O nível mais rigoroso é o caso da análise de uma amostra contendo 100% do analito, onde o valor informado é igual a 1,3%. O próximo nível é associado às amostras contendo pelo menos 10% do analito e o valor informado é igual a 1,9%. Considerando que a amostra estudada não é formada apenas pelo analito, o segundo nível será utilizado como referência e, consequentemente, o valor máximo de DPR aceito na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária será igual a 2,0%.³⁰

O ensaio de repetibilidade considerou os resultados de 6 amostras preparadas independentemente conforme o item 5.4. A partir da repetibilidade é determinado se o procedimento de preparo de amostra e o método desenvolvido são capazes de reproduzir os resultados para amostras independentes preparadas sob as mesmas condições.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do preparo de 6 amostras independentes em dois dias diferentes e o procedimento de preparo das amostras está descrito no item 5.4. O intuito deste ensaio é avaliar a influência de fatores ambientais (temperatura, umidade, dias diferentes, etc.) sobre o resultado obtido para as amostras preparadas.

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária em função da área são exibidos na Tabela 13.

Tabela 13: Desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária a partir da área dos analitos.

	Vitamina A	Vitamina D	Vitamina E
Repetibilidade (DPR %)	0,49	0,64	0,57
Precisão intermediária (DPR %)	0,80	1,20	1,01

Fonte: O Autor.

A Tabela 13 mostra que os valores calculados de DPR para os analitos são inferiores ao valor estabelecido de 2,0% para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Portanto, o método desenvolvido está de acordo com os critérios exigidos.

A repetibilidade e precisão intermediária do método proposto também foram avaliadas em relação ao tempo de retenção dos analitos. Os valores de DPR são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Desvio padrão relativo (DPR) para repetibilidade e precisão intermediária a partir do tempo de retenção dos analitos.

	Vitamina A	Vitamina D	Vitamina E
Repetibilidade (DPR %)	0,038	0,077	0,059
Precisão intermediária (DPR %)	0,054	0,075	0,062

Fonte: O Autor.

Os resultados da Tabela 14 mostram valores de DPR inferiores a 2,0% para o tempo de retenção dos três analitos, indicando que as condições do método proposto garantem a reprodutibilidade para o tempo de retenção dos analitos ao longo das análises.

6.2.4. Limites de detecção e quantificação

Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para as vitaminas A, D e E são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de LOD e LOQ para as vitaminas lipossolúveis a partir do método proposto.

	IC	σ	LOD (mg mL ⁻¹)	LOQ (mg mL ⁻¹)
Vit. A	$7,89 \cdot 10^3$	$6,03 \cdot 10^1$	$2,29 \cdot 10^{-2}$	$7,64 \cdot 10^{-2}$
Vit. D	$2,54 \cdot 10^4$	$7,71 \cdot 10^{-1}$	$9,10 \cdot 10^{-5}$	$3,03 \cdot 10^{-4}$
Vit. E	$1,38 \cdot 10^3$	5,49	$1,19 \cdot 10^{-2}$	$3,97 \cdot 10^{-2}$

Fonte: O autor.

Os valores de LOD e LOQ encontrados para o método proposto são inferiores a concentração dos analitos na amostra. Portanto, o método pode ser aplicado para as análises das vitaminas no produto em estudo.

6.2.5. Exatidão

O ensaio de exatidão está relacionado à quantidade de analito recuperada pelo método em relação à quantidade de analito que foi adicionada nas amostras analisadas. A faixa de recuperação não é determinada pelo MAPA ou pela ANVISA e deve ser estabelecida pelo laboratório responsável pelo desenvolvimento e validação do método analítico. Assim, os critérios adotados para a exatidão são baseados na Tabela A5 do “Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements” publicado pela Association of Official Agricultural Chemist (AOAC), onde é estabelecido um intervalo de 98 a 102% de recuperação para amostras que contenham pelo menos 10% do analito.³⁰ Os resultados de recuperação são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados de recuperação obtidos para as vitaminas A, D e E.

Analito	Nível	Concentração nominal (mg mL ⁻¹)	Concentração calculada (mg mL ⁻¹)	Recuperação ± DPR (%)
Vitamina A	80 %	0,352	0,347	98,49 ± 0,06
	100 %	0,440	0,435	98,95 ± 0,41
	120 %	0,528	0,522	98,91 ± 0,37
Vitamina D	80 %	0,00400	0,00407	101,77 ± 1,30
	100 %	0,00500	0,00508	101,55 ± 0,10
	120 %	0,00600	0,00605	100,82 ± 0,58
Vitamina E	80 %	0,240	0,244	101,60 ± 0,15
	100 %	0,300	0,304	101,41 ± 0,53
	120 %	0,360	0,354	98,28 ± 0,23

Fonte: O Autor.

A partir dos dados expostos na Tabela 16 é observado que a recuperação percentual para os três analitos nos três níveis de concentração (80, 100 e 120%) está dentro do intervalo estabelecido de 98 a 102%. Além disso, o desvio padrão relativo (DPR %) para cada nível apresenta um valor inferior a 2,0%.

6.2.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da variação das condições de vazão, temperatura da coluna e proporção dos solventes na fase móvel com o intuito de verificar se a análise das soluções padrão e amostra preservam as condições de adequabilidade do método. As condições testadas ao longo do ensaio de robustez e os resultados obtidos para a vitamina A são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros para avaliação da robustez e resultados obtidos para vitamina A.

Condição		Solução Padrão					Solução Amostra			
		Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Pratos teóricos	Fator de simetria	Pureza	Tempo de retenção (min)	Teor (%)	Pureza	Robusto ?
Nominal		13,122	3268385	12702	1,024	1,000000	13,122	100,6	1,000	---
Variação de vazão	0,9 mL min ⁻¹	14,523	3578765	13595	1,021	1,000000	14,518	101,7	1,000	SIM
	1,1 mL min ⁻¹	11,907	2910523	11903	1,024	1,000000	11,907	102,0	1,000	SIM
Temperatura da coluna	38°C	13,578	3249410	12485	1,022	1,000000	13,560	100,9	1,000	SIM
	42°C	12,643	3225580	12870	1,025	1,000000	12,626	101,5	1,000	SIM
Proporção de fase móvel	72 MeOH : 28 IPA	13,844	3199652	13060	1,021	1,000000	13,843	102,2	1,000	SIM
	68 MeOH : 32 IPA	12,373	3171056	12349	1,025	1,000000	12,375	102,7	1,000	NÃO

Fonte: O Autor.

As condições testadas ao longo do ensaio de robustez e os resultados obtidos para a vitamina D são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Parâmetros para avaliação da robustez e resultados obtidos para vitamina D.

Condição		Solução Padrão					Solução Amostra			
		Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Pratos teóricos	Fator de simetria	Pureza	Tempo retenção (min)	Teor (%)	Pureza	Robusto ?
Nominal		4,981	127262	8196	1,052	1,000000	4,980	110,6	1,000	---
Variação de vazão	0,9 mL min ⁻¹	5,518	140126	8896	1,047	1,000000	5,514	110,9	1,000	SIM
	1,1 mL min ⁻¹	4,525	113216	7619	1,055	1,000000	4,523	115,8	1,000	NÃO
Temperatura da coluna	38°C	5,066	126930	8110	1,049	1,000000	5,063	110,4	1,000	SIM
	42°C	4,892	125663	8260	1,053	1,000000	4,884	111,1	1,000	SIM
Proporção de fase móvel	72 MeOH : 28 IPA	5,106	127571	8148	1,062	1,000000	5,101	108,0	1,000	NÃO
	68 MeOH : 32 IPA	4,843	143878	7381	1,481	1,000000	4,842	98,2	1,000	NÃO

Fonte: O Autor.

As condições testadas ao longo do ensaio de robustez e os resultados obtidos para a vitamina E são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Parâmetros para avaliação da robustez e resultados obtidos para vitamina E.

Condição		Solução Padrão					Solução Amostra			
		Tempo de retenção (min)	Área (mAU)	Pratos teóricos	Fator de simetria	Pureza	Tempo retenção (min)	Teor (%)	Pureza	Robusto ?
Nominal		6,817	421329	9344	1,066	1,000000	6,818	93,5	1,000	---
Variação de vazão	0,9 mL min ⁻¹	7,550	465484	10043	1,065	1,000000	7,546	93,9	1,000	SIM
	1,1 mL min ⁻¹	6,190	379890	8648	1,067	1,000000	6,190	93,9	1,000	SIM
Temperatura da coluna	38°C	6,966	419780	9194	1,063	1,000000	6,962	93,9	1,000	SIM
	42°C	6,659	418881	9412	1,068	1,000000	6,650	93,9	1,000	SIM
Proporção de fase móvel	72 MeOH : 28 IPA	7,052	418261	9567	1,071	1,000000	7,050	94,1	1,000	SIM
	68 MeOH : 32 IPA	6,564	416406	9034	1,062	1,000000	6,564	94,2	1,000	SIM

Fonte: O Autor.

A partir dos resultados expostos nas Tabelas 17, 18 e 19 é observado que os valores de área, número de pratos e pureza de pico para solução padrão não sofreram variação significativa em função das variações propostas para as condições cromatográficas. Entretanto, as variações de vazão e proporção dos solventes na fase móvel causaram uma variação de teor maior que 2,0% na solução amostra quando comparada com a condição cromatográfica nominal para as vitaminas A e D. Assim, o método desenvolvido não é considerado robusto frente a variação do fluxo ou composição da fase móvel.

6.3. Determinação do teor das vitaminas A, D e E na formulação farmacêutica

A aplicação do método proposto para a determinação dos analitos em uma amostra real é imprescindível durante o desenvolvimento e validação da metodologia. A formulação farmacêutica empregada foi preparada no próprio

laboratório de controle de qualidade na forma de um teste de bancada a partir da pesagem das matérias-primas e adição à matriz oleosa. A homogeneização do produto foi realizada com aquecimento (50 °C) e auxílio de um agitador magnético. Em relação ao preparo da amostra para análise, inicialmente foram avaliadas diferentes proporções de metanol e isopropanol como diluente, onde foi observado que a utilização do isopropanol puro resultou em melhores picos cromatográficos e maiores valores de razão S/N (sinal/ruído). Dessa forma, a amostra foi preparada utilizando somente isopropanol como diluente conforme apresentado no item 5.4 e em triplicata. Os valores para a determinação do teor das vitaminas no produto teste preparado em bancada são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Teor para as vitaminas A, D e E na amostra.

Amostra	Teor Vit. A (mg mL⁻¹)	Vit. A (%)	Teor Vit. D (mg mL⁻¹)	Vit. D (%)	Teor Vit. E (mg mL⁻¹)	Vit. E (%)
Amostra 1	0,422	96,0	0,00542	108,5	0,265	88,4
Amostra 2	0,419	95,2	0,00540	107,9	0,267	89,1
Amostra 3	0,417	94,8	0,00537	107,3	0,266	88,7
Valor médio ± DPR (%)	---	95,3 ± 0,6	---	107,9 ± 0,5	---	88,7 ± 0,4

Fonte: O Autor.

Os resultados de teor obtidos apresentaram desvio padrão relativo (DPR %) inferior a 2,0% e que está de acordo com os valores esperados após a determinação da precisão do método. A quantidade de vitaminas A e D recuperadas também está conforme os critérios exigidos de 90% a 120%. Porém, o teor encontrado para a vitamina E está abaixo do intervalo estabelecido e isso pode ser associado ao procedimento incorreto de preparo do teste de bancada por meio da homogeneização incompleta do produto ou degradação parcial do ativo pela exposição ao calor. Além disso, o teste de bancada não foi preparado no dia da análise e as vitaminas A e E são suscetíveis à degradação pela exposição à luz e à temperatura.

7. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida utilizando a HPLC-DAD é capaz de separar as vitaminas A, D e E em um tempo total de 14 minutos. Além disso, a validação mostrou que o método apresenta linearidade por meio do coeficiente de determinação maior que 0,99 e coeficiente angular elevado indicando a sensibilidade do método. Além disso, exibe precisão conforme os critérios exigidos com DPR menor que 2,0% para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão também apresentou resultados dentro do intervalo exigido de 98 a 102% para os três níveis de concentração avaliados. O método mostrou-se seletivo através dos ensaios de degradação forçada, onde foi verificado que a formação de produtos de degradação não causou interferência nos sinais associados aos analitos. A partir do ensaio de robustez foi estabelecido que o método não é robusto em relação à variações de vazão e proporção da fase móvel, mas apresenta robustez em relação a variações de temperatura na coluna.

A análise da amostra simulada mostrou que a metodologia desenvolvida e validada é capaz de determinar o teor das vitaminas A, D e E em uma amostra real. A maior intensidade e maior razão S/N (sinal-ruído) foi obtida através da diluição da amostra em isopropanol puro. Portanto, o método desenvolvido e validado apresenta potencial para ser aplicado no controle de qualidade do produto em estudo.

8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

O estágio realizado no Laboratório Perini permitiu a aplicação dos conhecimentos teóricos e experimentais adquiridos ao longo da graduação para resolução de problemas e necessidades associadas ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas e criação de procedimentos para análise de insumos e produtos acabados. As atividades no laboratório de controle de qualidade foram essenciais para compreender a função do químico em uma indústria farmacêutica, as etapas relacionadas ao processo produtivo dos medicamentos veterinários e as ações tomadas para garantir a qualidade dos insumos adquiridos e dos medicamentos produzidos.

A rotina do laboratório de controle de qualidade contribuiu para o desenvolvimento de habilidades em relação ao desenvolvimento e validação de novas metodologias analíticas, organização de atividades associadas às análises de produtos e controle de estoque de reagentes e padrões. Além disso, a utilização dos instrumentos de HPLC-DAD e F AAS nas análises de rotina contribuíram para o conhecimento prático das duas técnicas analíticas, além dos cuidados em relação ao preparo das amostras e manutenção dos equipamentos.

9. REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **DECRETO Nº 8840, DE 24 DE AGOSTO DE 2016**. Altera o Anexo ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, que aprova o Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/decreto-lei-e-lei/decreto-federal-no-8840-de-24-08-2016.pdf/view>>.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **DECRETO Nº 5053, DE 22 DE ABRIL DE 2004**. Aprova o Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/decreto-lei-e-lei/decreto-federal-no-5053-de-22-04-2004.pdf/view>>.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 3 DE OUTUBRO DE 2003**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-mapa-no-13-de-3-10-2003.pdf>>.
4. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <<https://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/353660>>.
5. Ferreira JM de S, Almeida CA, Pessoa RM dos S, Gois GC, Campos FS, Vicente SLA et al. **Vitaminas e minerais na nutrição de bovinos**. Rev Colombiana Cienc Anim. Recia. 2023; 15(2):e969. <https://doi.org/10.24188/recia.v15.n2.2023.969>.
6. Hodnik JJ, Ježek J and Starič J (2020). **A review of vitamin D and its importance to the health of dairy cattle**. Journal of Dairy Research 87(S1), 84–87. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000424>.
7. HERRERO, M. **Liquid Chromatography | Food Applications**. Encyclopedia of Analytical Science, Third Edition, 64-74 (2019). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.00290-0>.
8. VALADARES et al. **Vitamins for beef cattle**. Editora Scienza eBooks, 353–378, 6 jul. 2023. <http://dx.doi.org/10.26626/978-85-8179-194-4.2023.C015.p.353-378>.
9. JENKINS, O.; SHASTAK, Y.; PELLETIER, W. **Chapter 2 Balancing Vitamin A Supply for Cattle: A Review of the Current Knowledge**. In: Advances in Animal Science and Zoology. Volume 21. p. 33-53 (2023). Disponível em:

<<https://www.novapublishers.com/wp-content/uploads/2023/11/Advances-in-Animal-Science-and-Zoology.-Volume-21-Chapter-2.pdf>>.

10. VAN WAYENBERGH, E. et al. **A simple method for analysis of vitamin A palmitate in fortified cereal products using direct solvent extraction followed by reversed-phase HPLC with UV detection.** Food chemistry, v. 404, n. 134584, p. 134584, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134584>.
11. Scientific Committee on Consumer Safety. **Opinion on Vitamin A (Retinol, Retinyl Acetate, Retinyl Palmitate).** SCCS/1576/16, 20 April 2016, final version of 6 October 2016, CORRIGENDUM on 23 December 2016. Disponível em: <https://health.ec.europa.eu/document/download/f1881bcd-ee58-4d42-9701-3feaaa26de61_en>. Acesso em: 03 de novembro de 2024.
12. ALAGAWANY, M. et al. **Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health - a comprehensive review.** The Veterinary quarterly, v. 41, n. 1, p. 1–29, 2020. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1857887>.
13. KWAN, Y. H. et al. **Essential monographs. Em: Handbook of Cosmeceutical Excipients and their Safeties.** [s.l.] Elsevier, 2014. p. 75–314. <https://doi.org/10.1533/9781908818713.75>.
14. GOHAR, M. S. et al. **Development and validation of novel HPLC methods for quantitative determination of vitamin D3 in tablet dosage form. Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 17, n. 4, p. 505, 2024. <https://doi.org/10.3390/ph17040505>.
15. RASHIDI, L.; NODEH, H. R.; SHAHABUDDIN, S. **Determination of vitamin D3 in the fortified sunflower oil: Comparison of two developed methods.** Food analytical methods, v. 15, n. 2, p. 330–337, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02124-y>.
16. IDAMOKORO, E. M. et al. **Multifunctional activity of vitamin E in animal and animal products: A review.** Animal science journal, v. 91, n. 1, p. e13352, 2020. <https://doi.org/10.1111/asj.13352>.
17. ZAABOUL, F.; LIU, Y. **Vitamin E in foodstuff: Nutritional, analytical, and food technology aspects.** Comprehensive reviews in food science and food safety, v. 21, n. 2, p. 964–998, 2022. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12924>.
18. GAMNA, F.; SPRIANO, S. **Vitamin E: A review of its application and methods of detection when combined with implant biomaterials.** Materials, v. 14, n. 13, p. 3691, 2021. <https://doi.org/10.3390/ma14133691>.
19. United States Pharmacopeia (2024). **Dietary Supplement Monographs, Oil-Soluble Vitamins Oral Solution.** USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. https://doi.org/10.31003/USPNF_M7168_01_01.

20. S. El Kurdi et al.: **Comparing monolithic and fused core HPLC columns for fast chromatographic analysis of fat-soluble vitamins**. Acta Pharm. 67 (2017) 203–213. <https://doi.org/10.1515/acph-2017-0013>.
21. ABE-MATSUMOTO, L. T.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M. **Do the labels of vitamin A, C, and E supplements reflect actual vitamin content in commercial supplements?**. Journal of food composition and analysis, v. 72, p. 141–149, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.001>.
22. RIMKUS, G. G. et al. **Rapid direct analysis of retinyl palmitate (vitamin A) in fortified vegetable oils by HPLC-FLD**. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, v. 39, n. 1, p. 24–34, 2022. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1977854>.
23. HARRIS, Daniel C.; LUCY, Charles A.. **Análise química quantitativa**. 9. ed. Rio de Janeiro: Ltc - Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., 2017.
24. SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig B.. **Química orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Ltc - Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., 2012.
25. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2011.
26. ICH. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH HARMONISED GUIDELINE. **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2)**. 01 de novembro de 2023. Disponível em: <<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>>.
27. SNYDER, L. R. **Classification off the Solvent Properties of Common Liquids**. Journal of Chromatographic Science, v. 16, n. 6, p. 223–234, 1 jun. 1978. <https://doi.org/10.1093/chromsci/16.6.223>.
28. EUGÉNIA GRAÇA MARTINS, M. **Coeficiente de correlação amostral**. Revista de Ciência Elementar, v. 2, n. 2, 30 jun. 2014. <http://doi.org/10.24927/rce2014.042>.
29. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perguntas e Respostas - RDC 166/2017 e Guia nº 10/2017 - Edição 1 - Março/2018**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-respostas-rdc-166-2017/view>>.
30. LATIMER, G. W. (ED.). **Appendix F - Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 4 jan. 2023. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.005.006>.



Medicamentos Veterinários

DECLARAÇÃO DE CARGA HORÁRIA DE ESTÁGIO

O Laboratório Perini LTDA, inscrito sob CNPJ 86.183.704.0001-62, localizado na Rua Domingos Filomeno, nº 95, bairro Praia Comprida, cidade de São José/SC, declara que o aluno Paulo Juliano Pitz, portador do CPF nº [REDACTED] regularmente matriculado no Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob número de matrícula 19100063, realizou ESTÁGIO OBRIGATÓRIO referente à disciplina Estágio Supervisionado (QMC 5515) em suas dependências, no período de 08/07/2024 a 23/10/2024, totalizando 450 horas referente ao semestre 2024.2.

A instituição de ensino UFSC, a qual o aluno está regularmente matriculado, possui vínculo com esta empresa e teve seu projeto de estágio e conclusão de curso supervisionado pelo farmacêutico Lucas de Oliveira, CRF/SC nº 19128, CPF nº [REDACTED]

São José, 13 de novembro de 2024.

SECRETARIA DE PAZ
DE CAMPINAS

Lucas de Oliveira

CRF/SC nº 19128

Gerente Geral – Laboratório Perini LTDA



Documento assinado digitalmente

Paulo Juliano Pitz

Data: 04/12/2024 13:29:17-0300

CPF: ***.753.119-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Paulo Juliano Pitz

Estagiário

