

Edilene Afonso Vieira

**Desenvolvimento e validação de método analítico para
determinação de parabenos no medicamento
paracetamol, nas formulações solução e suspensão
orais**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Vigilância em Saúde Pública
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Costa Pires

**São Paulo
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Vieira, Edilene Afonso

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de parabenos no medicamento paracetamol, nas formulações solução e suspensão orais/Edilene Afonso Vieira. - 2022.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientação: Profª. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

1. Validação. 2. Paracetamol. 3. Formulação farmacêutica. 4. Parabenos.

SES/CCD/CD - 452/2022

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

A Pesquisa foi realizada no Núcleo de Ensaaios Físicos e Químicos em Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente ao meu bondoso Deus, pela oportunidade de obter essa vitória diante de muitas outras já conquistadas. Porque dele, e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.

Dedico ao meu querido pai Gregorio Afonso Vieira (*in memoriam*) pelo amor, dedicação e esforço que sempre me prestou para que eu conseguisse chegar até aqui. De igual modo à minha querida mãe Nilza Ferreira Guimarães Vieira pelo amor incondicional e pela oportunidade de vida a mim concedida por duas vezes. Aqueles que acompanharam minha história saberão a que me refiro. Vocês são meus pilares e exemplo de vida.

Dedico aos meus irmãos Neide Afonso Vieira, Nilson Afonso Vieira, Nilzete Afonso Vieira, José Nairson Afonso Vieira, Maria Cleoneide Vieira, José Cleonilso Vieira e Eder Afonso Vieira por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida, que souberam entender os períodos de ausência do meu convívio com tanta generosidade e constantes palavras de estímulo.

Dedico a alguém muito especial que sempre esteve presente na minha vida, minha vizinha Marcelina Dominga de Jesus, exemplo de mulher guerreira e justa, uma admirável ser humana.

A todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram em tudo.

Amo a todos, incondicionalmente, infinitamente mais.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de fazer meu agradecimento a uma pessoa muito especial, que desde o primeiro dia me senti acolhida pelo seu olhar. Abraçou esse sonho comigo e trilhou um caminho cheio de desafios que foi finalizado com grande vitória, a minha querida orientadora Professora Dr^a Maria de Fátima Costa Pires. Obrigada pelo seu apoio, dedicação, carinho nas palavras e acolhimento. Gratidão por tudo.

Agradeço à pesquisadora Luz Marina Trujillo, pessoa muito iluminada que sempre acreditou e apoiou a minha evolução profissional. Obrigada por cada palavra de incentivo e amizade.

Agradeço ao Instituto Adolfo Lutz e a CCD pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho.

Aos colegas do NFQM, em especial Helena, Elizabeth, Fernanda (NFQC), Fernando e Juarez que compreenderam a agitação vivenciada durante a realização deste projeto, me auxiliando e apoiando em tempo o todo.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves, Prof. Dr. Nilton José Fernandes Cavalcante e Prof^a Dr^a Valeria Adriana Pereira Martins pela avaliação e contribuição neste trabalho.

A Assessora da Secretaria da CPG-CCD, Tirces Francine Guilherme Martins pelo carinho e dedicação prestados em todos os momentos desta jornada.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo

O paracetamol é um medicamento com ação analgésica e antitérmica pertencente à classe farmacológica dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES) e são classificados como Medicamento Isento de Prescrição (MIP). Em cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF), o paracetamol pode conter na formulação parabenos, estes, sendo um excipiente de ação conservante. Os parabenos são os conservantes mais usados para garantir a estabilidade dos medicamentos, podendo ser utilizados nas formulações separadamente ou em combinação, sendo os mais frequentes: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para determinar e quantificar os conservantes metilparabeno e propilparabeno com o paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais. A metodologia analítica desenvolvida foi por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa e modo isocrático, validada com base nas diretrizes da ANVISA (RDC 166/2017) e do Conselho Internacional para Harmonização (ICH-Q2R1). Um sistema de fase móvel constituído de água acidificada com ácido fosfórico 0,1% e metanol (65:35 v/v) em pH 5.0 foi utilizado em uma coluna Zorbax Eclipse XDB-CN 4,6x150mm, 5 μ m com fluxo de 1mL/min a 20°C em 245nm, garantindo um tempo de corrida menor que 8 minutos, demonstrando uma boa separação dos três analitos do estudo. O método proposto foi linear nos intervalos de 100,4 μ g.mL⁻¹ a 502,4 μ g.mL⁻¹ para paracetamol, 1,03 μ g.mL⁻¹ a 9,29 μ g.mL⁻¹ para metilparabeno e 1,03 μ g.mL⁻¹ a 3,10 μ g.mL⁻¹ para propilparabeno. Os desvios padrão relativos para exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária) e robustez foram inferiores a 2%. O ativo paracetamol e os conservantes metilparabeno e propilparabeno apresentaram variabilidade na estabilidade avaliada nos processos de oxidação, hidrólise ácida e básica. Nos bancos de informação utilizados neste trabalho, não foi encontrada legislação nacional e internacional que estabeleça teste de identificação e teste de determinação de conteúdo com critérios de aceitação e limites de concentração para cada conservante presente na formulação farmacêutica. Desta forma, o método desenvolvido pode ser aplicado para quantificação do teor de metilparabeno e propilparabeno no processo de fabricação do paracetamol, empregado nos laboratórios e indústrias farmacêuticas para o controle de qualidade das futuras

formulações desse medicamento. Pode ser aplicado também nos laboratórios oficiais para monitoramento do teor de conservantes, fornecendo subsídios para a criação de legislação específica que estabeleça os limites máximos permitidos.

Palavras chave: validação, paracetamol, formulação farmacêutica, parabenos.

Abstract

Paracetamol is a drug with analgesic and antipyretic action belonging to the pharmacological class of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and are classified as Over-the-Counter Drugs (OTCs). In compliance with Good Manufacturing Practices (GMP), paracetamol can contain parabens in its formulation, these being an excipient with preservative action. Parabens are the most commonly used preservatives to ensure drug stability, and they can be used in formulations separately or in combination, the most frequent ones being: methylparaben, ethylparaben, propylparaben, and butylparaben. The objective of this work was to develop and validate an analytical method to determine and quantify the preservatives methylparaben and propylparaben with paracetamol in the pharmaceutical forms oral solution and suspension. The analytical methodology developed was by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) in reverse phase and isocratic mode, validated based on ANVISA (RDC 166/2017) and International Council for Harmonisation (ICH - Q2R1) guidelines. A mobile phase system consisting of water acidified with 0.1% phosphoric acid and methanol (65:35 v/v) at pH 5.0 was used on a Zorbax Eclipse XDB-CN 4.6x150 mm, 5 μm column with a flow rate of 1 mL/min at 20°C at 245nm, ensuring a run time of less than 8 minutes, demonstrating good separation of the three study analytes. The proposed method was linear in the ranges of 100.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 502.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for paracetamol, 1.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 9.29 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for methylparaben and 1.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 3.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for propylparaben. The relative standard deviations for accuracy, precision (repeatability and intermediate) and robustness were less than 2%. The active ingredient paracetamol and the preservatives methylparaben and propylparaben presented variability in the stability evaluated in the oxidation, acid and basic hydrolysis processes. In the databases used in this work, no national or international legislation was found that establishes identification test and content determination test with acceptance criteria and concentration limits for each preservative present in the pharmaceutical formulation. Thus, the method developed can be applied to quantify the content of methylparaben and propylparaben in the manufacturing process of paracetamol, employed in laboratories and pharmaceutical industries for quality control of future formulations of this drug. It can also be applied in official laboratories to monitor

the content of preservatives, providing subsidies for the creation of specific legislation that establishes the maximum permitted limits.

Keywords: validation, paracetamol, pharmaceutical formulation, parabens.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AINES	Anti-inflamatório Não Esteroidal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FB	Farmacopeia Brasileira
FD&C	<i>Food, Drug and Cosmetic</i>
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FPLA	<i>Fair Packaging and Labeling Act</i>
HEPT	<i>Height Equivalent of a Theoretical Plate</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MIP	Medicamento Isento de Prescrição
MP	Metilparabeno
NFQC	Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos
NFQM	Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCM	Paracetamol
PEG	Polietilenoglicol

pH:	Potencial Hidrogeniônico
PHB	Para-Hidroxibenzóico
PP	Propilparabeno
qsp	quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SQR	Substância Química de Referência
UR	Umidade Relativa
UV-vis	Ultravioleta Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	microgramas
µL	microlitro

Lista de Tabelas

Tabela 1- Características físico-químicas do insumo farmacêutico ativo (IFA) Paracetamol e os respectivos conservantes, Metilparabeno e Propilparabeno.....	31
Tabela 2- Quantidade máxima de excipiente para o preparo do placebo da amostra A1 de acordo com a potência máxima por dose unitária.....	52
Tabela 3- Quantidade máxima de excipiente para o preparo do placebo da amostra A2 de acordo com a potência máxima por dose unitária.....	53
Tabela 4- Resultados da avaliação da adequabilidade do sistema para as substâncias químicas de referência do Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno.....	56
Tabela 5- Modelo experimental do estudo de degradação para determinação da seletividade do procedimento analítico.....	58
Tabela 6- Condições cromatográficas finais para determinação de parabenos no medicamento paracetamol por CLAE.....	60
Tabela 7- Resultados do procedimento analítico da Exatidão do ativo paracetamol, dos conservantes metilparabeno e propilparabeno na Amostra A1..	68
Tabela 8- Resultados do procedimento analítico da Exatidão do ativo paracetamol, dos conservantes metilparabeno e propilparabeno na Amostra 2.....	68
Tabela 9- Resultados das médias das concentrações em porcentagem e do DPR do procedimento analítico da Precisão - Repetibilidade e Intermediária com Teste F do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na Amostra 1.....	70

Tabela 10- Resultados das médias das concentrações em porcentagem e do DPR do procedimento analítico da Precisão - Repetibilidade e Intermediária com Teste F do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na Amostra 2.....	71
Tabela 11- Resultados da quantificação em porcentagem do ativo PCM e dos conservantes MP e PP na amostra A1 após a degradação oxidativa, fotolítica, hidrolítica, termolítica e por íons metálicos no tempo máximo de exposição.....	72
Tabela 12- Resultados da quantificação em porcentagem do ativo PCM e dos conservantes MP e PP na amostra A2 após a degradação oxidativa, fotolítica, hidrolítica, termolítica e por íons metálicos no tempo máximo de exposição.....	72
Tabela 13- Teor de Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais nas amostras comerciais.....	84

Lista de Figuras

- Figura 1- Estrutura molecular do Paracetamol (PCM), Metilparabeno (MP) e Propilparabeno (PP)..... 22
- Figura 2- Representação gráfica da constante de dissociação do Paracetamol com o respectivo valor de pKa (valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido)..... 28
- Figura 3- Representação gráfica da constante de dissociação do Metilparabeno e Propilparabeno com os respectivos valores de pKa (valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido)..... 30
- Figura 4- Representação ilustrativa da força intermolecular entre o analito e a fase estacionária no modo reverso de eluição..... 61
- Figura 5- Cromatogramas representativos da etapa de otimização do método analítico. Cromatograma A: Fase móvel: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MeOH}$ (54:46 v/v) em pH 7,0, coluna Zorbax Eclipse XDB-C18, a 30°C, com fluxo de $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 252nm. Cromatograma B: Fase móvel: tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MeOH} + \text{Trietilamina}$ (56:44:5 v/v/v) em pH 7,5, coluna Zorbax Eclipse Plus, a 30°C com fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 252nm. Cromatograma C: Fase móvel: ácido fosfórico 0,1% + MeOH (55:45 v/v) em pH 5,5, coluna Zorbax Eclipse Plus, a 40°C com fluxo de $1,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 246nm. Cromatograma D: Fase móvel: ácido fosfórico 0,1% + MeOH (65:35 v/v) em pH 5,0, coluna Zorbax XDB-CN, a 20°C com fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 245nm..... 63
- Figura 6- Cromatogramas representativos do Diluente (1), da substância química de referência do Paracetamol (2), do Metilparabeno (3), do Propilparabeno (4), da solução combinada dos padrões Paracetamol, Metilparabeno, Propilparabeno (5), da Amostra A1 (6) e Amostra A2 (7)..... 65

Figura 7- Curva analítica da substância química de referência do Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno..... 67

Figura 8- Cromatogramas representativos da degradação forçada na amostra A2 em 10 dias nas condições de estresse: A: Oxidação (H_2O_2 3%); B: Fotólise (luz solar); C: Hidrólise ácida (HCl 1M); D: Hidrólise básica (NaOH 0,1M); E: Termólise (estufa a 60°C); F: Oxidorredução ($FeCl_3$ 0,05M)..... 74

Figura 9- Cromatogramas representativos da pureza espectral do produto acabado, amostra A1. A: Cromatograma do Paracetamol; B: Cromatograma do Metilparabeno; C: Cromatograma do Propilparabeno..... 81

Figura 10- Cromatogramas representativos da pureza espectral do produto acabado, amostra A2. D: Cromatograma do Paracetamol; E: Cromatograma do Metilparabeno; F: Cromatograma do Propilparabeno..... 82

Lista de Gráficos

- Gráfico 1- Resultados obtidos em porcentagem da Amostra 1 da degradação forçada do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno comparados com a amostra controle, sob condições de estresse estipuladas no tempo máximo de exposição..... 75
- Gráfico 2- Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do ativo paracetamol, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A1..... 76
- Gráfico 3- Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante metilparabeno, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A1..... 76
- Gráfico 4- Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante propilparabeno, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A1..... 77
- Gráfico 5- Resultados obtidos em porcentagem da Amostra 2 da degradação forçada do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno comparados com a amostra controle, sob condições de estresse estipuladas no tempo máximo de exposição..... 78
- Gráfico 6- Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do ativo paracetamol, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A2..... 79

Gráfico 7- Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante metilparabeno, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A2..... 79

Gráfico 8- Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante propilparabeno sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A2..... 80

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE GRÁFICOS	16
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Paracetamol e Parabenos</i>	26
1.1.1. <i>Paracetamol</i>	26
1.1.2 <i>Parabenos</i>	27
1.1.3. <i>Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas</i>	28
1.1.3.1 <i>Descrição física e química</i>	28
1.1.3.2 <i>Paracetamol</i>	28
1.1.3.3 <i>Metilparabeno</i>	29
1.1.3.4 <i>Propilparabeno</i>	29
1.1.4 <i>Propriedades farmacocinéticas do paracetamol e dos parabenos</i>	31
1.1.4.1 <i>Biotransformação do paracetamol</i>	31
1.1.4.2 <i>Biotransformação dos parabenos</i>	32
1.2 ASPECTOS REGULATÓRIOS PARA USO DE PARABENOS	33
1.3 PARABENOS E OS POSSÍVEIS EFEITOS SOBRE O ORGANISMO HUMANO	38
1.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	40
1.4.1 <i>Estudo de validação e parâmetros analíticos</i>	41
1.4.2 <i>Linearidade</i>	41
1.4.3 <i>Especificidade</i>	41
1.4.4 <i>Adequação do Sistema-System Suitability</i>	42
1.4.5 <i>Exatidão</i>	42
1.4.6 <i>Precisão - Repetibilidade e Intermediária</i>	43
1.4.7 <i>Seletividade</i>	43
1.4.8 <i>Limite de Detecção</i>	43
1.4.9 <i>Limite de Quantificação</i>	44
1.4.10 <i>Robustez</i>	45

2. OBJETIVOS	46
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	46
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 <i>Identificação dos grupos ésteres de parabenos no medicamento paracetamol na apresentação solução e suspensão oral</i>	47
3.1.1 <i>Análises Estatísticas</i>	47
3.1.2 <i>Reagentes e insumos</i>	47
3.1.3 <i>Padrões analíticos e amostras comerciais</i>	48
3.1.4 <i>Equipamentos</i>	49
3.1.5 <i>Condições cromatográficas</i>	49
3.1.6 <i>Preparo do Padrão e Diluente</i>	50
3.1.7 <i>Preparo das Amostras</i>	51
3.1.8 <i>Preparo dos Placebos das Amostras A1 e A2</i>	51
3.2 Validação do Método Analítico	55
3.2.1 <i>Parâmetros de desempenho para validação do método</i>	55
3.2.1.1 <i>Linearidade</i>	55
3.2.1.2 <i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	55
3.2.1.3 <i>Especificidade</i>	55
3.2.1.4 <i>Adequação do sistema</i>	56
3.2.1.5 <i>Exatidão</i>	57
3.2.1.6 <i>Precisão- Repetibilidade e Intermediária</i>	57
3.2.1.7 <i>Seletividade</i>	57
3.2.1.8 <i>Robustez</i>	59
4. RESULTADOS	60
4.1 <i>Identificação dos grupos ésteres de parabenos nas amostras comerciais do medicamento paracetamol na apresentação solução e suspensão oral</i>	60
4.1.2 <i>Condições cromatográficas estabelecidas para o método analítico</i>	60
4.1.3 <i>Robustez</i>	66
4.1.4 <i>Curva Analítica do Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno</i>	66
4.1.5 <i>Limite de Detecção e Quantificação</i>	67
4.1.6 <i>Exatidão</i>	67
4.1.7 <i>Precisão - Repetibilidade e Intermediária</i>	69

4.1.7.1 Dados da Amostra 1.....	69
4.1.7.2 Dados da Amostra 2.....	70
4.1.8 Seletividade.....	71
4.1.9 Ensaio de Doseamento do medicamento paracetamol e dos respectivos conservantes metilparabeno e propilparabeno nas amostras comerciais.....	83
5. DISCUSSÃO.....	85
5.1 Paracetamol e Parabenos – objetos de estudo.....	85
5.1.2 Avaliação da performance do método analítico comparado a literatura.....	86
5.1.2.1 Otimização do método analítico.....	86
5.1.3 Análise dos resultados da Curva Analítica.....	89
5.1.4 Análise dos resultados da Exatidão e Precisão.....	90
5.1.4.1 Exatidão.....	90
5.1.4.2 Precisão.....	91
5.1.5 Análise dos resultados do Limite de Detecção e Quantificação.....	92
5.1.6 Análise dos resultados da Seletividade.....	92
5.1.6.1 Estudo de degradação forçada do ativo paracetamol e dos conservantes metilparabeno e propilparabeno.....	92
5.1.6.1.1 Degradação forçada por Hidrólise Ácida e Básica.....	93
5.1.6.1.2 Degradação forçada por Oxidação.....	94
5.1.6.1.3 Degradação forçada por Fotólise.....	95
5.1.6.1.4 Degradação forçada por Termólise.....	96
5.1.6.1.5 Degradação forçada por Oxidorredução - Íons Metálicos.....	97
5.1.7 Análise dos resultados do doseamento do medicamento paracetamol e dos conservantes metilparabeno e propilparabeno nas amostras comerciais....	98
6. CONCLUSÃO.....	100
7. REFERÊNCIAS.....	101
8. ANEXOS.....	111

1. Introdução

O paracetamol (PCM) ou acetaminofeno como é conhecido, é o analgésico e antipirético mais usado em todo o mundo, sendo esse ativo presente em muitos medicamentos compostos e de dosagem única, podendo ser prescrito ou de venda livre. É recomendado como terapia de primeira linha em condições de dor pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e também recomendado para tratamento de dor crônica, como osteoartrite para pacientes geriátricos em geral. Em gestantes ou crianças, o uso de paracetamol não precisa ser suprimido, ele deve ser usado na menor dosagem efetiva e pelo menor tempo (Ennis et. al., 2016, Toda, 2017).

Os efeitos terapêuticos são semelhantes aos salicilatos, no entanto, não possuem efeitos anti-inflamatórios, antiplaquetários e não afetam o equilíbrio ácido-base se administrado nas doses recomendadas. A boa tolerabilidade em doses terapêuticas de paracetamol é um fator importante para o amplo consumo, porém, concentrações terapêuticas não usuais podem causar intoxicação, *overdose* fatal e insuficiência hepática. Por meio de uma revisão sistemática o grupo de pesquisadores americanos de Berardi, em 2020 investigou a insuficiência hepática aguda pediátrica acometida em crianças e jovens na faixa etária de 0 a 22 anos, sendo a causa mais frequente a toxicidade por paracetamol (Berardi et. al., 2020).

Nos EUA, as estatísticas apontam que a principal causa de insuficiência hepática aguda é causada pelo uso de paracetamol, por esse motivo houve uma redução desse ativo na dosagem individual das apresentações farmacêuticas (Food and Drug Administration, 2011).

Este medicamento foi descoberto em 1852 e somente em 1951 foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), fazendo parte da composição de várias preparações farmacêuticas patenteadas, incluindo solução e suspensão oral (Vane e Botting, 1995, Bateman e James, 2009).

As preparações farmacêuticas líquidas são particularmente sensíveis ao crescimento microbiano devido à natureza da composição. Tais preparações são protegidas pela adição de conservantes que evitam a alteração e degradação da formulação no produto acabado (Hasan et. al., 2016).

O conservante ideal deve ser facilmente solúvel em água na concentração efetiva, uma vez que, o crescimento microbiano ocorre na fase aquosa (Rosen et. al., 1977).

Dentre os conservantes mais usados nas formulações farmacêuticas, destacam-se os parabenos que são ésteres do ácido para-hidroxibenzóico (PHB), nomeadamente metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. O uso desses excipientes tem-se mantido por muitas décadas, devido às características organolépticas favoráveis ao consumo humano, sendo quimicamente estáveis, não voláteis, inodoros e geralmente apresentam toxicidade sistêmica muito baixa. Não possuem potencial alérgico em concentrações permitidas, favorecendo o papel conservante em cosméticos, produtos alimentícios e formulações farmacêuticas (Soni, Carabin e Burdock, 2005; Ma et. al., 2016; Fransway et. al., 2019).

No entanto, outras opiniões científicas contestam a segurança dos parabenos quanto à exposição humana (Moreira, 2014; Ma et. al., 2016; Gabb, Blake, 2016; Nowak et.al., 2018).

Neste estudo serão adotadas as siglas PCM, MP e PP para paracetamol, metilparabeno e propilparabeno, respectivamente, representadas na Figura 1.

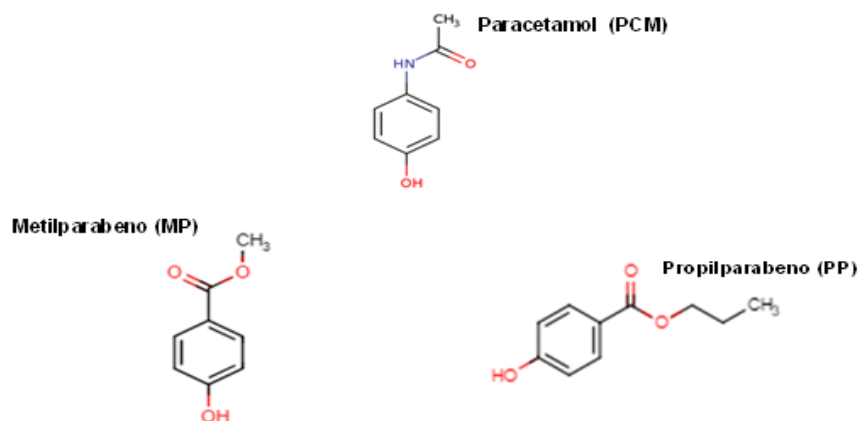


Figura 1: Estrutura molecular do Paracetamol (PCM), Metilparabeno (MP) e Propilparabeno (PP).

Fonte: ChemAxon, 2022.

Para garantir a qualidade dos medicamentos dispensados ou distribuídos à população, a indústria farmacêutica adota os requisitos das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) publicadas na RDC N° 658 de 30 de março de 2022 (Ministério da Saúde, 2022a). Dentre os critérios

estabelecidos para a produção dos medicamentos, estão incluídos os excipientes farmacêuticos.

Os parabenos são classificados na categoria de excipientes com a função de agentes conservantes.

A presença de excipientes nas formulações farmacêuticas é de suma importância, pois trata de uma substância utilizada em conjunto com o insumo farmacêutico ativo (IFA) para a fabricação do medicamento de interesse. De acordo com a RDC Nº 200 de 26 de dezembro de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que disponibiliza dos requisitos para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, a avaliação da compatibilidade no aspecto físico-químico do IFA com os excipientes deve seguir os critérios estabelecidos desta norma, a fim de evitar interferentes que comprometam a qualidade do produto acabado (Ministério da Saúde, 2017a).

Por definição da RDC Nº 34 de 07 de agosto de 2015 da ANVISA, que aborda as diretrizes para estabelecimentos fabricantes de excipientes farmacêuticos, os excipientes farmacêuticos são “qualquer componente, que não seja substância ativa, adicionado intencionalmente à formulação de uma forma farmacêutica” (Ministério da Saúde, 2015).

Assim, as determinações desses conservantes em produtos farmacêuticos são imprescindíveis tanto para a garantia da qualidade como para a segurança do consumidor.

Para as formulações farmacêuticas, a determinação simultânea de compostos ativos ou relacionados em produtos farmacêuticos normalmente requer o uso de uma técnica de separação, como por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguida de quantificação. Outros métodos utilizados são: volumétricos, polarográficos, espectrofotométricos UV-vis, fluorimétricos, entre outros.

Existem muitos procedimentos analíticos disponíveis na literatura para a determinação de MP e PP, isoladamente ou em combinação com outros fármacos. As determinações de medicamentos ou produtos farmacêuticos são classificadas em cinco categorias principais: métodos ópticos; métodos eletroanalíticos; métodos cromatográficos; métodos eletroforéticos capilares e análise da água (Bosch et al., 2006; Ghulam e Shafique, 2011).

A técnica por CLAE baseia-se na separação dos compostos por meio de fenômenos químicos e físicos onde o analito, a fase móvel (FM) e a fase estacionária (FE) interagem entre si. Esse mecanismo pode ser subdividido em dois aspectos distintos: cinético e termodinâmico.

O aspecto cinético é a migração da zona cromatográfica responsável pelo alargamento da banda cromatográfica ou comumente chamado de pico cromatográfico, e o aspecto termodinâmico é o responsável pela retenção do analito na coluna. Do ponto de vista analítico, fatores cinéticos determinam a largura do pico cromatográfico, enquanto fatores termodinâmicos determinam a posição do pico no cromatograma. Na prática, a eficiência de separação em CLAE está mais relacionada à otimização do instrumento, dimensões da coluna cromatográfica e fatores geométricos das partículas que não podem ter variação durante o desenvolvimento do método, exceto pela pequena influência da variação da vazão da fase móvel. Por outro lado, a retenção ou a seletividade do analito dependem principalmente das interações intermoleculares competitivas que são influenciadas pelo tipo de eluente, composição da fase móvel, temperatura e outras variáveis que permitem essas modificações (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

A CLAE é a técnica dominante na análise farmacêutica por possuir vantagens sobre outras técnicas de separação de compostos de interesse em uma única corrida, possui boa seletividade, sensibilidade, exatidão, precisão e robustez. Portanto, esta técnica é amplamente empregada no desenvolvimento e validação de métodos para a maioria dos analitos, incluindo compostos não voláteis, sensíveis ao calor e altamente polares (Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018).

A ANVISA define validação de método analítico como sendo “a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos” (Ministério da Saúde, 2017b).

Um método é considerado validado estando as características de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. No desenvolvimento analítico, as condições analíticas, a variabilidade dos processos e as características de performance do processo (parâmetros analíticos) devem ser bem estabelecidas nos ciclos do procedimento analítico. Alguns pesquisadores usam os termos

parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, por vezes, figuras analíticas de mérito para classificar as condições adotadas no estudo desenvolvido. (Thompson, Ellison e Wood, 2002; INMETRO, 2020). Para determinar o desenvolvimento de um método analítico, alguns conceitos devem ser considerados: o tempo de desenvolvimento do método, o tempo máximo de execução para análise, o número de amostras, a complexidade dos solventes, a estrutura do analito principal (propriedades físico-químicas), possíveis vias de degradação (hidrólise, oxidação, fotolítica, termolítica e racemização), e o grau de ionização dos analitos (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos de quantificação envolvem Linearidade, Função da Resposta (gráfico analítico), Especificidade, Seletividade, Intervalo de Trabalho, Sensibilidade, Exatidão, Precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade), Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Robustez. Dependendo da finalidade analítica, outros parâmetros de validação devem ser adotados. Todos esses critérios são definidos por órgãos reguladores competentes, guias orientativos e literatura científica específica (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005; Marsona et. al., 2020).

A validação analítica desempenha um papel fundamental no âmbito das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de produtos farmacêuticos, além de demonstrar que o método analítico proposto produz resultados confiáveis, sendo adequado à finalidade a que se propõe, podendo ser aplicada nas rotinas dos laboratórios, com o objetivo de assegurar a qualidade dos medicamentos consumidos pela população.

1.1 Paracetamol e Parabenos

1.1.1 Paracetamol

O medicamento paracetamol, conhecido também como acetaminofeno ou *N-acetaminofen*, é um potente analgésico e antipirético. Foi sintetizado há mais de cem anos e desde o século XIX é um dos medicamentos mais utilizados para essa finalidade (Rang et. al., 2016).

Categorizado como Medicamento Isento de Prescrição (MIP), segundo a Instrução Normativa IN Nº 86, de 12 de março de 2021 da ANVISA, o paracetamol é indicado nos tratamentos de febre, dores de intensidade leve a moderada (cefaleia, enxaqueca, dores musculares, dor de garganta, dor de dente, artrose, dismenorrea) e dores associadas a procedimentos de odontologia e vacinas (Rang et. al., 2016; Katzung e Trevor, 2017).

Comercializado sob várias marcas, apresenta-se nas formas farmacêuticas: comprimido, comprimido efervescente, comprimido mastigável, comprimido revestido, pó para preparação extemporânea, solução e suspensão de uso oral, e em associação com outros fármacos como, por exemplo, a codeína e o tramadol (Rang et.al., 2016; Ministério da Saúde, 2021).

A dose terapêutica segura do medicamento paracetamol compreende entre 0,5g a 1,0g a cada 4 a 6 horas para um adulto, não excedendo doses acima de 4g/dia. Para uso em crianças, as doses variam de 40 a 480mg ou 10mg/kg, dependendo da idade e do peso, não excedendo mais que cinco doses em 24h (Brunton et. al., 2010; Katzung e Trevor, 2017).

Nos Estados Unidos, estudos apontam um aumento de casos de insuficiência hepática e *overdoses* não intencionais com o uso do medicamento paracetamol (*acetaminophen* como é conhecido no país), além de uma alta taxa de casos de lesões hepáticas. Em atendimento a solicitação do Comitê Consultivo dos Estados Unidos da América (EUA) em relação à retirada de produtos que contém a combinação com acetaminofeno ou a redução da quantidade desse produto em cada unidade de dosagem, o *Food and Drug Administration* (FDA) decidiu limitar a quantidade máxima de acetaminofeno para 325mg por unidade de dosagem em produtos prescritos, a fim de evitar a superdosagem desse ativo (*Food and Drug Administration*, 2021).

1.1.2 Parabenos

Os excipientes conservantes são empregados nas formulações para inibir o crescimento de bactérias e fungos, a fim de garantir a estabilidade dos medicamentos (Aalto, Firman e Rigler, 1953).

Dentre os excipientes conservantes empregados nas formulações farmacêuticas, os parabenos têm uma longa história de uso. São utilizados desde a década de 1920 e até os dias atuais são considerados agentes de grande potencial de ação conservante, estando presentes também nas formulações de inúmeros produtos da cadeia industrial cosmética e alimentícia (Soni, Carabin e Burdock, 2005).

Quimicamente, os parabenos são ésteres do ácido para-hidroxibenzoico. A esterificação no carbono quatro confere distintos grupos de ésteres e os respectivos sais, sendo: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno, isopropilparabeno, metilparabeno de sódio, etilparabeno de sódio, propilparabeno de sódio, butilparabeno de sódio, isobutilparabeno de sódio, metilparabeno de potássio, butilparabeno de potássio, etilparabeno de potássio, propilparabeno de potássio e fenilparabeno. Podem ser utilizados separadamente ou em combinação, distintivamente em medicamentos, cosméticos ou alimentos (Soni, Carabin e Burdock, 2005; Fernandes et al., 2013; *European Union Regulation*, 2009).

Os parabenos podem apresentar diferentes características físico-químicas e a capacidade do efeito antimicrobiano está relacionada com o comprimento da cadeia do grupo éster de parabeno, seguindo a ordem crescente da ramificação com as seguintes nomenclaturas: metil, etil, propil e butil. Em contrapartida, a solubilidade aquosa diminui à medida que a hidrofobicidade aumenta. Possuem amplo espectro de atividade, pouca solubilidade em água, são moléculas cristalinas incolores, inodoras e sem sabor. São mais ativos em pH numa faixa de 4,5 a 7,5, porém, a eficácia diminui em pH mais alto, ou seja, acima do seu pKa (valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido), ocorrem processos oxidativos devido à desprotonação do fenol formando íon fenolato. (Soni, Carabin e Burdock, 2005; Sweetman e Martindale, 2009).

1.1.3 Propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

1.1.3.1 Descrição física e química

1.1.3.2 Paracetamol

A substância química paracetamol é um sólido cristalino branco, inodoro com sabor levemente amargo. Solúvel em metanol, etanol, dimetilformamida, dicloreto de etileno, acetona, acetato de etilo e ligeiramente solúvel em éter, pouco solúvel em água e praticamente insolúvel em éter de petróleo, pentano e benzeno. O valor de pH em solução aquosa saturada compreende na faixa de 5,5 a 6,5. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como benzenóides 1-hidroxi-2-não substituídos. A estrutura molecular, Figura 2, confere a formação de compostos aromáticos monocíclicos (Rowe, Sheskey, Quinn, 2009; Pubchem, 2022).

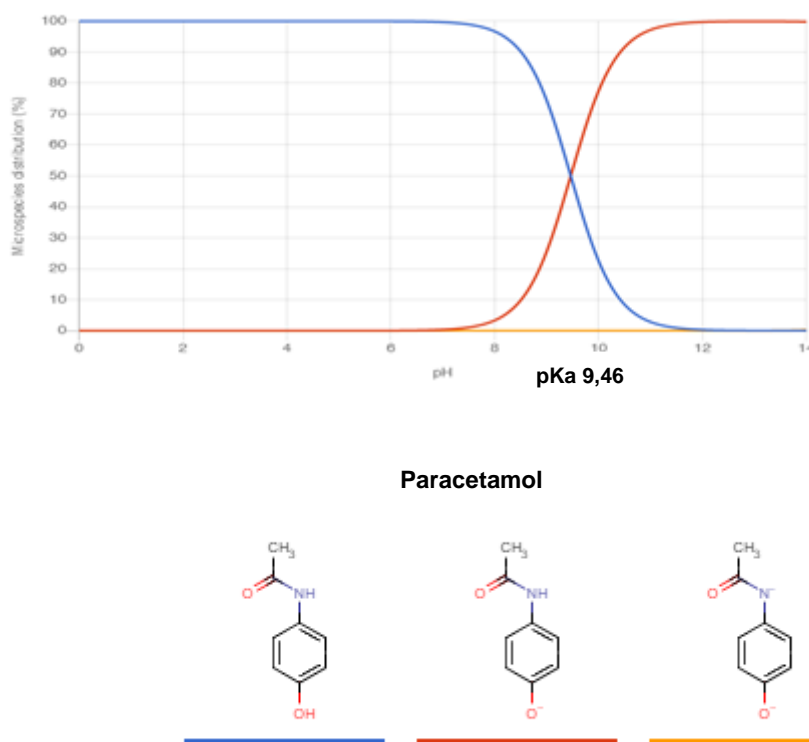


Figura 2- Representação gráfica da constante de dissociação do Paracetamol com o respectivo valor de pKa (valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido).

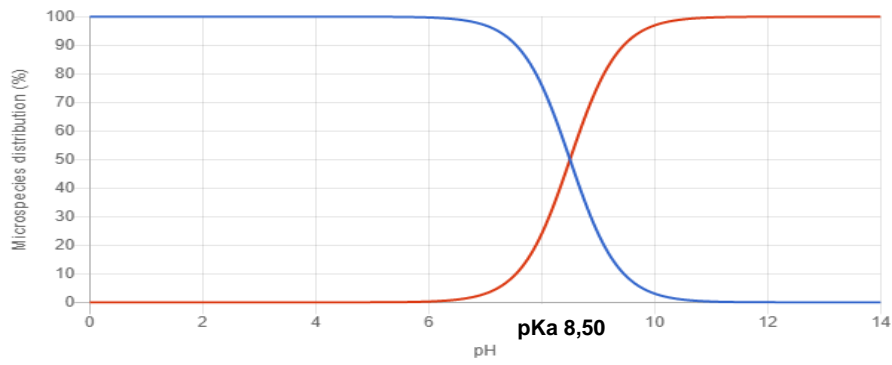
Fonte: ChemAxon e Pubchem, 2022.

1.1.3.3 Metilparabeno

São cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro ou discreto odor característico com leve gosto ardente. Ligeiramente solúvel em água, muito solúvel em etanol, éter, acetona e solúvel em ácido trifluoroacético. Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como ésteres alquílicos do ácido para-hidroxibenzóico. São compostos aromáticos contendo um ácido benzóico, que é esterificado com um grupo alquila ou substituído por um grupo hidroxila. A estrutura molecular, Figura 3, confere a formação de compostos aromáticos monocíclicos (Rowe, Sheskey, Quinn, 2009; Pubchem, 2022).

1.1.3.4 Propilparabeno

São cristais incolores ou pó branco ou sólido branco grosso. Apresenta odor leve ou inodoro. Solúvel em etanol, éter etílico e ligeiramente solúvel em clorofórmio e pouco solúvel em água. O valor de pH em solução compreende na faixa 6,5 a 7,0. Pertence também à classe de compostos orgânicos dos ésteres alquílicos do ácido para-hidroxibenzóico. São compostos aromáticos contendo um ácido benzóico, que é esterificado com um grupo alquila ou substituído por um grupo hidroxila. A estrutura molecular, Figura 3, confere a formação de compostos aromáticos monocíclicos (Rowe, Sheskey, Quinn, 2009; Pubchem, 2022).



Metilparabeno



Propilparabeno

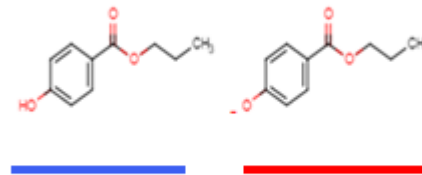


Figura 3- Representação gráfica da constante de dissociação do Metilparabeno e Propilparabeno com os respectivos valores de pKa (valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido).

Fonte: ChemAxon e Pubchem, 2022.

Desta forma podem-se resumir as características físico-químicas do paracetamol, do metilparabeno e do propilparabeno conforme descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Características físico-químicas do insumo farmacêutico ativo (IFA) Paracetamol e os respectivos conservantes, Metilparabeno e Propilparabeno

Composto químico	Fórmula Molecular	IUPAC*	CAS**	Massa Molar	pKa***	Coefficiente de partição	Solubilidade
Paracetamol	C ₈ H ₉ NO ₂	N-(4-hidroxifenil-acetamida)	103-90-2	151,165 g/mol	9,46	0,91	Alta
Metilparabeno	C ₈ H ₈ O ₃	4-hidroxibenzoato de metila	99-76-3	152,149 g/mol	8,50	1,67	Alta
Propilparabeno	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	4-hidroxibenzoato de propila	94-13-3	180,203 g/mol	8,50	2,55	Alta

Legenda:

*IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

** CAS: *Chemical Abstracts Service*

***pKa: Valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido

Fonte: ChemAxon e Pubchem, 2022.

1.1.4 Propriedades farmacocinéticas do paracetamol e dos parabenos

1.1.4.1 Biotransformação do paracetamol

O medicamento paracetamol pertence à classe farmacológica dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES), inibindo com pouca potência a Ciclooxigenase-1 (COX-1) e a COX-2 nos tecidos periféricos, porém essa atividade não exerce efeito anti-inflamatório significativo (Katzung e Trevor, 2017; Brunton et. al., 2010).

O mecanismo de ação está atribuído à inibição da síntese de prostaglandinas (PGE₂) no Sistema Nervoso Central (SNC). A absorção oral atinge uma concentração plasmática em 30 a 60 minutos. O tempo de meia vida plasmática das doses terapêuticas é de 2 a 4 horas e para as doses tóxicas estende-se para 4 a 8 horas (Rang et. al., 2016).

A biotransformação do paracetamol ocorre na presença de enzimas microsossomais hepáticas na proporção de ácido glucurônico (60%), ácido sulfúrico (35%) e cisteína (3%). Porém, uma pequena parte do paracetamol sofre hidroxilação mediada por Citocromo P450 2E1 (CYP2E1) formando N-acetil-p-benzoquinona, um metabólito tóxico tanto para o fígado como para o rim. Em casos de toxicidade, o fármaco N-acetilcisteína é o tratamento de

primeira escolha na prática clínica (Katzung e Trevor, 2017; Brunton et al., 2010).

Em crianças, a glicuronidação de fármacos acontece em menor frequência em comparação aos adultos, devido a imaturidade metabolizante dessa enzima não estar totalmente desenvolvida até os 6 meses de idade, dificultando a compreensão farmacocinética no organismo desse grupo etário (Katzung e Trevor, 2017; Brunton et al., 2010; *European Union*, 2013).

1.1.4 2. *Biotransformação dos parabenos*

A ação das esterases no organismo confere a hidrólise dos parabenos em ácido para-hidroxibenzóico, por meio de glicuronidação catalisada pelas glicuroniltransferases com o uso do ácido glicurônico que auxilia na conversão dessa substância por meio de reação de conjugação. Esse princípio é fundamental na excreção de alguns fármacos do organismo humano (Abbas et. al., 2010).

O mecanismo de ação não está totalmente elucidado, alguns pesquisadores reportam que a ação pode ser por alteração da permeabilidade da membrana celular, ação sobre a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), mecanismo de transporte pela membrana celular ou mesmo sobre enzimas-chave como a adenosinatrifosfatases (ATPases) e a fosfotransferases (Soni, Carabin e Burdock, 2005; Fernandes et al., 2013).

A biotransformação dos parabenos é conduzida por esterases não específicas, amplamente distribuídas pelo corpo e abundantes em locais de entrada, tais como a pele, o tecido adiposo subcutâneo e sistema digestivo. A ação dessas substâncias na circulação sistêmica e o acesso subsequente ao local de ação dificultam a excreção do corpo (Brunton et al., 2010; Bledzka, Gromadzinska e Wasowicz, 2014).

Devido à vulnerabilidade e a imaturidade do organismo da criança, desconhece-se a capacidade de metabolização dos parabenos. A farmacocinética não está estabelecida, tendo assim uma maior preocupação quanto à utilização desses compostos nas formulações pediátricas (Tonazio et. al., 2011; Ministério da Saúde, 2022a).

1.2 Aspectos regulatórios para uso de parabenos

Em âmbito constitucional, o compromisso das instituições e órgãos regulatórios é manter um processo normativo que assegure a promoção e proteção da saúde da população mediante um controle sanitário dos produtos utilizados pelo consumidor.

Para o presente estudo, as instituições e os órgãos regulatórios nacionais e internacionais pesquisados foram: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Food and Drug Administration* (FDA) - Estados Unidos da América (EUA), *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) da União Europeia e o *Codex Alimentarius* - programa conjunto da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* e da *World Health Organization* (FAO/WHO).

No Brasil, o órgão regulador que fiscaliza os produtos do segmento farmacêutico, alimentício e cosméticos é a ANVISA, vinculado ao Ministério da Saúde.

O compromisso desta Instituição é promover a proteção da saúde da população por meio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária, incluindo os ambientes, os processos, os insumos e as tecnologias a eles relacionados. O controle de portos, aeroportos, fronteiras e recintos alfandegados são designados às suas atribuições (Ministério da Saúde, 1999).

O FDA é um órgão governamental dos EUA, responsável pela promoção e proteção da saúde pública por meio do controle, inspeção e fiscalização da segurança de produtos farmacêuticos (medicamentos, hemoderivados e insumos), cosméticos e alimentos com base nas leis federais do *Food, Drug, and Cosmetic Act* (FD&C Act) e do *Fair Packaging and Labeling Act* (FPLA) (U.S. Congress. *Federal Food, Drug and Cosmetic Act*, 1934).

O *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) da União Europeia tem por objetivo avaliar os riscos à saúde e segurança de produtos de consumo não alimentícios por meio de pareceres técnicos de acordo com o Regulamento Interno dos Comitês Científicos. Os riscos referem-se aos químicos, biológicos, mecânicos e físicos. Os produtos avaliados são: produtos cosméticos e seus ingredientes, brinquedos, têxteis, vestuário, cuidados pessoais e produtos domésticos e serviços como tatuagem e bronzeamento artificial (*European Union*, 2001).

O *Codex Alimentarius*, conhecido também como "Código Alimentar" é um conjunto de normas estabelecidas por uma comissão da FAO/WHO criada para promover, proteger e garantir a saúde do consumidor no comércio de alimentos. O *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) é o órgão responsável em realizar avaliações toxicológicas de aditivos alimentares (*Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*, 1995).

Para o controle regulatório de parabenos no setor de cosméticos, a ANVISA por meio da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 528, de 4 de agosto de 2021 "Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL N° 35/20", que inclui as limitações e concentrações máximas permitidas do conservante ácido para-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres. A recomendação para concentração máxima permitida desses compostos é de 0,4%, expresso como ácido, do composto individual e 0,8%, expresso como ácido, para misturas de sais ou ésteres de metil e etilparabeno, assim como, para os ésteres de propil e butilparabeno e seus sais, expresso como ácido, a soma das concentrações individuais desses compostos não deve exceder a 0,14%. Nesta Resolução, foram estabelecidas as limitações, condições de uso e advertências dessas substâncias (Ministério da Saúde, 2021).

A segurança dos ingredientes usados em cosméticos nos EUA é regulamentada pela Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos de 1938, direcionada para rotulagem e segurança dessas categorias de produtos. A lei não exige que os produtos e ingredientes cosméticos sejam aprovados pelo FDA, exceto os aditivos corantes (*U.S. Congress. Federal Food, Drug and Cosmetic Act*, 1934).

Os produtos que não são assegurados por essa lei são avaliados e revisados por meio do Painel de Especialistas em Revisão de Ingredientes Cosméticos (CIR), iniciado em 1976 pelo Conselho de Produtos de Cuidado Pessoal com apoio da Federação dos Consumidores da América (CFA) e do FDA, sem efeito normativo. É um organismo científico independente, sem fins lucrativos. A avaliação é feita por esses especialistas por meio de uma vasta revisão técnica científica de coletas de dados nas fontes de informações literárias. Na ausência dessas informações é solicitado às indústrias

informação adicional com dados publicados e não publicados, a fim de garantir uma compilação de dados completos sobre a segurança dos ingredientes. O CIR emite um relatório de *status* do ingrediente com estudos fornecidos do DART (Developmental And Reproductive Toxicity) para concluir a avaliação da segurança dos ingredientes usados em cosméticos.

O CIR envia essas avaliações de segurança para publicação em edições especiais no *Jornal Internacional de Toxicologia*. (*United States of America*, 2018).

Não foram encontrados registros normativos que informem as concentrações, limitações e condições de uso dos compostos parabenos em cosméticos nos EUA.

Já o controle regulatório de parabenos em produtos e cosméticos na Europa, o SCCS por meio dos Regulamentos (EU) Nº 1004 de 18 setembro 2014 e (EU) Nº 358 de 9 abril 2014, estabeleceu a concentração máxima do uso de parabenos em 0,4% para um único éster e 0,8% para misturas desses compostos (metil e etilparabeno e seus sais). Para os ésteres de propil e butilparabeno e seus sais, o limite estabelecido é de 0,14% para a soma das concentrações individuais. Para produtos de cuidados pessoais destinados a crianças menores de três anos, a Comissão proibiu o uso desses parabenos (*European Union* 2014a; *European Union*, 2014b).

Neste mesmo Regulamento, (EU) Nº 358 de 09 de abril de 2014, a Comissão proibiu a utilização de outros cinco parabenos em produtos cosméticos: o isopropilparabeno, o isobutilparabeno, o fenilparabeno, o benzilparabeno e o pentilparabeno (*European Union*, 2014b).

No setor alimentício, os aditivos mais empregados são o metilparabeno e o etilparabeno, sendo o propilparabeno proibido desde 2008. A eficácia inibitória desses dois conservantes é contra bolores e leveduras (Ministério da Saúde, 2008).

As normas internacionais estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*, em parceria com o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), definem os limites aceitáveis de parabenos como aditivo para cada tipo de produto alimentício, por meio do *Codex General Standard for Food Additives- GSFA* amparados pelo banco de dados do *Codex Stan 192-1995*, revisado em 2021. Os compostos incluídos nesses documentos são os ésteres metílico e etílico do ácido para-hidroxibenzóico. Dentre os países que adotam suas normas e

diretrizes relacionadas a alimentos, assim como as disposições pertinentes sobre aditivos alimentares, estão o Brasil por meio da ANVISA, os EUA por meio do FDA e a União Europeia pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs) por meio do Regulamento (EU) Nº 257 de 25 de março de 2010 (*Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 1995; European Union, 2010*).

O Brasil participa do Programa há mais de 40 anos, com a criação do Comitê *Codex Alimentarius* em 1980. Isso garante ao país um acompanhamento das atualizações dos conservantes em outros países e a harmonização regulatória com os demais países, que contribuiu para maior segurança dos produtos utilizados pela população (Ministério da Saúde, 2008; Aun et al., 2011).

Na indústria farmacêutica nacional, a autorização para fabricação é concedida pela ANVISA desde que atendam aos requisitos mínimos estabelecidos pelas Boas Práticas de Fabricação, para que a qualidade do medicamento seja assegurada (Ministério da Saúde, 2022a).

As descrições dos excipientes usados nas formulações farmacêuticas estão dispostas nos compêndios oficiais da Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana e Farmacopeia Europeia e os critérios de seleção, aquisição, rastreabilidade, controle de qualidade e quantidade suficiente para seu uso (qsp) são estabelecidos pelo fabricante detentor do registro de acordo com o desenvolvimento da formulação do medicamento (Ministério da Saúde, 2022a).

Na União Europeia, os conservantes aprovados para uso em medicamentos são publicados em *Guidelines* em consonância com a Diretiva 2001/83 EC do Parlamento Europeu que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano (*European Union, 2001*).

Nos EUA, o uso de conservantes para formulações farmacêuticas segue os mesmos critérios estabelecidos para cosméticos, amparados por especialistas qualificados para avaliar a segurança dos medicamentos (*U.S. Congress. Federal Food, Drug and Cosmetic Act, 1934*).

Nos bancos de informação citados neste trabalho, não foi encontrada legislação nacional e internacional que estabeleça o limite máximo de conservantes parabenos permitido nas formulações farmacêuticas.

Alguns pesquisadores relatam que, o critério de aceitação para o uso de parabenos em produtos farmacêuticos varia de acordo com o tipo de medicamento ou produto e geralmente a concentração não excede a 1% (Soni, Carabin e Burdock, 2005; Rowe, Sheskey, Quinn, 2009).

1.3 Parabenos e os possíveis efeitos sobre o organismo humano

No cenário científico, alguns pesquisadores identificaram a relação existente entre os excipientes e as reações adversas (Silva et. al., 2008; Araújo e Borin, 2012; Nascimento, Santana e Silva, 2019; Tonazio et. al., 2011).

Esses pesquisadores observaram que vários casos de reações alérgicas a parabenos foram relatados, em especial as reações de hipersensibilidade imediata ou tardia (Soni, Carabin e Burdock, 2005; Araújo e Borin, 2012; Nascimento, Santana e Silva, 2019; Tonazio et. al., 2011).

Os parabenos são conservantes de ação antibacteriana e antifúngica, sendo os mais usados: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno. Ésteres de parabenos e seus sais são amplamente utilizados em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. O monitoramento de reações alérgicas aos parabenos por meio de triagem e testes cutâneos é realizado desde 1940. A literatura relata que essa classe de conservantes possui baixa toxicidade, baixo custo e são seguros devido seu longo histórico de uso (Hasan et. al., 2016; Ma et. al., 2016; Fransway et. al., 2019).

Embora os parabenos sejam considerados seguros quando utilizados dentro dos limites de concentração especificados, preocupações com o potencial de toxicidade em altas concentrações e exposição crônica foram relatados no meio científico, tornando-os alvo de investigação dos pesquisadores (Susann, Kreiling e Sauer, 2021).

Todas essas informações norteiam os possíveis efeitos causados pela exposição aos parabenos relacionado a toxicidade aguda em concentrações baixas no organismo humano. Até o momento, não há informações sobre a toxicidade crônica causada pelas baixas concentrações e os possíveis efeitos que os parabenos podem causar, principalmente no sistema endócrino.

No entanto, alguns pesquisadores relatam que o uso dos parabenos está cada vez mais incerto, além de provocar reações alérgicas cutâneas e sistêmicas agudas, esse grupo de substância química apresenta um potencial desregulador endócrino devido a similaridade de suas moléculas com o estrogênio endógeno 17 β -estradiol, podendo acarretar danos irreparáveis à saúde do indivíduo, principalmente o infantil, uma vez que, esse sistema tem como principal ação manter o sistema homeostático por meio das condições de equilíbrio interno corporal das incessantes interações dos processos

reguladores que ele realiza. (Soni, Carabina e Burdock, 2005; Moreira, 2014; Ma et. al., 2016; Gabb, Blake, 2016; Nowak et.al., 2018).

Os órgãos regulatórios têm emitido pareceres técnicos quanto às concentrações máximas desses compostos permitidos em alguns produtos cosméticos, incluindo os produtos de higiene pessoal e alimentícios, de acordo com as ocorrências notificadas (Ministério da Saúde, 2012; *European Union*, 2001; *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*, 1995; Ministério da Saúde, 1999).

Para produtos infantis dentro das matrizes de produção, alguns grupos ésteres e seus sais foram proibidos por medida de precaução, estabelecendo uma faixa etária para o uso ou consumo desses compostos. Os efeitos toxicológicos no corpo humano em especial no infantil dependem do nível de parabenos em sua forma livre presente no organismo (*European Union*, 2011).

Além da exposição aos produtos e medicamentos, outras fontes de exposição estão sendo pesquisadas em virtude dos potenciais toxicológicos que esses compostos podem provocar.

Alguns estudos relatam altas concentrações de parabenos encontradas no meio ambiente, na urina humana, tecido placentário e tecido tumoral de mama (Okubo et al., 2001; Bledzka, Gromadzinska e Wasowicz, 2014; Ma et al., 2016).

Pesquisas dos efeitos ecotoxicológicos dos parabenos têm sido realizadas por alguns pesquisadores. Moreira, 2014; Vilela, Pinheiro e Souza, 2018, relataram que a presença de parabenos em mananciais pode ser atribuída por descargas de efluentes advindos das estações de tratamento de esgoto e das indústrias. As análises realizadas apontaram variações de concentrações de parabenos em rios associados aos despejos dos esgotos urbanos e industriais, gerando possíveis riscos à vida aquática (Moreira, 2014; Vilela, Pinheiro e Souza, 2018).

No ambiente aquático, algumas espécies apresentaram sensibilidade aos testes toxicológicos em exposição aos parabenos, principalmente ao metilparabeno e propilparabeno. Por meio dessa avaliação, a pesquisadora Spadoto, 2017, observou que os parabenos podem gerar riscos ecológicos nessa biota. A pesquisadora sugere que, uma forma de amenizar esses riscos é a implantação de regulamentos quanto às concentrações dos parabenos no ambiente (Spadoto, 2017).

1.4 Validação de Metodologia Analítica

Validação de método analítico compreende o processo de avaliação ou verificação de desempenho de um método analítico que confirme a performance do sistema por meio de estudos experimentais dos parâmetros analíticos com as devidas considerações estatísticas, a fim de demonstrar que o método analítico proposto é adequado ao que se propõe (Ministério da Saúde, 2017b).

Para garantir que o método analítico seja validado, as normas e os critérios de aceitação devem ser estabelecidos pelo órgão vigente de âmbito nacional ou internacional. No Brasil, os organismos responsáveis para verificar a competência de laboratórios de ensaios analíticos são a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Por meio de resoluções e recomendações para procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 166, de 24 de julho de 2017, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR ISO/IEC 17025 de 2017 e o documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2020, estabelecem parâmetros de validação que atendam às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

As agências reguladoras dos EUA, Europa e do Japão definem parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, metodologias para validação dos métodos analíticos por meio de guias internacionais estabelecido pela *International Conference on Harmonisation* (ICH), tendo como escopo harmonizar as diferentes aplicações nos processos de validação de método analítico nesses países. Como um marco importante, a ANVISA em 2019 tornou-se membro do Comitê Gestor do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH*), contribuindo de forma significativa nos processos regulatórios e implementação das diretrizes do ICH às autoridades reguladoras e indústrias farmacêuticas (*International Conference on Harmonisation*, 2005; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019).

Desta forma, esses órgãos como ICH, ISO, ANVISA, INMETRO promulgam que a validação de métodos analíticos deve ser um requisito

fundamental para assegurar a qualidade dos medicamentos e demonstrar a competência técnica dos laboratórios de ensaios analíticos.

1.4.1 Estudo de validação e parâmetros analíticos

O estudo de validação contribui de forma sistemática na escolha de técnicas empregadas para análise de validação de testes, na definição dos parâmetros de validação e os critérios de aceitação para cada parâmetro. Auxilia na verificação de desempenho dos equipamentos e as compatibilidades exigidas pelo método em estudo, no planejamento dos experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico a ser utilizado e na realização de análise crítica dos resultados esperados, considerando os critérios de aceitação. Assim é possível avaliar se o método analítico proposto será adequado ao uso pretendido durante sua realização (Ministério da Saúde, 2017b; Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2020).

1.4.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico deve ser demonstrada dentro de um determinado intervalo, a sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (Ministério da Saúde, 2017b; Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2020).

1.4.3 Especificidade

A avaliação da especificidade pode ser conduzida durante a validação de ensaios de testes de identificação do analito e da determinação de impurezas. O procedimento usado para demonstrar a especificidade dependerá do objetivo pretendido da análise. Quando não for possível demonstrar que um procedimento analítico é específico para um determinado analito (discriminação completa), é recomendado realizar uma combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação (*International Conference on Harmonisation, 2005*).

1.4.4 Adequação do Sistema – *System Suitability*

O teste de adequação do sistema é parte integrante de um procedimento realizado previamente a uma corrida analítica, para demonstrar que o sistema está apto para o uso pretendido. Os testes baseiam-se no conceito de que os equipamentos eletrônicos, operações analíticas e as amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como um todo. Os parâmetros desse procedimento devem ser definidos durante o desenvolvimento e validação do método. A Farmacopeia USP de 2019 estabelece alguns parâmetros para determinar a adequação do sistema, sendo eles: Número de pratos teóricos (N), Resolução (Rs), Fator de retenção (K), Fator de Simetria ou Assimetria (As), Fator de cauda (T) Tempo de retenção (Rt) (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005; *United States Pharmacopoeia*, 2019).

1.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico pode ser avaliada por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro, ou um valor de referência aceito e o valor encontrado. Sendo uma determinação que representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados, o número de ensaios varia de acordo com a legislação, diretriz adotada e com as características dos compostos em estudo. A ANVISA e o ICH estabelecem o mínimo de nove determinações com três diferentes níveis de concentração, por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração para quantificar o analito na matriz, com exatidão satisfatória. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005).

1.4.6 Precisão - Repetibilidade e Intermediária

O ensaio de precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Pode ser investigada em três condições: por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local. A intermediária atesta as mesmas condições descritas para a repetibilidade, porém, com analistas e dias diferentes. A determinação da reprodutibilidade é aplicável em ensaios interlaboratoriais, em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados. (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005).

1.4.7 Seletividade

A seletividade do método analítico é a forma de demonstrar por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, distintamente, a presença de componentes como impurezas, diluentes e compostos da matriz que podem estar presentes na amostra. Em métodos cromatográficos, esse desempenho deve ser comprovado por meio da pureza cromatográfica do sinal do analito. Para isso, todos os componentes e a matriz da amostra devem ser expostos a condições extremas (calor, luz, ácido, álcali, oxidação, oxirredução e umidade relativa) para determinar possíveis produtos de degradação (Ministério da Saúde, 2015; Ministério da Saúde, 2017b).

4.1.8 Limite de Detecção

O limite de detecção de um procedimento analítico pode ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Esse parâmetro pode ser determinado por meio de método visual, da razão sinal-ruído com valor maior

ou igual a 2:1, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva analítica pelo cálculo da fórmula expressa abaixo, ou considerando as particularidades do método analítico utilizado (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005).

$$LD = \frac{3,3 \cdot s}{S}$$

Considera-se **s** a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser estimado pelo desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação. **S** é a inclinação ou “*slope*”, podendo ser também estimado pelo coeficiente angular da curva analítica (Ribani, et al., 2004).

1.4.9 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é um parâmetro de ensaio quantitativo para determinar a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. Além disso, é usado para a determinação de impurezas ou produtos de degradação.

A avaliação desse parâmetro segue os mesmos critérios estabelecidos para a determinação do limite de detecção, sendo que, para a razão sinal-ruído o valor deve ser no mínimo de 10:1 e para parâmetros da curva analítica, o cálculo é realizado pela fórmula expressa a seguir (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005).

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{S}$$

Onde, **s** é a estimativa do desvio padrão da resposta, podendo ser por meio do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e a inclinação da curva analítica (**S**), em níveis próximos ao limite de quantificação (Ribani, et. al., 2004).

1.4.10 Robustez

A robustez é um parâmetro para verificação de desempenho realizado no desenvolvimento do método analítico, que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal. Dentre os parâmetros que contemplam a avaliação da robustez destaca-se: estabilidade das soluções analíticas, tempo de extração, compatibilidade de filtros, variação do pH da solução, diferentes lotes ou fabricantes de solventes e colunas, variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel. Esse parâmetro deve demonstrar o atendimento às características de verificação do sistema para assegurar que a validade do procedimento analítico seja mantida sempre que utilizado (Ministério da Saúde, 2017b; *International Conference on Harmonisation*, 2005).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método analítico para determinar e quantificar a presença de parabenos no medicamento paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os grupos ésteres de parabenos no medicamento paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais;
- Determinar a concentração de parabenos nas formulações solução e suspensão orais;
- Verificar os critérios de aceitação e limites de concentração para cada conservante presente nas formulações farmacêuticas de acordo com a legislação vigente nacional e internacional.

3. Material e Métodos

3.1 Identificação dos grupos ésteres de parabenos no medicamento paracetamol na apresentação solução e suspensão oral

Para a identificação dos grupos ésteres de parabenos na formulação do medicamento paracetamol na apresentação solução e suspensão oral, o critério de escolha para cada amostra comercial foi a presença de metilparabeno, etilparabeno e propilparabeno na formulação. Quanto ao etilparabeno, a pesquisa realizada por meio das bulas do medicamento, da literatura e pelo site da ANVISA, na aba bulário eletrônico, não foi possível encontrar formulações com a presença desse éster. Algumas formulações infantis apresentavam a informação da presença do butilparabeno, não sendo este o conservante escolhido para o estudo, pois a prevalência dos grupos metilparabeno e propilparabeno é mais frequente em formulações farmacêuticas, especificamente nas formulações líquidas.

Algumas amostras comerciais apresentavam na bula o descritivo da presença de metilparabeno e propilparabeno, outras somente a presença de propilparabeno, especificamente nas apresentações em suspensões, destinados para uso pediátrico.

3.1.1 Análises Estatísticas

Para os cálculos e análises estatísticas dos dados, foi utilizado o programa estatístico Minitab. A análise de variância foi realizada por meio do Teste ANOVA e Teste F, com nível de significância $p < 0,05$. O Desvio Padrão Relativo (DPR) foi definido como aceitável quando $< 5\%$, coeficiente de correlação acima de 0,990 e coeficiente angular diferente de zero.

3.1.2 Reagentes e insumos

Para a validação do método analítico por CLAE foi utilizado solvente Metanol grau cromatográfico (Vetec®). Os reagentes utilizados foram: ácido fosfórico e ácido clorídrico (Merck®), hidróxido de sódio (Synth®), peróxido de hidrogênio (Dinâmica®), cloreto de ferro III (LabSynth®). Para o preparo do placebo da amostra na forma farmacêutica solução, selecionaram-se os seguintes reagentes: ácido cítrico (Vetec®), ciclamato de sódio (Merck®),

corante amarelo tartrazina (Brastóquio®), metabissulfito de sódio (Vetec®), macrogol conhecido por polietilenoglicol 400 – PEG 400 (Synth®) e sacarina sódica (Synth®). Para o preparo do placebo da amostra na forma farmacêutica suspensão, os reagentes selecionados foram: ciclamato de sódio (Merck®), dióxido de titânio (Metallchemie®), glicerol ou glicerina como é conhecido (MV Química ®), goma xantana (Doremus®), propilenoglicol (Aromas e Artes®), sacarina sódica (Synth®), sucralose (Synth®), sorbitol (Synth®), aroma artificial de frutas roxas (Aromas e Artes®), ácido cítrico (Vetec®), citrato de sódio (Vetec®) e sulfito de sódio (Carbonor®).

Para filtração de fase móvel e amostras (precedida à injeção), foram utilizadas membranas Durapore PVDF com poros de 0,45µm de diâmetro e unidades filtrantes com poro de 0,45µm, ambas da marca Millipore®.

No desenvolvimento da metodologia analítica foram testadas diferentes colunas em fase reversa e capeadas: Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 x 150mm, 5µm; Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 x 250mm, 5µm; Poroshell HPH-C18 4,6 x 150mm, 4µm e Zorbax Eclipse XDB-CN 4,6 x 150mm, 5µm (todas da marca Agilent®). As colunas cromatográficas foram disponibilizadas pelo Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos (NFQM) do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

3.1.3 Padrões analíticos e amostras comerciais

Foram adquiridas oito amostras de paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão de uso oral de estabelecimentos farmacêuticos de setor público, Sistema de Vigilância Sanitária Municipal, e privado, redes varejistas e farmácias de bairros do município de São Paulo, com base na lista de medicamentos de referência e genérico registrados na ANVISA. Dentre as oito amostras comerciais de paracetamol, cinco foram medicamentos genéricos, denominados G1, G2, G3, G4 e G5, e três foram medicamentos similares denominados S1, S2 e S3, de diferentes fabricantes. A substância química de referência do paracetamol (lote 3009, pureza de 99,9%) foi proveniente da Farmacopeia Brasileira - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), concedida pelo Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos (NFQM) do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Os padrões de Metilparabeno (lote R098BO, pureza de 99,8%) e Propilparabeno (lote

R002FO, pureza de 99,9%) foram adquiridos da Farmacopeia Americana - USP.

3.1.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: balanças analíticas Mettler Toledo® MT5 e AL 204, ultrassom Unique Ultrasonic Cleaner®, agitador mecânico da Burrell®, estufa de secagem Binder® e pHmetro Fisher Scientific® AE150. Para o preparo das soluções foi utilizada água ultra purificada em sistema Purelab Classic DI Elga®. Micropipetas *Eppendorf* (100-1000µL e 500-5000µL) foram usadas para efetuar as medidas de volume.

Para o desenvolvimento do método analítico para identificar e quantificar parabenos no medicamento paracetamol: cromatógrafo Shimadzu Solvent Delivery System®, com injetor automático, forno de coluna e detector UV, sinal de saída monitorado e integrado com o *software* CLASS VP 10 (Shimadzu Corporation, Japão), localizado no laboratório do NFQM.

3.1.5 Condições cromatográficas

Para obter um método analítico proposto no presente trabalho, realizou-se vários testes até alcançar a melhor otimização do método. Foram testadas várias fases móveis, com diferentes combinações de tampões, ácidos, sais e solventes, diferentes comprimentos de onda, fluxos, temperatura da coluna, volume de injeção e pH. As corridas foram testadas em modo isocrático e gradiente. Com base nas tentativas acima, a eluição em modo isocrático demonstrou melhor resolução e reduziu o tempo necessário para separar os componentes relativamente polares usando uma coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-CN 4,6x150mm, 5µm.

3.1.6 Preparo do Padrão e Diluente

Para o preparo de solução estoque, 50mg de paracetamol foram pesados com exatidão, adicionados em balão volumétrico de 25mL, dissolvidos em metanol, obtendo uma concentração teórica de 2mg.mL^{-1} . Transferiu-se dessa solução 2mL para um balão volumétrico de 10mL, completando o volume com o diluente, obtendo uma concentração teórica final de paracetamol em $400\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para o preparo do metilparabeno e do propilparabeno, foram pesados 20mg com exatidão, adicionados em balão volumétrico de 100mL, dissolvidos em metanol, obtendo uma concentração teórica de $0,2\text{mg.mL}^{-1}$. Transferiu-se da solução de MP 1mL para um balão volumétrico de 10mL, completando o volume com o diluente. A partir desta segunda diluição, transferiu-se 3mL para um balão volumétrico de 10mL, completando o volume com o diluente, obtendo-se concentração teórica final de metilparabeno em $6\mu\text{g.mL}^{-1}$. O mesmo aplicou-se para o preparo de propilparabeno, transferiu-se da solução estoque 1mL para um balão volumétrico de 10mL, completou-se o volume com o diluente. A partir desta segunda diluição, transferiu-se 1mL para um balão volumétrico de 10mL, completando o volume com o diluente, obtendo-se concentração teórica final de propilparabeno em $2\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cada um dos compostos foi analisado individualmente para a confirmação do tempo de retenção.

O diluente utilizado para todas as amostras do estudo foi a mistura de metanol com água na proporção de 1:1(v/v).

Em um balão volumétrico de 10mL, uma solução padrão combinada do balão estoque de paracetamol (2mL) da primeira diluição com os conservantes de MP (3mL) e PP (1mL) a partir da segunda diluição foi preparada, completando o volume com o diluente. A concentração teórica final obtida foi $400\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o PCM, $6\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o MP e $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o PP.

3.1.7 Preparo das Amostras

As amostras usadas para validação do método foram nomeadas em Amostra A1 (solução) e Amostra A2 (suspensão). Para o preparo das amostras, pesou-se o equivalente a 400mg de paracetamol e foi adicionado em balão volumétrico de 100mL. Os frascos das amostras foram agitados manualmente para garantir a distribuição uniforme dos ingredientes antes da transferência. Adicionou-se 40mL do diluente e levou-se a ultrassom por 10 minutos. Em seguida, o balão permaneceu por mais 10 minutos em agitação mecânica. Após esse preparo, completou-se o volume do balão com o diluente. Transferiu-se dessa solução 5mL para um balão volumétrico de 50mL, obtendo-se concentração teórica final de paracetamol em $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.1.8 Preparo dos Placebos das Amostras A1 e A2

Para o desenvolvimento das formulações farmacêuticas, a escolha dos excipientes passa por uma seleção criteriosa e fundamentada em compêndios oficiais e documentos científicos para fins de registro do produto acabado, para garantir a segurança desses ingredientes. No entanto, a divulgação da quantidade usada nas formulações não é declarada, legitimada pelo termo de confidencialidade dos fabricantes e por documentos avaliados pelos órgãos competentes.

Para a formulação dos placebos, as informações concernentes à composição dos excipientes foram baseadas nas bulas dos medicamentos.

A quantidade usada para preparar o placebo das amostras A1 e A2 foi baseada no *"Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products"* preconizado pelo FDA, onde são declarados os limites permitidos de acordo com as potências máximas por dose unitária ou exposição máxima diária dos excipientes de uma formulação, conforme descrição nas tabelas 2 e 3 (*Food and Drug Administration*, 2019).

Tabela 2- Quantidade máxima de excipiente para o preparo do placebo da amostra A1 de acordo com a potência máxima por dose unitária

Excipiente	Via de administração	Forma farmacêutica	Potência máxima por dose unitária (mg)
Ácido cítrico	Via oral	Solução	52,8
Ciclamato de sódio*	Via oral	Solução	0,34
Corante amarelo tartrazina	Via oral	Solução	2,0
Metabissulfito de sódio	Via oral	Solução	64,0
Poli(etil)enoglicol 400	Via oral	Solução	2.400,0
Sacarina sódica	Via oral	Solução	44,8
Total			2.563,94mg

Legenda: * Dado coletado do *Handbook excipients* 6^a ed.
 Fonte: *Food and Drug Administration*, 2019.

Tabela 3- Quantidade máxima de excipiente para o preparo do placebo da amostra A2 de acordo com a potência máxima por dose unitária

Excipiente	Via de administração	Forma farmacêutica	Potência máxima por dose unitária (mg)
Ciclamato de sódio*	Via oral	Suspensão	0,48
Dióxido de titânio	Via oral	Suspensão	11,2
Glicerol	Via oral	Suspensão	2.620,8,0
Goma xantana	Via oral	Suspensão	14,8
Propilenoglicol	Via oral	Suspensão	2.712,0
Sacarina sódica	Via oral	Suspensão	400,0
Sucralose	Via oral	Suspensão	26,4
Sorbitol	Via oral	Suspensão	4.500,0
Ácido cítrico	Via oral	Suspensão	288,0
Citrato de sódio	Via oral	Suspensão	27,5
Sulfito de sódio	Via oral	Suspensão	2,3
Aroma artificial de frutas roxas	Via oral	Suspensão	0,05
Total			7.982,73mg

Legenda: * Dado coletado do *Handbook excipients* 6^a ed.

Fonte: *Food and Drug Administration*, 2019

Para ambos os placebos, foi realizada a soma da potência máxima por dose unitária de cada excipiente (*Food and Drug Administration*, 2019).

A dose unitária do medicamento paracetamol foi estabelecida em 1 grama de acordo com a dose usual preconizada na literatura. Todos os excipientes da Tabela 2 e 3 foram pesados em sua potência máxima e misturados em balão volumétrico de 100mL para a formulação de uma dose unitária.

A quantidade de água purificada usada para a formulação do placebo da amostra A1 foi de 1.994,0mg, para o placebo da amostra A2 a quantidade de água purificada foi de 2.847,4mg.

A massa dos excipientes na forma farmacêutica líquida (propilenoglicol, sorbitol, PEG 400, glicerina e a água) foi corrigida individualmente com base na densidade, e pipetados no balão volumétrico.

O preparo dos placebos seguiu os mesmos critérios do item 3.1.7 Preparo das Amostras, a partir da segunda diluição transferiu-se 2mL para o balão volumétrico de 50mL, completando o volume com o diluente.

3.2 Validação do Método Analítico

3.2.1 Parâmetros de desempenho para Validação do Método

Para o propósito deste estudo, a determinação e a quantificação do ativo paracetamol e dos conservantes metilparabeno e propilparabeno por CLAE foram validadas pelas diretrizes da ANVISA (RDC Nº 53 de 2015 e RDC Nº 166 de 2017) com auxílio dos guias do ICH - Q2R1, da WHO TRS 929 – Anexo 3 e do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2020, dentro dos contextos descritos a seguir.

3.2.1.1. Linearidade

O teste de linearidade foi realizado em triplicata usando cinco concentrações diferentes da SQR de PCM, MP e PP na faixa de 16% a 150% relativo aos seus valores teóricos (PCM $400\mu\text{g.mL}^{-1}$, MP $6\mu\text{g.mL}^{-1}$ e PP $2\mu\text{g.mL}^{-1}$). Soluções correspondentes a cada nível de concentração foram injetadas e a análise de regressão linear das áreas de pico de PCM, MP e PP (y) versus concentração de PCM, MP e PP (X) foi obtida por correlação pelo método dos mínimos quadrados.

3.2.1.2 Limites de Detecção e Quantificação

Para determinar o Limite de Quantificação e o Limite de Detecção, os cálculos foram estimados com base nos dados da regressão linear da curva analítica com aplicação da equação $LQ = (10 \times \text{intercepto} / \text{coeficiente angular})$. Para o limite de detecção, o cálculo foi baseado no valor encontrado do LQ, dividindo o LQ por 3,3.

3.2.1.3 Especificidade

Para determinação da especificidade, foi injetado o branco, os componentes de interesse separadamente e em conjunto (PCM, MP, PP), e as amostras. Nenhuma interferência significativa foi observada no tempo de retenção dos componentes de interesse.

3.2.1.4 Adequação do sistema

Os parâmetros selecionados para avaliação da adequação do sistema, o *System Suitability* foram os Pratos teóricos (N), Assimetria, Tempo de retenção (Rt), Resolução (R) e Altura equivalente a um prato teórico (HEPT). Todos foram calculados e comparados com os critérios de aceitação para confirmar a adequação do método desenvolvido.

Para determinar a exatidão e precisão do sistema, foram injetadas cinco injeções em replicatas de soluções padrão combinadas de PCM, MP e PP. Os valores para cada parâmetro estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Resultados da avaliação da adequabilidade do sistema para as substâncias químicas de referência do Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno

Parâmetros	Paracetamol DPR* (%)	Metilparabeno DPR (%)	Propilparabeno DPR (%)	Critérios de aceitação
Pratos teóricos (N)	7402,46 0,80	13513,01 0,28	18108,48 0,156	>2000
Assimetria	1,36 1,12	1,26 1,01	1,10 0,53	≤2
Tempo de retenção	2,311 0,07	3,245 0,05	4,807 0,04	>1
Resolução	2,45 0,77	3,30 0,26	4,76 0,098	>2
HETP**	0,1013	0,0555	0,0414	>0.012

Legenda: *DPR - Desvio Padrão Relativo

***Height equivalent of a theoretical plate* (HETP) = $5 L/N$, onde L é o comprimento da coluna.

3.2.1.5 Exatidão

Nesse estudo, a exatidão foi avaliada nos termos de recuperação da quantidade conhecida da SQR de PCM, MP e PP adicionado no placebo. A verificação foi realizada com nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações baixa com percentual de 80%, média em 100% e alta com 120%, com três réplicas em cada nível. O preparo das amostras foi a partir dos balões estoque das SQR, conforme descrito no item 3.1.6 Preparo do Padrão e Diluente estando em acordo com o artigo 44 da RDC Nº 166 de 2017, obedecendo aos critérios de diluição e o uso do mesmo diluente.

3.2.1.6 Precisão- Repetibilidade e Intermediária

O ensaio de precisão para repetibilidade foi conduzido com seis determinações independentes de 400mg de paracetamol das amostras A1 e A2 adicionadas em balão volumétrico de 100mL. O preparo das amostras seguiu os mesmos critérios descritos no item 3.1.7 Preparo das Amostras obtendo-se concentração teórica final de paracetamol em $400\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para determinar a precisão intermediária, o ensaio foi conduzido com o emprego das mesmas amostras, mesmas condições de operação e instrumentação no mesmo laboratório, porém, em dias diferentes e analistas diferentes. O preparo das amostras contemplou as mesmas condições, mesmas concentrações e mesmas determinações descritas no ensaio da repetibilidade.

3.2.1.7 Seletividade

Para avaliar o grau de interferentes nas amostras do estudo, o ensaio de degradação forçada foi realizado com a exposição do padrão, amostras e placebos formulados, nas condições de estresse, com base na RDC Nº 53 de 2015, que estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Modelo experimental do estudo de degradação forçada para determinação da seletividade do procedimento analítico

Condição de Estresse	Condição de degradação	Temperatura	Tempo de Coleta
Hidrólise ácida	Solução de HCl** a 1 M	Ambiente	D*0, D3, D6 e D10
Hidrólise básica	Solução de NaOH*** a 0,1 M	Ambiente	D0, D3, D6 e D10
Termolítica	Estufa	60°C	D0, D3, D6 e D10
Oxidação	Solução de H ₂ O ₂ **** a 3,0%	Ambiente	D0, D1 e D 3
Oxidorredução	Solução de FeCl ₃ ***** a 0,05M	Ambiente	D0, D1
Fotolítica	Exposição solar	Ambiente	D0, D1 e D 3

Legenda: *D - Dias de coleta

HCl (ácido clorídrico), *NaOH (hidróxido de sódio), ****H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e *****FeCl₃ (cloreto de ferro III)

O preparo do padrão seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.6 Preparo do Padrão e Diluente. Para o preparo das amostras, ambas foram preparadas conforme item 3.1.7 Preparo das Amostras, com quantidade equivalente a 400mg de paracetamol, adicionado em balão volumétrico de 100mL. Os placebos seguiram os mesmos critérios de preparo descritos no item 3.1.8 Preparo dos Placebos das Amostras A1 e A2.

Os ensaios foram conduzidos de acordo com o desenho experimental estabelecido no estudo de degradação dos compostos de interesse. As condições de estresse hidrolítica (ácida e básica), oxidação, e íons metálicos foram preparadas com acréscimo de 10% da solução degradante (HCl 1M, NaOH 0,1M, H₂O₂ 3,0%, FeCl₃ 0,05M) no volume do balão volumétrico de 100mL. O grupo de Baertschi et. al., 2011, recomenda não neutralizar as amostras degradadas por hidrólise para evitar a formação de compostos secundários, de igual modo para a degradação oxidativa, recomenda-se utilizar 10% de metanol com a mesma finalidade citada (Baertschi et al., 2011).

Para a condição termolítica, os balões foram acondicionados em estufa a 60°C. Para a degradação fotolítica, os balões foram acondicionados próximo à janela do laboratório por 3 dias consecutivos com temperatura controlada na faixa de 25,0 ± 5,0°C. Devido às características catalisadoras ou promotoras de reações dos degradantes, todas as etapas de procedimento foram realizadas sob proteção da luz, exceto para degradação fotolítica.

As realizações das coletas foram feitas de acordo com o tempo de exposição e coleta proposto na Tabela 5. Na coleta inicial (tempo zero - D0), os balões volumétricos do padrão, amostras e placebos foram preparados com adição de 40mL de diluente, levados em ultrassom por 10 minutos, posteriormente levados a agitação mecânica por 10 minutos. Completou-se o volume com o diluente conforme descrito no procedimento item 3.1.7 Preparo das Amostras. Para os demais balões, aguardou-se atingir o tempo da coleta para diluição completa da solução, com adição do diluente. Todas as amostras foram analisadas por CLAE dentro do tempo estimado para cada condição de estresse. Foi preparada uma solução padrão de controle com ausência de agentes degradantes para o monitoramento da degradação e para o controle sobre a faixa desejada de degradação, sendo o mínimo de 10% do ativo degradado. (Ministério da Saúde, 2015).

O tempo necessário para contemplar as condições de exposição máxima (*endpoints*) para o estudo de degradação forçada foi definido por meio do guia da WHO TRS 929 – Anexo 3 da *World Health Organization*, 2005. (Anexo 1)

3.2.1.8 Robustez

Para determinar a robustez do método analítico proposto, as variações das condições analíticas avaliadas foram: pH da fase móvel, inicialmente 6,5, 5,5 e ajustado para 5,0. A temperatura também foi avaliada na faixa de 30°C, 25°C e finalizado com 20°C. Os picos cromatográficos foram analisados em equipamentos cromatográficos distintos, com a mesma coluna.

4. Resultados

4.1 Identificação dos grupos ésteres de parabenos nas amostras comerciais do medicamento paracetamol na apresentação solução e suspensão oral

O paracetamol é uma substância ativa usada em combinação com os conservantes parabenos disponível nas formulações farmacêuticas solução e suspensão orais.

O critério de seleção das amostras comerciais baseou na presença de parabenos declarado na bula do medicamento paracetamol, prioritariamente os que continham a presença dos excipientes metilparabeno e propilparabeno na formulação.

4.1.2 Condições cromatográficas estabelecidas para o método analítico

Concluído o desenvolvimento do método, as condições cromatográficas estabelecidas para o método analítico por CLAE seguem descritas na Tabela 6.

Tabela 6- Condições cromatográficas finais para determinação de parabenos no medicamento paracetamol por CLAE

Condições cromatográficas	
Cromatógrafo	Shimadzu Solvent Delivery System®
Coluna	Zorbax Eclipse XDB-CN 4,6 x 150 mm, 5 µm
Temperatura da coluna	20°C
Detector	245nm
Fase móvel	Ácido fosfórico (0,1%) e Metanol (65:35 v/v)
Fluxo	1mL/min
Vol. Injeção	20µL

A coluna selecionada apresentou retenção seletiva dos compostos pelo mecanismo de interação dipolar devido suas características físico-químicas, conferindo maior eficiência cromatográfica. A interação intermolecular entre o analito e a fase estacionária da coluna com grupo ciano pode ser observada de forma ilustrativa na Figura 4.

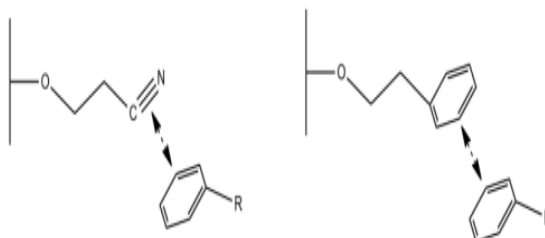
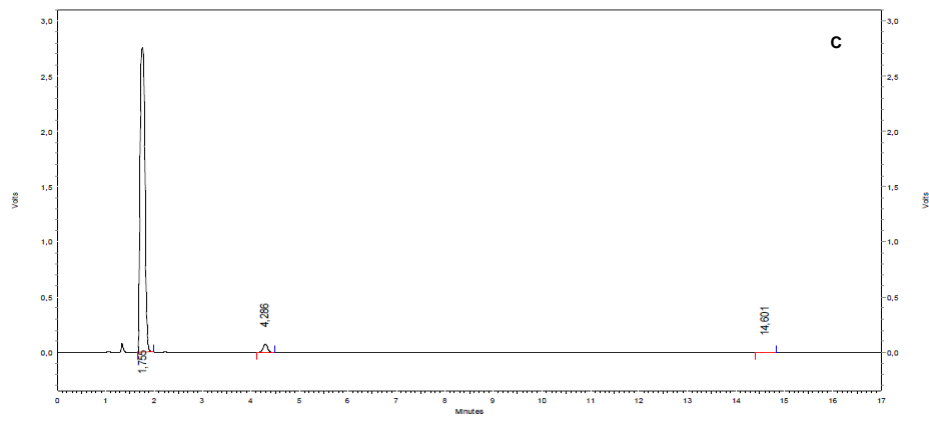
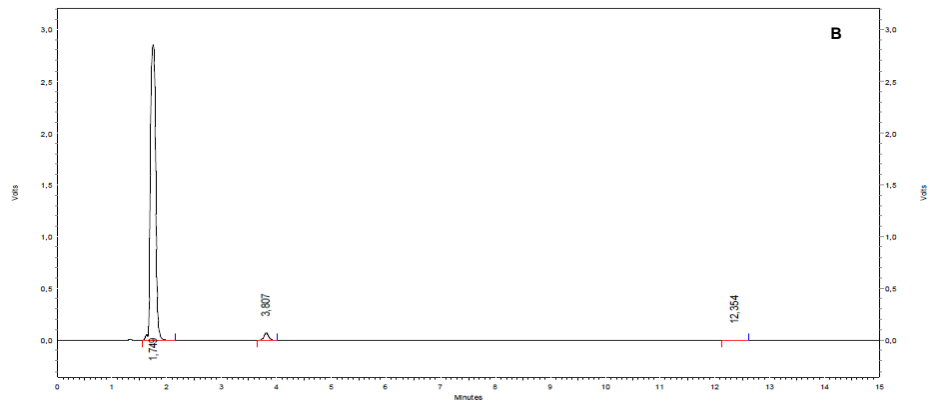
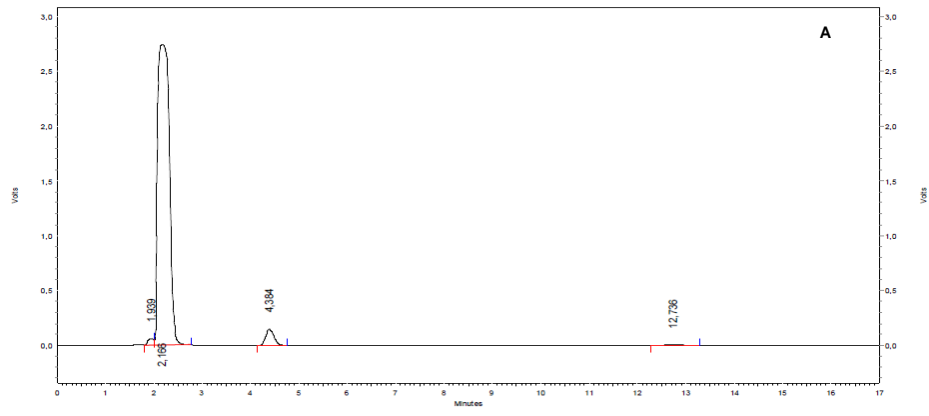


Figura 4. Representação ilustrativa da força intermolecular entre o analito e a fase estacionária no modo reverso de eluição. Adaptado de Rondon, 2013.

Alguns ensaios exploratórios iniciais foram realizados a fim de determinar a melhor condição cromatográfica para a validação do método. O comportamento dos compostos analisados pode ser observado nos cromatogramas da Figura 5, dentro das condições estabelecidas para cada ensaio. Diante do exposto, é possível observar os picos cromatográficos das etapas de otimização do método analítico em função da melhor resposta obtida nos termos de resolução, tempo de retenção, fase móvel e seletividade. O cromatograma D apresentou a melhor condição para separação dos componentes.



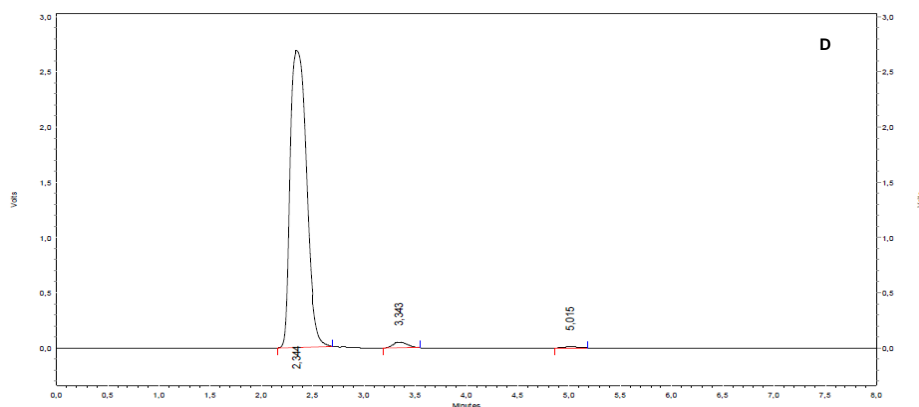


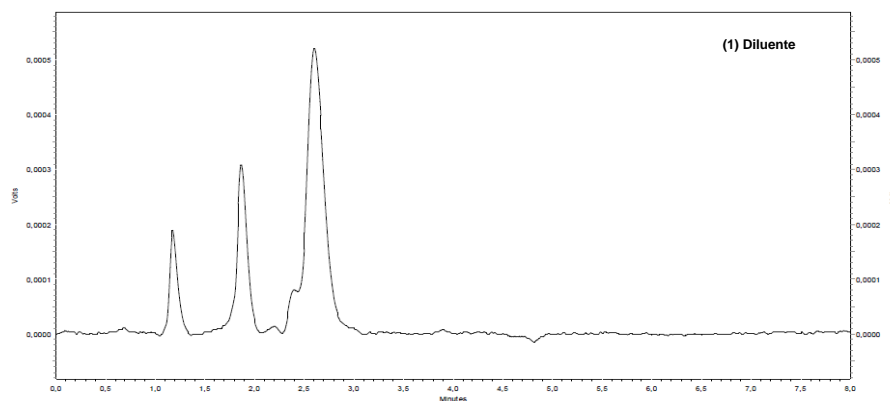
Figura 5: Cromatogramas representativos da etapa de otimização do método analítico
 Legenda: Cromatograma A: Fase móvel: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MeOH}$ (54:46 v/v) em pH 7,0, coluna Zorbax Eclipse XDB-C18, a 30°C , com fluxo de $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 252nm.

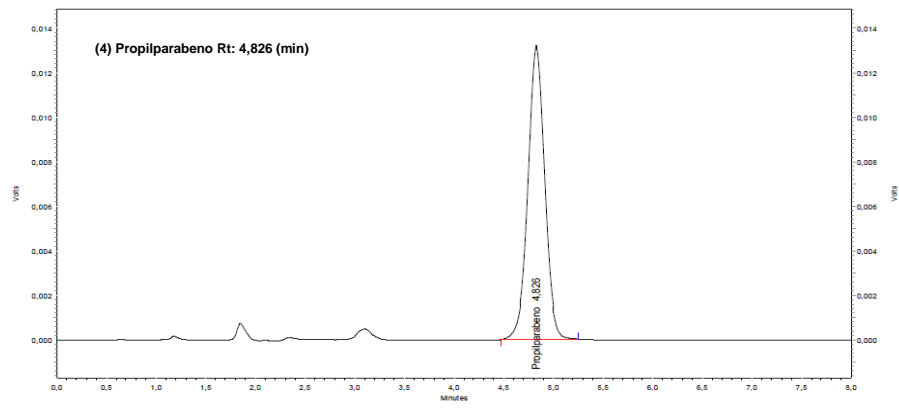
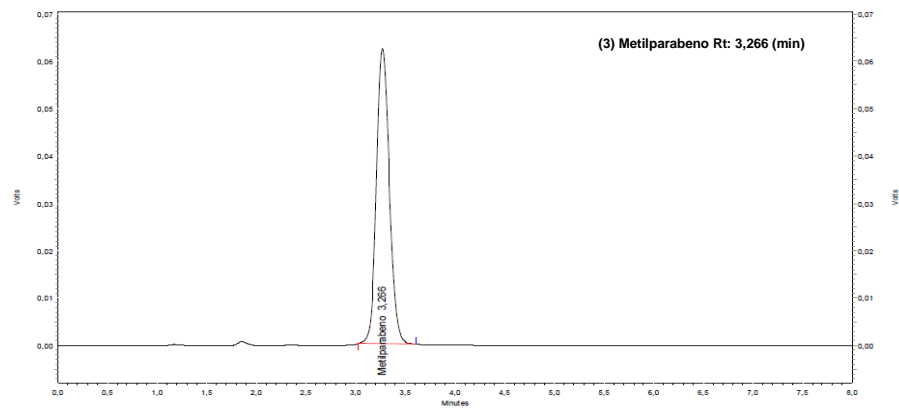
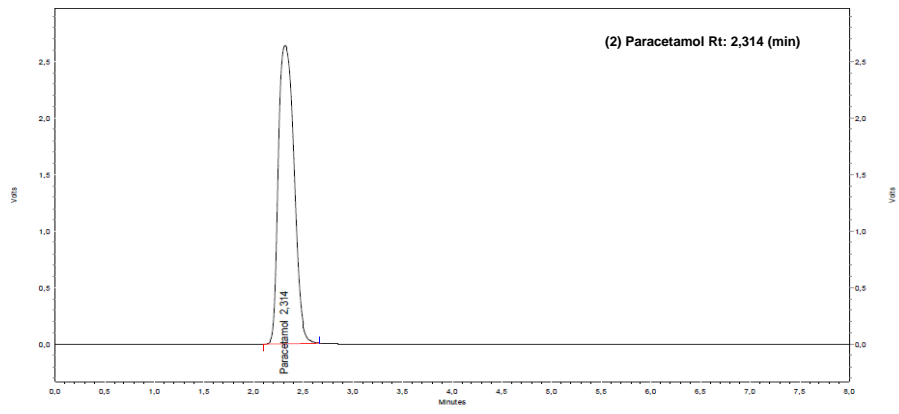
Cromatograma B: Fase móvel: tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MeOH} + \text{Trietilamina}$ (56:44:5 v/v/v) em pH 7,5, coluna Zorbax Eclipse Plus-C18, a 30°C com fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 252nm

Cromatograma C: Fase móvel: ácido fosfórico 0,1% + MeOH (55:45 v/v) em pH 5,5, coluna Zorbax Eclipse Plus-C18, a 40°C com fluxo de $1,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 246nm.

Cromatograma D: Fase móvel: ácido fosfórico 0,1% + MeOH (65:35 v/v) em pH 5,0, coluna Zorbax XDB-CN, a 20°C com fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em 245nm.

Os testes de especificidade do método produziram uma resposta satisfatória nos critérios de separação e tempo de retenção dos analitos conforme a apresentação dos cromatogramas descritos na Figura 6, obtidos nas condições cromatográficas expressas na tabela 6.





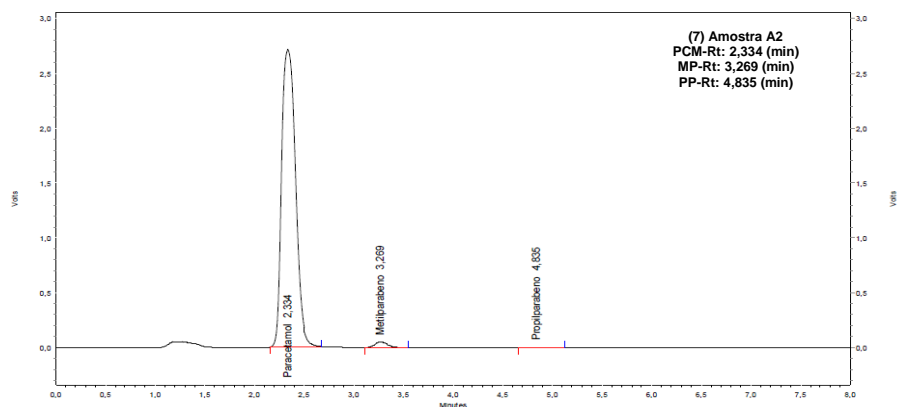
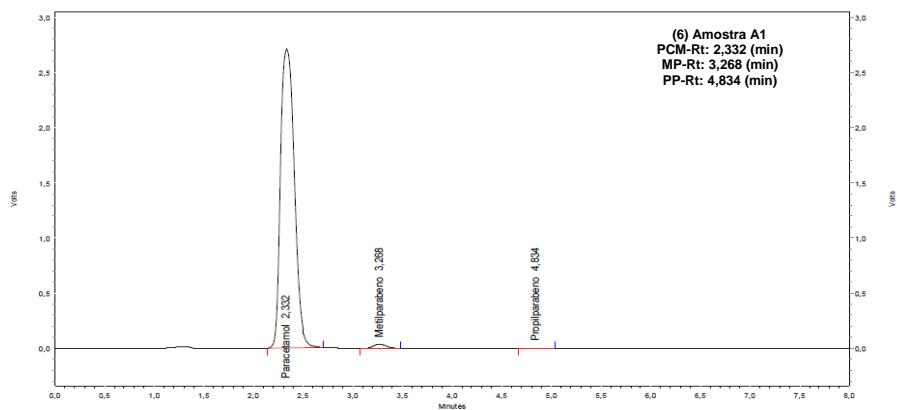
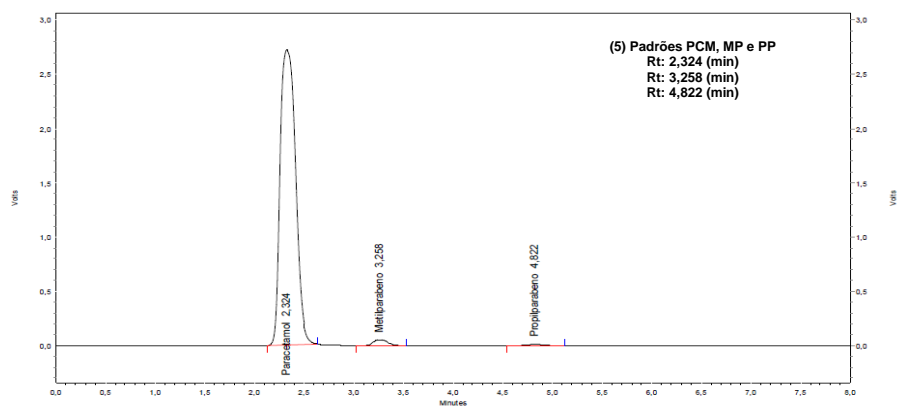


Figura 6: Cromatogramas representativos do Diluente (1), da substância química de referência do Paracetamol (2), do Metilparabeno (3), do Propilparabeno (4), da solução combinada dos padrões Paracetamol, Metilparabeno, Propilparabeno (5), da Amostra A1(6) e Amostra A2(7).

Legenda: Rt - Tempo de Retenção

4.1.3 Robustez

Os resultados do tempo de retenção dos analitos em estudo, do PCM, do MP e do PP mantiveram entre 2,3 minutos, 3,2 minutos e 5,0 minutos, respectivamente. O DPR do tempo de retenção e das áreas dos cromatogramas foi inferior a 2%, demonstrando confiabilidade analítica do método proposto.

4.1.4 Curva Analítica do Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno

A linearidade do método foi estabelecida com o preparo de cinco concentrações da SQR de PCM ($100,0\mu\text{g.mL}^{-1}$, $200,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $300,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $400,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500,0\mu\text{g.mL}^{-1}$), de MP ($1,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $3,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $5,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $7,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $9,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) e PP ($1,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,5\mu\text{g.mL}^{-1}$; $2,0\mu\text{g.mL}^{-1}$; $2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata, de maneira independente. Conforme representação gráfica das respostas da área em função da concentração do analito, a equação da reta e o coeficiente de determinação obtidos foram: $y = 39838x + 490560$ e $R^2 0,9994$ para PCM, $y = 97159x - 12085$ e $R^2 0,9992$ para MP e $y = 91805x - 2661,8$ e $R^2 0,9997$ para PP. O coeficiente de correlação foi satisfatório, indicando uma associação linear entre os dados analisados, conforme apresentado na Figura 7.

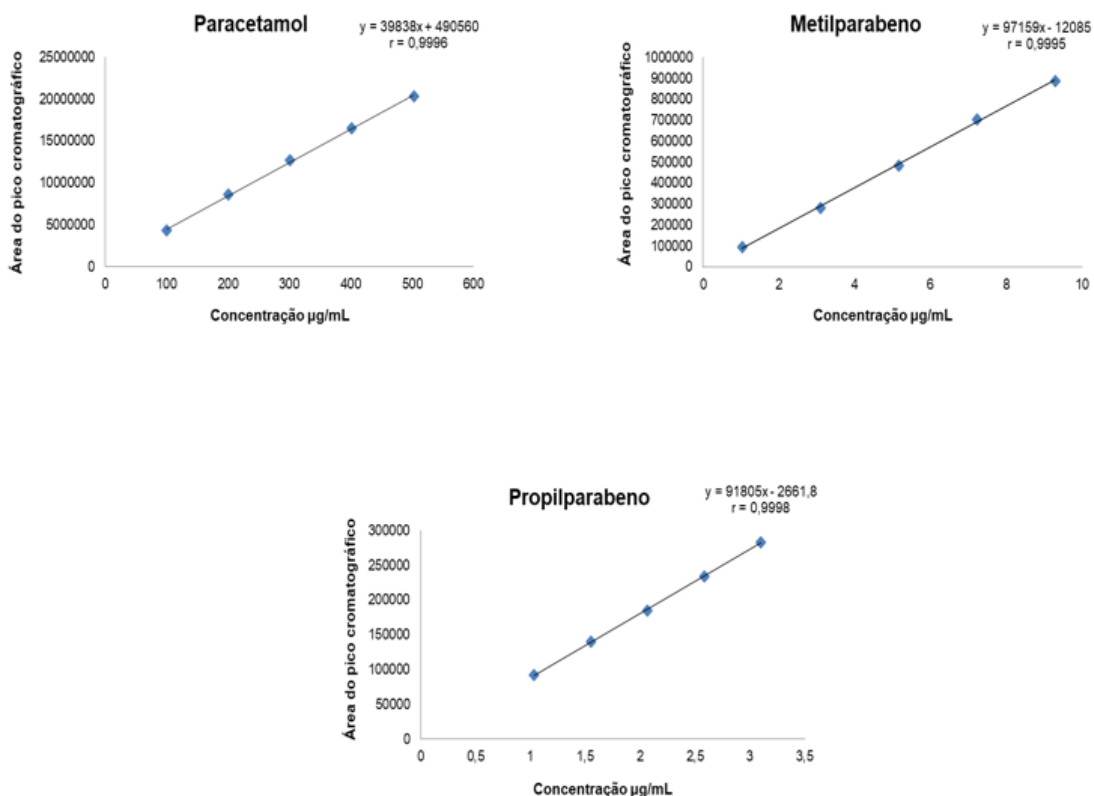


Figura 7 - Curva analítica da substância química de referência do Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno.

4.1.5 Limite de Detecção e Quantificação

Os resultados obtidos do LD e LQ, por meio dos parâmetros da curva analítica foram: LQ do PCM, MP e PP: $57,09\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,066\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,010\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Para o LD os valores obtidos foram: $18,84\mu\text{g.mL}^{-1}$ para PCM; $0,021\mu\text{g.mL}^{-1}$ para MP e $0,003\mu\text{g.mL}^{-1}$ para PP.

4.1.6 Exatidão

Para a quantificação dos compostos de interesse (PCM, MP e PP), foram adicionadas no placebo quantidades conhecidas dessas SQR. Os resultados obtidos no Placebo A1 para os compostos PCM, MP e PP foram: 101,7%, 100,0% e 98,4%; 98,9%, 103,4% e 100,4% e 98,4%, 98,4% e 101,3% na ordem crescente das concentrações (baixa, média e alta), respectivamente. O valor do DRP entre as injeções foi inferior a 2%, com valores de 0,64 para PCM, 0,20 para MP e 0,42 para PP. Da mesma forma, os resultados obtidos no

Placebo A2 para os compostos PCM, MP e PP foram: 100,9%, 100,4%, 98,2%; 98,7%, 103,7%, 100,0% e 98,0%, 98,5%, 101,2% para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente. Os valores do DRP obtidos foram: 0,24 para PCM; 0,33 para MP e 0,73 para PP.

Considerou-se a média individual dos valores encontrados para cada concentração individual dos analitos em estudo. Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 permaneceram enquadrados na faixa estabelecida para recuperação esperada em função da concentração da substância analisada para medicamentos (entre 98% a 102% para PCM e 95% a 105% para MP e PP) conforme descrito no guia orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2020. (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2020).

Tabela 7- Resultados do procedimento analítico da Exatidão do ativo paracetamol, dos conservantes metilparabeno e propilparabeno na Amostra 1

Amostra 1	Recuperação – Concentração (Médias)			
	80%	100%	120%	DPR*
Paracetamol	101,7	100,0	98,4	0,64
Metilparabeno	98,9	103,4	100,4	0,20
Propilparabeno	98,4	98,4	101,3	0,42

Legenda:*DPR Desvio Padrão Relativo

Tabela 8 - Resultados do procedimento analítico da Exatidão do ativo paracetamol, dos conservantes metilparabeno e propilparabeno na Amostra 2

Amostra 2	Recuperação – Concentração (Médias)			
	80%	100%	120%	DPR*
Paracetamol	101,9	100,4	98,2	0,24
Metilparabeno	98,7	103,7	100,0	0,33
Propilparabeno	98,0	98,5	101,2	0,73

Legenda:*DPR Desvio Padrão Relativo

4.1.7 Precisão - Repetibilidade e Intermediária

Os resultados do ensaio de precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária demonstraram que houve concordância entre os resultados do mesmo analito nas concentrações teóricas especificadas para o produto acabado (90% a 110%), realizado sob condições de medidas alteradas, com valor de desvio padrão relativo menor que 2%, conforme critério de aceitação mencionado nas diretrizes do guideline do ICH. A aplicação do teste F nos resultados para paracetamol, metilparabeno e propilparabeno apresentaram F calculado menor que F crítico e p-valor superior a 0,05%, atestando que não houve diferença estatística entre os valores de repetibilidade e de precisão intermediária. (Tabela 9 e 10).

4.1.7.1 Dados da Amostra 1

Para a amostra A1, os resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade foram a média das concentrações do ativo PCM e dos conservantes MP e PP, respectivamente nos seguintes valores: 373,48mg.mL⁻¹, 0,057mg.mL⁻¹ e 0,0021mg.mL⁻¹. No ensaio da precisão intermediária, os resultados da média das concentrações foram: para PCM 372,72mg.mL⁻¹; MP 0,057mg.mL⁻¹ e para o PP 0,0021mg.mL⁻¹. A seguir, na Tabela 9 serão apresentadas as médias das concentrações em porcentagem e do DPR da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 9 – Resultados das médias das concentrações em porcentagem e do DPR do procedimento analítico da Precisão - Repetibilidade e Intermediária com Teste F do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na Amostra 1

Amostra 1	Repetibilidade		Precisão Intermediária		Teste F		
	Média (%)	DPR*	Média (%)	DPR*	F** calculado	F*** crítico	p-valor****
Paracetamol	93,37	0,62	93,18	0,63	3,4711	4,2596	0,0747
Metilparabeno	0,95	0,37	0,95	0,64	0,6227	4,2596	0,4377
Propilparabeno	0,10	1,48	0,10	1,40	1,1892	4,2596	0,2863

Legenda: *DPR - Desvio Padrão Relativo

**F calculado - Razão entre variâncias calculada

***F crítico - Razão entre variâncias crítica

****P valor - Probabilidade com significância menor ou igual a 0,05

4.1.7.2 Dados da Amostra 2

O mesmo cálculo aplicou-se para a amostra A2. Os resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade foram a média das concentrações do ativo PCM e dos conservantes MP e PP nos seguintes valores: 373,60mg.mL⁻¹ para PCM; 0,077mg.mL⁻¹ para MP e 0,0024mg.mL⁻¹ para PP. No ensaio da precisão intermediária, os resultados da média das concentrações foram: para PCM 372,64mg.mL⁻¹; MP 0,077mg.mL⁻¹ e para o PP 0,0024mg.mL⁻¹. Na Tabela 10 estão descritas as médias das concentrações em porcentagem e do DPR da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 10 – Resultados das médias das concentrações em porcentagem e do DPR do procedimento analítico da Precisão - Repetibilidade e Intermediária com Teste F do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno na Amostra 2

Amostra 2	Repetibilidade		Precisão Intermediária		Teste F		
	Média (%)	DPR*	Média (%)	DPR*	F** calculado	F*** crítico	p-valor****
Paracetamol	93,40	0,19	93,16	0,96	3,1050	4,2596	0,0907
Metilparabeno	1,28	0,41	1,28	0,29	0,3388	4,2596	0,5659
Propilparabeno	0,12	0,64	0,12	0,28	0,5433	4,2596	0,4681

Legenda: *DPR - Desvio Padrão Relativo

**F calculado - Razão entre variâncias calculada

***F crítico - Razão entre variâncias crítica

****p-valor - Probabilidade com significância menor ou igual a 0,05

4.1.8 Seletividade

Para complementar o estudo do desempenho do método analítico, as amostras foram estressadas nas condições estabelecidas, a fim de verificar possíveis interferências causadas pelos componentes da matriz que se sobrepõem ou coeluem com os analitos de interesse. Os cálculos foram estimados com os valores da amostra controle.

Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do ativo paracetamol e seus conservantes, metilparabeno e propilparabeno obtidos após o tempo de exposição máxima nas condições degradantes, estão descritos nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11- Resultados da quantificação em porcentagem do ativo PCM e dos conservantes MP e PP na amostra A1 após a degradação oxidativa, fotolítica, hidrolítica, termolítica e por íons metálicos no tempo máximo de exposição

Teor do ativo e conservantes (%)	Amostra controle A1 (%)	Oxidação (%)	Fotólise (%)	Hidrólise ácida (%)	Hidrólise básica (%)	Termólise (%)	Íons metálicos (%)
Degradação do ativo e dos conservantes (%)							
Paracetamol	94,19	81,45	94,75	82,17	80,95	92,90	91,34
		12,74	0,56	12,02	13,24	1,29	2,85
Metilparabeno	0,90	0,78	0,91	0,75	0,70	0,90	0,87
		0,12	0,01	0,15	0,2	0,00	0,03
Propilparabeno	0,10	0,08	0,10	0,08	0,08	0,10	0,10
		0,02	0	0,02	0,02	0	0

Condição do estudo: A degradação dos compostos foi calculada pelo valor do teor de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno da amostra controle subtraído pelo valor do teor de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno sob condição de estresse.

Fator e condição de estresse: Oxidação com H₂O₂ 3%; Fotólise com luz solar; Hidrólise ácida com HCl 1M; Hidrólise básica com NaOH 0,1M; Termólise em 60°C e Íons metálicos com FeCl₃ 0,05M.

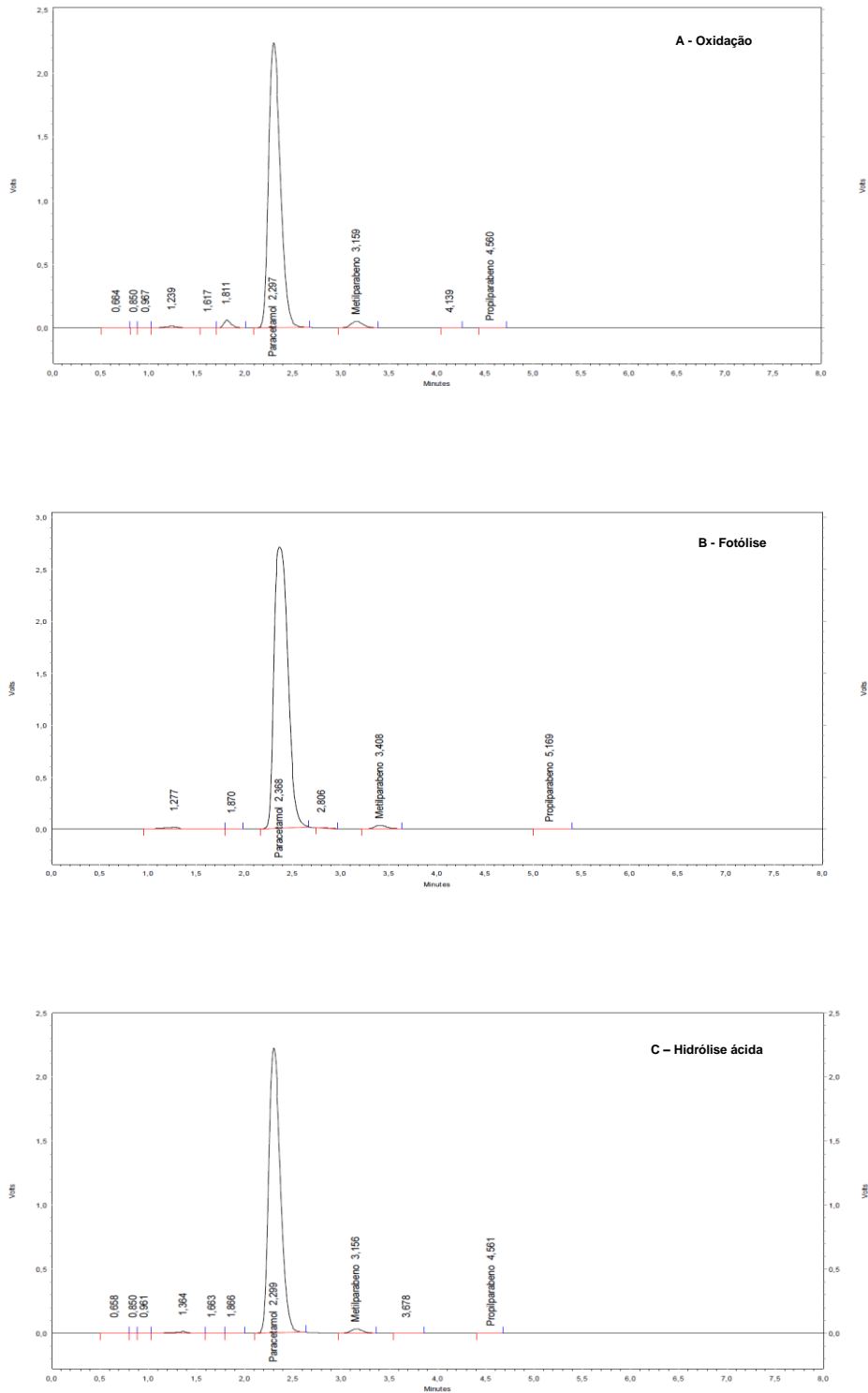
Tabela 12- Resultados da quantificação em porcentagem do ativo PCM e dos conservantes MP e PP na amostra A2 após a degradação oxidativa, fotolítica, hidrolítica, termolítica e por íons metálicos no tempo máximo de exposição

Teor do ativo e conservantes (%)	Amostra controle A2 (%)	Oxidação (%)	Fotólise (%)	Hidrólise ácida (%)	Hidrólise básica (%)	Termólise (%)	Íons metálicos (%)
Degradação do ativo e dos conservantes (%)							
Paracetamol	95,86	79,84	95,38	74,06	72,96	94,43	91,55
		16,02	0,48	21,8	22,9	1,43	4,31
Metilparabeno	1,22	0,98	1,22	0,89	0,87	1,21	1,22
		0,24	0	0,33	0,35	0,01	0
Propilparabeno	0,12	0,09	0,12	0,09	0,09	0,12	0,12
		0,03	0	0,03	0,03	0	0

Condição do estudo: A degradação dos compostos foi calculada pelo valor do teor de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno da amostra controle subtraído pelo valor do teor de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno sob condição de estresse.

Fator e condição de estresse: Oxidação com H₂O₂ 3%; Fotólise com luz solar; Hidrólise ácida com HCl 1M; Hidrólise básica com NaOH 0,1M; Termólise em 60°C e Íons metálicos com FeCl₃ 0,05M.

Nos cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada, Figura 8, é possível observar diferentes graus de degradação, com variabilidade na estabilidade teórica do medicamento. As substâncias relacionadas não foram identificadas e quantificadas neste estudo.



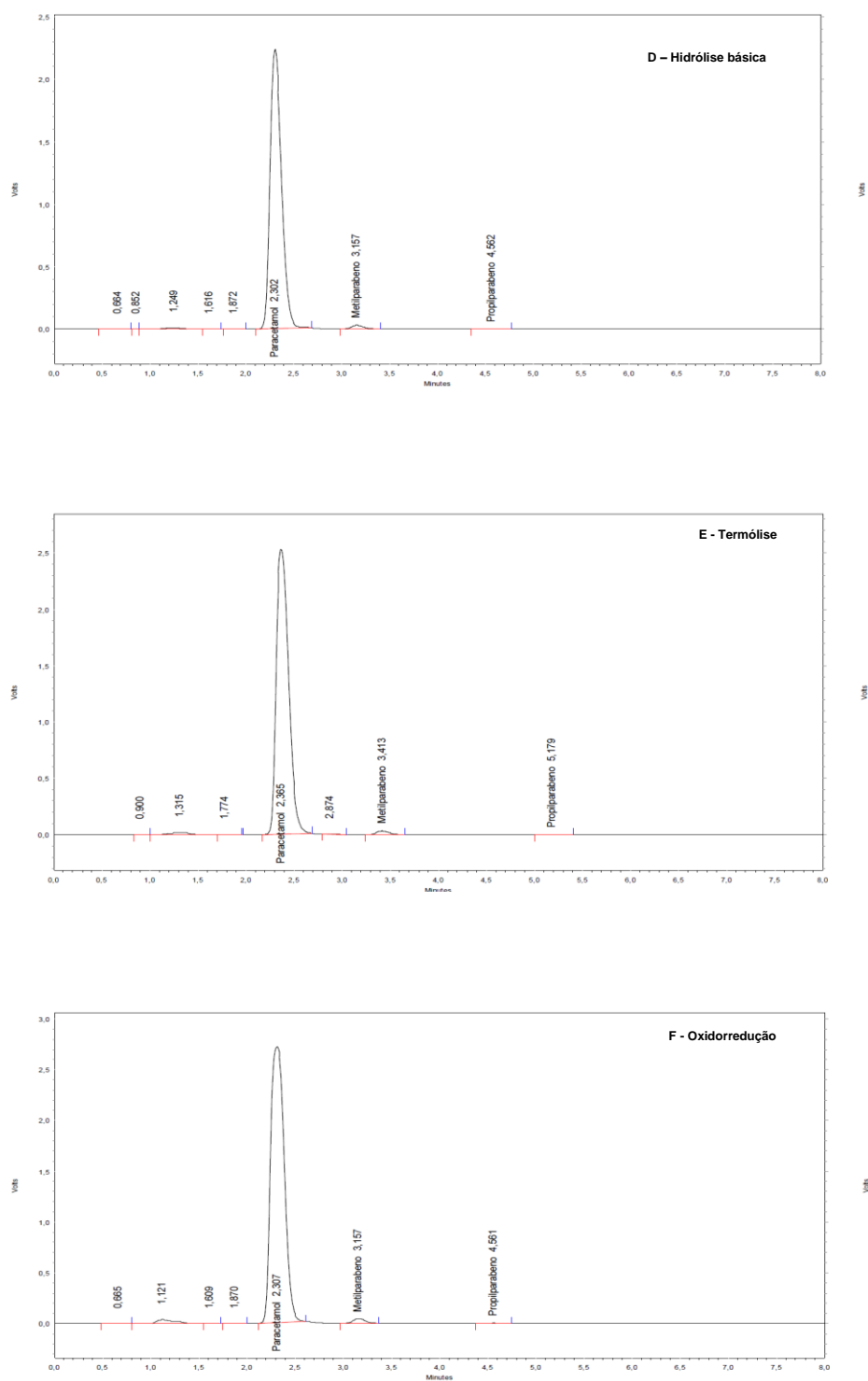


Figura 8. Cromatogramas representativos da degradação forçada na amostra A2 em 10 dias nas condições de estresse: A: Oxidação (H_2O_2 3%); B: Fotólise (luz solar); C: Hidrólise ácida (HCl 1M); D: Hidrólise básica (NaOH 0,1M); E: Termólise (estufa a 60°C); F: Oxidorredução (FeCl_3 0,05M).

A seguir, o gráfico 1 representa os resultados dos testes de degradação forçada do PCM, MP e PP comparados com o valor da amostra controle, no tempo máximo estimado para cada condição de estresse estabelecida para a amostra A1.

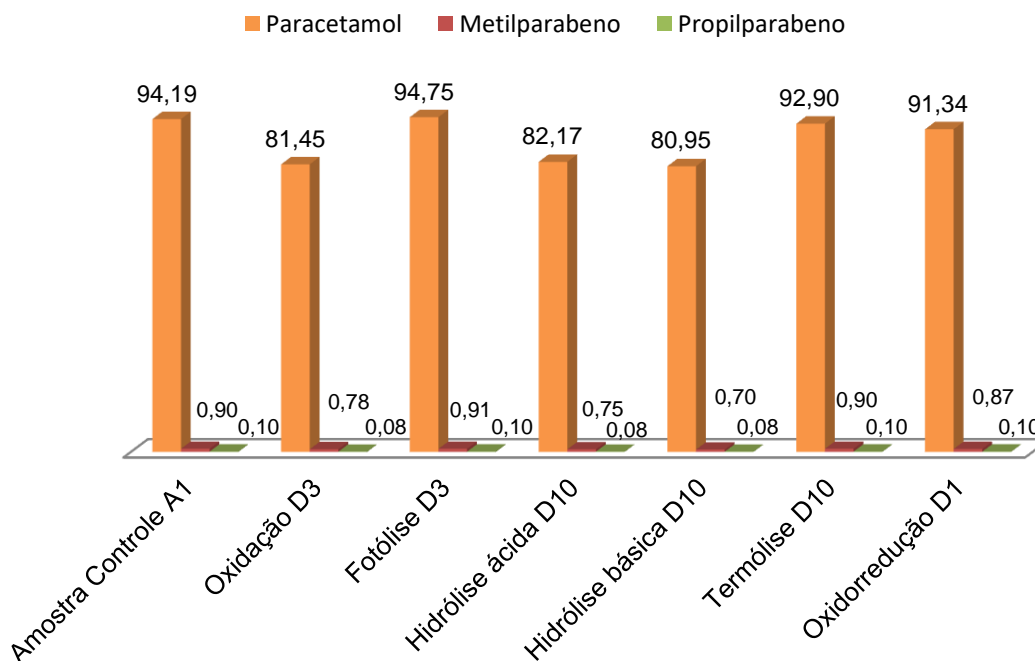


Gráfico 1 - Resultados obtidos em porcentagem da Amostra 1 da degradação forçada do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno comparados com a amostra controle, sob condições de estresse estipuladas no tempo máximo de exposição.

Legenda: D - Dias de coletas

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 em H₂O₂ 3%; Fotólise D3 em luz solar; Hidrólise ácida D10 em HCl 1M; Hidrólise básica D10 em NaOH 0,1M; Termólise D10 em estufa a 60°C e Íons metálicos D1 em FeCl₃ 0,05M.

Os gráficos 2, 3 e 4 representam a maior variabilidade da estabilidade do ativo Paracetamol e dos conservantes Metilparabeno e Propilparabeno na degradação forçada por estresse oxidativo, hidrólise ácida e básica.

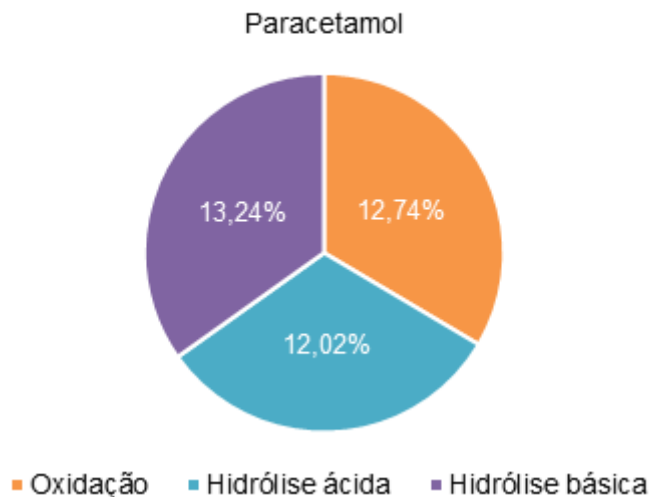


Gráfico 2 - Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do ativo paracetamol sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A1.

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 em H₂O₂ 3%; Hidrólise ácida D10 em HCl 1M; Hidrólise básica D10 em NaOH 0,1M.

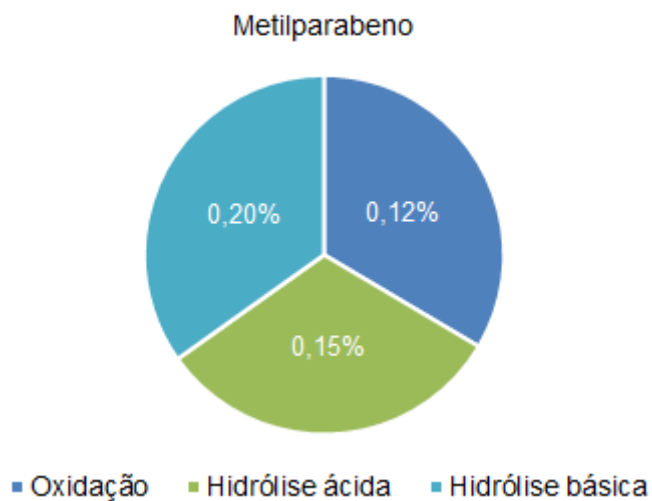


Gráfico 3 - Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante metilparabeno, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A1.

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 com H₂O₂ 3%; Hidrólise ácida D10 com HCl 1M; Hidrólise básica D10 com NaOH 0,1M

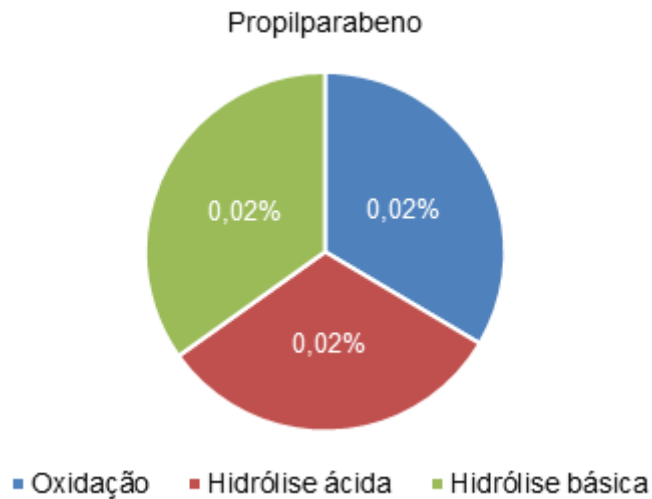


Gráfico 4 - Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante propilparabeno, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A1.

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 com H₂O₂ 3%; Hidrólise ácida D10 com HCl 1M; Hidrólise básica D10 com NaOH 0,1M

Da mesma forma, a amostra A2 foi avaliada sob as mesmas condições de estresse estipuladas neste estudo, em comparação com a amostra controle, com o tempo máximo de dez dias, produzindo os seguintes resultados apresentados no gráfico 5.

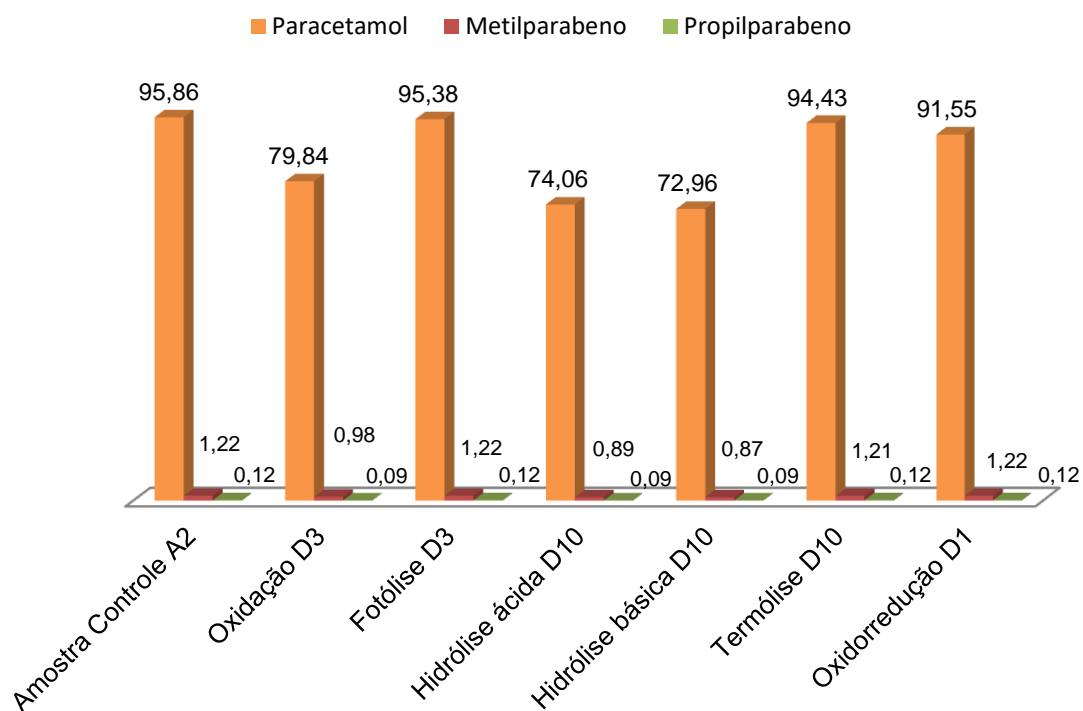


Gráfico 5 - Resultados obtidos em porcentagem da Amostra 2 da degradação forçada do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno comparados com a amostra controle, sob condições de estresse estipuladas no tempo máximo de exposição.

Legenda: D - Dias de coletas

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 em H_2O_2 3%; Fotólise D3 em luz solar; Hidrólise ácida D10 em HCl 1M; Hidrólise básica D10 em NaOH 0,1M; Termólise D10 em estufa a 60°C e Íons metálicos D1 em FeCl_3 0,05M.

Os gráficos 6, 7 e 8 representam as condições de estresse com maior variabilidade na estabilidade do ativo Paracetamol e dos conservantes Metilparabeno e Propilparabeno no estudo de degradação forçada, com os degradantes para oxidação e hidrólise ácida e básica.

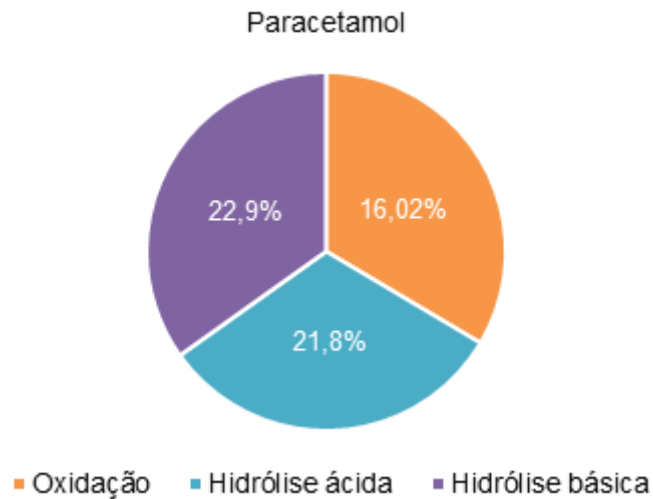


Gráfico 6 - Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do ativo paracetamol, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A2.

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 com H₂O₂ 3%; Hidrólise ácida D10 com HCl 1M; Hidrólise básica D10 com NaOH 0,1M.

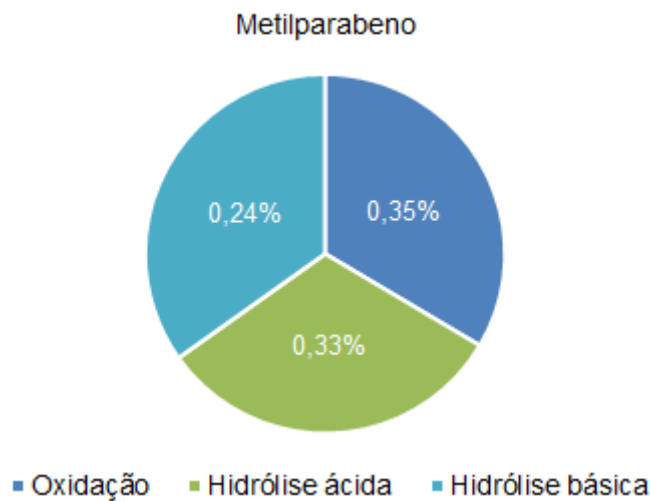


Gráfico 7 - Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante metilparabeno, sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A2.

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 com H₂O₂ 3%; Hidrólise ácida D10 com HCl 1M; Hidrólise básica D10 com NaOH 0,1M.

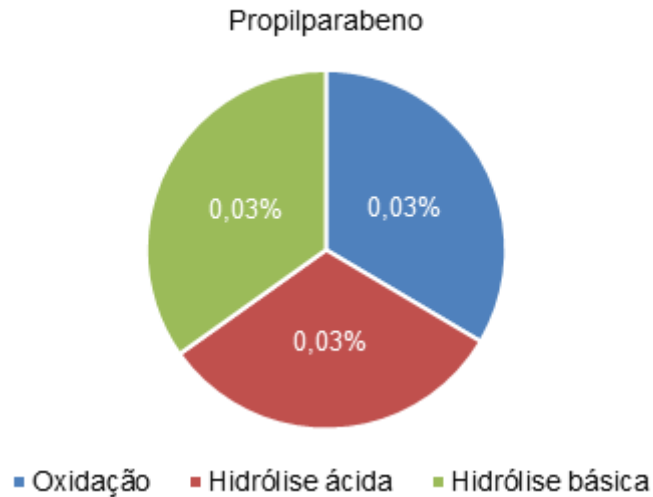


Gráfico 8 - Resultados obtidos da degradação forçada com variação da estabilidade acima de 10% em comparação com a amostra controle do conservante propilparabeno sob condições de estresse oxidativo e hidrolítico no tempo máximo de exposição de 10 dias na amostra A2.

Fator e condições de estresse: Oxidação D3 com H₂O₂ 3%; Hidrólise ácida D10 com HCl 1M; Hidrólise básica D10 com NaOH 0,1M.

Para as demais condições de estresse nas amostras A1 e A2, a fotolítica, a termolítica e a oxidorredução, todas apresentaram pequenas variações não significativas do ponto de vista de degradação, apresentando um *range* menor que 10%.

Os picos cromatográficos de PCM, MP e PP apresentaram pureza espectral satisfatória no medicamento paracetamol, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado nas Figuras 9 e 10. Assim, a eficácia conhecida do Detector por Arranjo de Diodos (DAD) na confirmação da identidade dos picos foi útil para a identificação inequívoca dos compostos analisados.

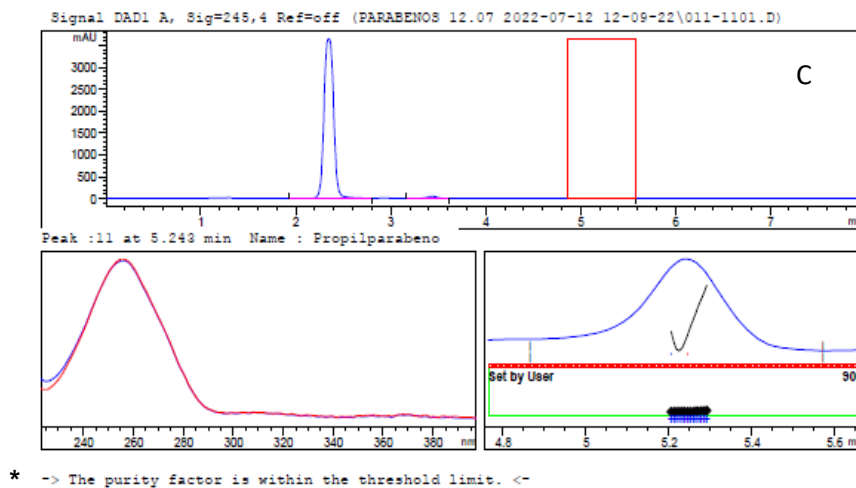
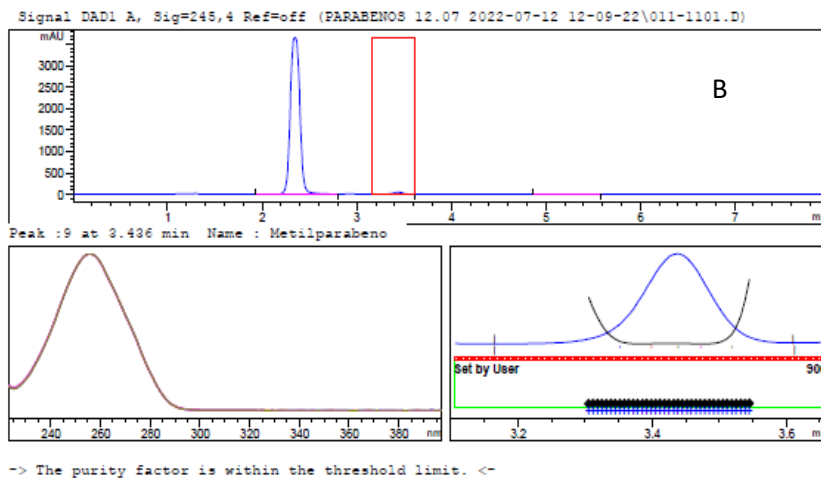
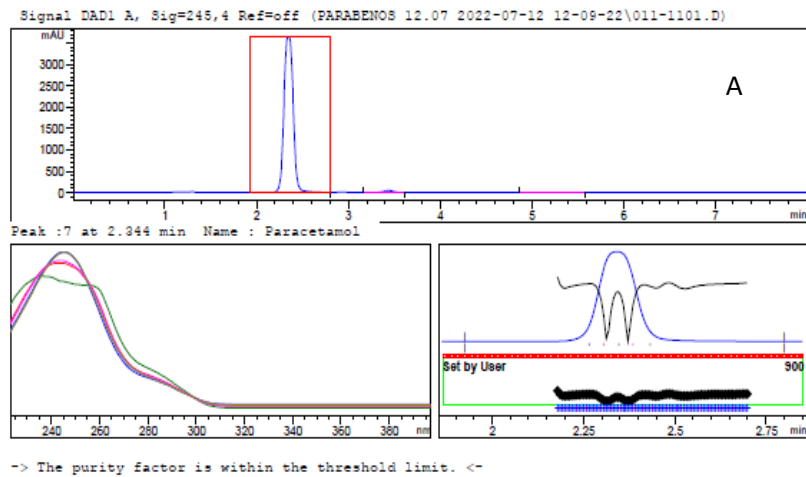


Figura 9. Cromatogramas representativos da pureza espectral do produto acabado, amostra A1. A: Cromatograma do Paracetamol; B: Cromatograma do Metilparabeno; C: Cromatograma do Propilparabeno.

Legenda: * *The purity factor is within the threshold limit* (O fator de pureza está dentro do limite).

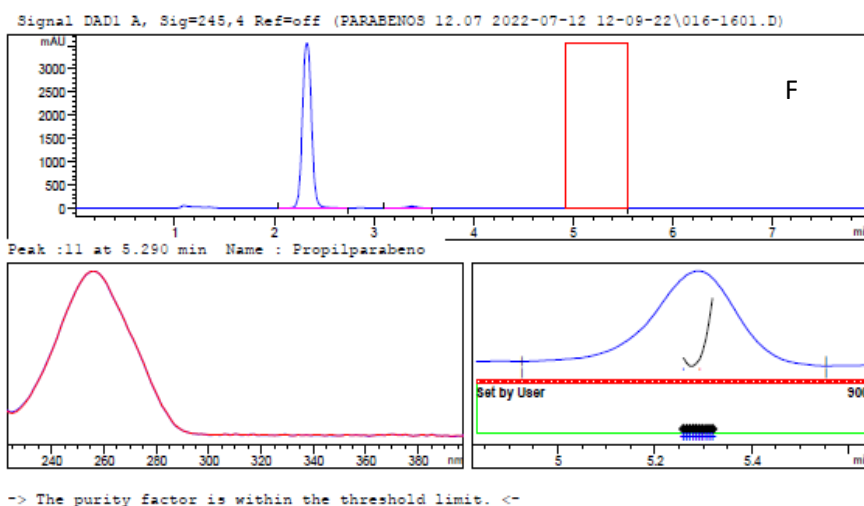
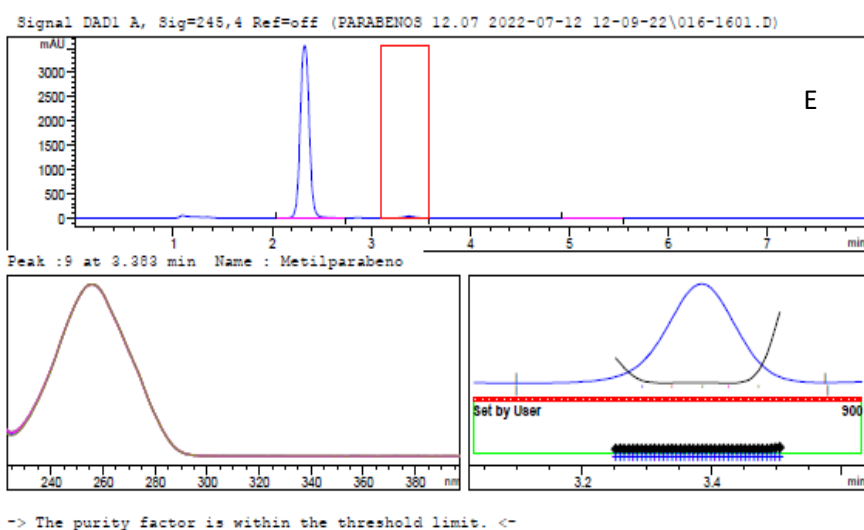
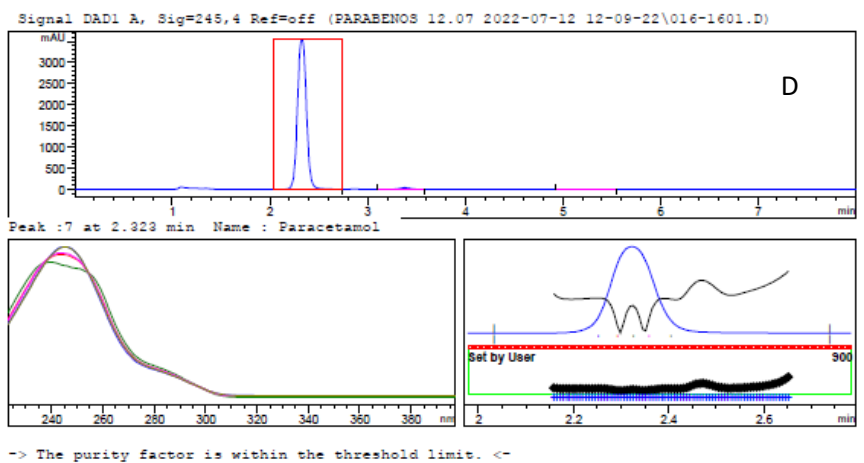


Figura 10. Cromatogramas representativos da pureza espectral do produto acabado, amostra A2. D: Cromatograma do Paracetamol; E: Cromatograma do Metilparabeno; F: Cromatograma do Propilparabeno.

Legenda: * *The purity factor is within the threshold limit* (O fator de pureza está dentro do limite).

4.1.9 Ensaio de Doseamento do medicamento paracetamol e dos respectivos conservantes metilparabeno e propilparabeno nas amostras comerciais

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (FB 6ª ed.), a especificação do teor de paracetamol na forma farmacêutica solução compreende a faixa de 90,0% a 110,0% da quantidade declarada no rótulo e o limite máximo de metilparabeno e propilparabeno em medicamentos nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais recomendado no *Handbook excipientes* 6ª edição é de 0,02% a 0,04% e 0,01% a 0,02% respectivamente (Farmacopeia Brasileira, 2019; Rowe, Sheskey e Quinn, 2009).

As amostras comerciais de paracetamol soluções e suspensões orais nomeadas em G1, G2, G3, G4 e G5, correspondem à classificação farmacêutica para medicamentos genéricos designado pela Denominação Comum Brasileira (DCB) de acordo com a política de medicamentos implantadas no Brasil. As amostras S1, S2 e S3 correspondem à nomeação dos medicamentos similares.

Os resultados da concentração do teor do ativo PCM e seus respectivos conservantes MP e PP nas amostras genéricas G1, G2, G3, G4 e G5 e nas amostras similares S1, S2 e S3 estão resumidos na tabela 13.

Tabela 13 – Teor de Paracetamol, Metilparabeno e Propilparabeno nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais nas amostras comerciais

Amostras	Forma Farmacêutica	Teor de Paracetamol (%)	Teor de Metilparabeno (%)	Teor de Propilparabeno (%)
G1	suspensão	362,68mg.mL ⁻¹ (90,67)	-	0,0098mg.mL ⁻¹ (0,49)
G2	solução	372,76mg.mL ⁻¹ (93,19)	0,065mg.mL ⁻¹ (1,09)	0,002mg.mL ⁻¹ (0,10)
G3	suspensão	372,48mg.mL ⁻¹ (93,12)	-	0,0094mg.mL ⁻¹ (0,47)
G4	suspensão	376,48mg.mL ⁻¹ (94,12)	-	0,0092mg.mL ⁻¹ (0,46)
G5	solução	379,84mg.mL ⁻¹ (94,96)	0,054mg.mL ⁻¹ (0,90)	0,002mg.mL ⁻¹ (0,10)
S1	suspensão	378,88mg.mL ⁻¹ (94,72)	0,073mg.mL ⁻¹ (1,22)	0,0024mg.mL ⁻¹ (0,12)
S2	suspensão	382,92mg.mL ⁻¹ (95,73)	-	0,0038mg.mL ⁻¹ (0,19)
S3	solução	366,16mg.mL ⁻¹ (91,54)	0,038mg.mL ⁻¹ (0,63)	0,0038mg.mL ⁻¹ (0,19)

Condições do estudo: Foram selecionadas amostras comerciais com a presença de metilparabeno e propilparabeno declarados nas bulas. As amostras com traço representam ausência do metilparabeno na formulação, conforme informado nas bulas, individualmente.

Especificação do teor de paracetamol: 90,0% a 110,0% (FB 6ª ed.)

Especificação do teor de Metilparabeno: 0,02% a 0,04% (*Handbook excipients* 6ª ed.)

Especificação do teor de Propilparabeno: 0,01% a 0,02% (*Handbook excipients* 6ª ed.)

Legenda: G- Medicamentos genéricos

S- Medicamentos Similares

5. Discussão

5.1 Paracetamol e Parabenos – objetos de estudo

O paracetamol é um medicamento amplamente usado pela população mundial, estando em uma classificação dentre os medicamentos mais consumidos. Comercializado sob várias marcas e formas farmacêuticas, a solução e suspensão de uso oral foram os objetos de estudo para esse trabalho.

Por se tratar de um medicamento isento de prescrição médica, seu uso se torna indiscriminado pelas pessoas adeptas ao tratamento paliativo para dores com baixa ou média intensidade. Além disso, esse medicamento não tem restrição de uso para gestantes, puérperas e crianças, desde que obedeça a concentração permitida para esses grupos.

A literatura relata que o paracetamol pode acarretar agravos à saúde do indivíduo por apresentar toxicidade comprovada no organismo humano, quando usado em doses acima do permitido.

Para garantir a conservação das formulações líquidas, o emprego de agentes conservantes é imprescindível para a segurança desses produtos.

Os parabenos são excipientes conservantes usados por longos anos e presentes em todas as categorias de produtos, como no setor de cosméticos, alimentício e farmacêutico, sendo que esses conservantes abrangem um perfil de consumidor sem restrição de idade.

O uso de alguns parabenos foi proibido em produtos cosméticos, assim como o emprego do aditivo propilparabeno foi proibido em alimentos, de acordo com a RDC Nº 8 de 2008.

Os compêndios oficiais fornecem metodologia analítica para identificar e quantificar o ativo paracetamol, especificando sua faixa de aceitação na concentração permitida na formulação, atestando sua satisfatoriedade em termos analíticos (Farmacopeia Brasileira, 2019). Para os parabenos, especificamente o metilparabeno e o propilparabeno os mais frequentemente usados, não foi encontrada metodologia analítica oficial que identificasse ou quantificasse esses conservantes em formulações de paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais.

De acordo com os estudos levantados, órgãos nacionais e internacionais estabeleceram concentrações de parabenos permitidos em alguns produtos de

uso e consumo da população, no entanto, para formulações farmacêuticas não houve critérios de recomendação por parte desses órgãos.

Neste estudo, foi utilizado a base de dados do *Handbook excipientes* 6ª edição, considerando os limites de concentração de 0,02% a 0,04% para metilparabeno e 0,01% a 0,02% para propilparabeno para fins de comparação de resultados.

5.1.2 Avaliação da performance do método analítico comparado a literatura

5.1.2.1 Otimização do método analítico

Existem diversos métodos analíticos disponíveis na literatura para a determinação e quantificação de MP, PP, simultaneamente com outros ativos ou isoladamente, seja por CLAE ou outras técnicas analíticas (Carnevale, 1983, Ghulam, 2004; Shabir, 2004; Kokoletsi, Kafkala e Tsiaganis, 2005; Bosch et. al., 2006; Kulikov e Verushkin, 2008; Ghulam e Shafique, 2011; Hasan et. al., 2016; Elrefay et. al., 2011).

As propriedades físico-químicas do composto em estudo, como valor de pKa, logP, solubilidade, polaridade, volatilidade e absorção máxima (λ) do ativo devem ser conhecidas (Blessy et al., 2014).

Para a otimização do método, a escolha da coluna Zorbax Eclipse XDB-CN foi concludente devido possuir maior seletividade para o desenvolvimento do método, ou seja, a fase estacionária possui substâncias químicas ligadas aos grupos funcionais ciano e estão diretamente ligados à superfície da sílica por meio de um espaçador propila (Ikegami et al., 2008). O empacotamento são grupos de nitrilo quimicamente ligados a partículas de sílica porosa, de 5 μ m de diâmetro. A natureza da sua fase estacionária promove seu uso em fase reversa ou fase normal, de acordo com as propriedades químicas do componente a ser analisado.

Por meio de uma revisão dos artigos publicados para quantificação de PCM, MP e PP, observou-se que os trabalhos, em sua maioria, são por CLAE no modo reverso de eluição e colunas cromatográficas de fase estacionária com grupo octadecilsilano (C18) (Ghulam e Shafique, 2011; Hasan et. al., 2016, Zor e Donmez, 2018).

As substâncias analisadas (PCM, MP e PP) são compostos aromáticos com caráter polar devido a grande quantidade de grupos funcionais polares,

apesar de haver um anel aromático que é totalmente apolar. Barber e Joseph, 2004, descrevem que a coluna Zorbax Eclipse XDB-CN (fase estacionária ciano) reduz o tempo de retenção dos analitos apolares, mantendo uma boa retenção dos analitos mais polares, favorecendo a separação das amostras que contém componentes polares e não polares.

Nos ensaios iniciais, foram testadas colunas com diferentes fases estacionárias para garantir a eficiência cromatográfica nas separações dos compostos. Optou-se por colunas com interações aromáticas hidrofílicas e hidrofóbicas, devido à lipofilicidade individual do PCM, MP e PP.

Diante do exposto, a coluna selecionada foi a Zorbax Eclipse XDB-CN para a validação do método, por apresentar separação rápida e completa dos compostos estudados em menos de 8 minutos com vazão de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A seleção do comprimento de onda foi definida após a realização de uma leitura em varredura UV de 190 a 400nm. Observou-se que a leitura em 245nm apresentou maior absorção para o PCM, MP e PP.

Com relação à temperatura, inicialmente optou-se por trabalhar com temperaturas na faixa de 20°C a 40°C. Conclui-se que a temperatura em 20°C apresentou melhores resultados em termos de resolução entre os picos cromatográficos do PCM, MP e PP com resolução maior que 1,5.

A literatura relata que quando ocorrem mudanças na temperatura de um procedimento analítico, o fator de retenção para solutos com maior entalpia é mais afetado do que para solutos com menor valor de entalpia, fornecendo diferentes seletividades em diferentes temperaturas. O uso de temperaturas elevadas pode influenciar na estabilidade térmica tanto da fase estacionária quanto dos compostos a serem analisados. A maior parte das fases estacionárias utilizadas em CLAE tem como base a sílica, como por exemplo: colunas C-18, C-8, Amino, Ciano entre outras, são estáveis próximo de 60°C. Outro fator a ser considerado é o uso de água na fase móvel, associado a temperaturas elevadas, favorecendo a ocorrência de hidrólise e, conseqüentemente, a perda da estrutura ligante da coluna. A resolução dos picos cromatográficos depende de dois parâmetros operatórios: a seletividade e a eficiência da coluna, esse último está diretamente relacionado com o efeito da temperatura na retenção cromatográfica (Lanças, 2012).

Os modificadores da fase orgânica foram separados de acordo com as propriedades dos solventes: acidez, basicidade e polaridade. Mediante essa

seleção, foram analisadas as interações dos compostos com a fase estacionária em conjunto com os solventes orgânicos: Acetonitrila (ACN), Metanol (MeOH) e Tetraidrofurano (THF) e posteriormente foi empregada a melhor otimização para o sistema de separação (metanol e água). A água auxilia no ajuste da força cromatográfica da mistura dos compostos. Os estudos foram intensificados com a avaliação de diferentes faixas de pH, força iônica do eluente, vazão, eluição gradiente e isocrática. As propriedades físico-químicas das moléculas dos compostos do estudo conferem substâncias polares, apresentando os seguintes valores de Coeficiente de partição: PCM 0,91, MP 1,67 e PP 2,55 previamente demonstrado na Tabela 1. Em razão dessa avaliação, os compostos apresentaram boa retenção no modo de eluição isocrática por interação hidrofílica, sendo, portanto, o modo escolhido para seguimento do estudo.

Os compostos orgânicos que contém grupos ácidos ou básicos, a variação do pH na fase móvel contribui para o deslocamento da reação de equilíbrio químico de ionização e, conseqüentemente, para o fator de retenção do analito. (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

A seleção da proporção da fase móvel, força iônica e fluxo foram avaliados pelas condições de eluição testadas nos ensaios iniciais. Primeiramente a fase móvel foi composta por tampão fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), (0,05M - pH 7,0), com metanol (MeOH) na proporção (54:46 v/v) respectivamente. A coluna usada foi a Zorbax Eclipse XDB-C18, na temperatura de 30°C, com fluxo de $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, em leitura de 252nm. A solução tampão apresentou uma coeluição com o pico cromatográfico do analito PCM e maior tempo de retenção para o analito PP (eluição tardia). Outra fase móvel foi constituída de tampão fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), (0,05M – pH 7,5), com adição do aditivo trietilamina (0,5%) e MeOH. Utilizado a coluna Zorbax Eclipse Plus-C18, com proporção de fase móvel (56:44:5 v/v/v) respectivamente, mesma temperatura e com fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e comprimento de onda em 252nm. A resolução do pico cromatográfico do PCM diminuiu, porém apresentou uma coeluição e não houve melhora significativa no tempo de retenção do composto PP. Seguiram-se os testes com o preparo de uma nova fase móvel constituída de água acidificada ajustada com ácido fosfórico a 0,1% (pH 5,5) e MeOH na proporção (55:45 v/v) respectivamente. Utilizada a mesma coluna anterior a esse ensaio, em fluxo de

1,8mL.min⁻¹ com temperatura a 40°C no comprimento de onda em 246nm. O tempo de retenção do composto PP aumentou para cerca de 15 minutos. Diante desses resultados, observou-se coeluição com o pico cromatográfico do PCM, não havendo uma separação eficiente e maior interação do analito PP com a fase estacionária da coluna. Por fim, as condições que se mostraram mais adequadas para a seletividade foram a preparação de água acidificada ajustada com ácido fosfórico a 0,1% (pH 5,0) e MeOH na proporção (65:35 v/v) com o uso da coluna Zorbax XDB-CN em fluxo de 1,0mL.min⁻¹. A temperatura mostrou-se ideal em 20°C, com comprimento de onda na faixa de 245nm. O tempo de retenção foi alcançado em um tempo inferior a 8 minutos. Esses resultados podem ser observados na Figura 5.

O resultado final obtido é decorrente da seletividade da coluna por apresentar uma interação intermolecular dipolar, interagindo com porções polares dos analitos. O grupo ciano possui um dipolo forte, sua natureza eletrostática permite a fase estacionária interagir com porções polares encontradas na maioria dos analitos (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

5.1.3 Análise dos resultados da Curva Analítica

A curva analítica é um parâmetro de modelo linear que avalia a relação entre duas variáveis. Essa linearidade pode ser avaliada pela curva analítica padrão ou pela curva analítica padrão em uma matriz, a depender do efeito matricial do método analítico (Marsona et al., 2020).

Para determinar a linearidade como parâmetro de desempenho analítico, os níveis de concentração devem ser preparados a partir de um padrão de referência (SQR), ponderados individualmente de um ensaio, ou preparar uma curva a partir da solução estoque preparada. As quantidades dos níveis de concentração para determinar a linearidade não dispõem de registros nas diretrizes dos órgãos reguladores, esses níveis podem ser preparados na escala de cinco ou seis concentrações, podendo ser mais abrangentes, de modo que permita uma maior representatividade na curva analítica com intervalos maiores (Marsona et. al., 2020).

A aceitabilidade dos dados de linearidade é frequentemente analisada por meio do coeficiente de correlação e a interceptação “y” da linha de regressão linear, sendo a função da resposta da área do cromatograma versus

concentração do analito. O coeficiente de correlação $>0,990$ geralmente é considerado como evidência de ajuste aceitável dos dados para a linha de regressão. Os critérios de aceitação da interceptação “y” e do DPR dependem da faixa de linearidade que está sendo testada (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

O limite de identificação foi definido no ponto 100% da curva analítica. Considerando 100% de 400mg.mL^{-1} (concentração nominal) correspondente a concentração de trabalho do ativo PCM ($401,99\mu\text{g.mL}^{-1}$), os pontos definidos foram de 25,12%, 50,24%, 75,37%, 100,49%, 125,62%. Para o analito MP a concentração nominal de trabalho em 100% foi de 6mg.mL^{-1} . Considerando essa concentração ($6,25\mu\text{g.mL}^{-1}$) a faixa de trabalho, os pontos definidos foram de 16,5%, 49,56%, 82,62%, 115,68%, 148,73%. Da mesma forma, adotaram-se os mesmos critérios para o analito PP. Considerou-se 100% de 2mg.mL^{-1} (concentração nominal) correspondente à sua concentração de trabalho ($2,06\mu\text{g.mL}^{-1}$), os pontos definidos foram: 50,14%, 75,24%, 100,33%, 125,24%, 150,53%. O valor do coeficiente de correlação de cada analito descrito na Figura 7 atendeu aos critérios estabelecidos pelos órgãos reguladores (Ministério da Saúde, 2017b; Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2020).

5.1.4 Análise dos resultados da Exatidão e Precisão

5.1.4.1 Exatidão

A exatidão é o parâmetro analítico que avalia a concordância entre o resultado encontrado pelo método analítico avaliado, tendo o valor teórico aceito como verdadeiro ou como referência. Pode ser expressa em termos do erro absoluto ou erro relativo. Esse parâmetro pode ser demonstrado por meio de vários procedimentos analíticos. A escolha pode depender do tipo de amostra, análise técnica, ensaios de recuperação, adição de padrão, disponibilidade de materiais de referência ou métodos de referência. A exatidão pode ser inferida da precisão, linearidade e especificidade. Os resultados do método que está sendo validado podem ser comparados aos resultados de um método independente, porém, bem caracterizado (Kazakevich e Lobrutto, 2007; Skoog, West e Crouch, 2008; Marsona et al., 2020).

Como definição, o ensaio de recuperação (ou fator de recuperação), é a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada

na porção analítica do material teste, da qual é extraída e passível de ser quantificada (Marsona et. al., 2020).

Para o método proposto, foi aplicado o ensaio de recuperação em três níveis de concentrações diferentes. Uma quantidade conhecida de SQR dos analitos PCM, MP e PP foi adicionada ao placebo e submetida à análise por CLAE. Os resultados demonstraram a acurácia do método. As recuperações percentuais dos analitos encontram-se dentro dos limites das diretrizes analíticas, conforme apresentados nas Tabelas 7 e 8. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os resultados obtidos sob as condições analíticas estabelecidas para o método.

5.1.4.2 Precisão

Precisão é a proximidade de concordância entre resultados obtidos dos testes independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições estipuladas. Geralmente é especificado em termos de desvio-padrão, variância e o coeficiente de variação de diversas medições. Esse parâmetro fornece uma indicação de erros aleatórios e pode ser dividida em repetibilidade e precisão intermediária. Os métodos que quantificam compostos em maior quantidade requerem um DPR de 1% a 2% (Kazakevich e Lobrutto, 2007; Marsona et al., 2020). A concordância entre os resultados obtidos pode ser demonstrada pelos testes de hipóteses como o teste F seguido do teste t, podendo ser usados como critério de comparação.

A precisão do método apresentou coerência entre os resultados dos testes individuais da repetibilidade e intermediária conforme descrito nas Tabelas 9 e 10, amparados nos critérios de validação de método analítico do ICH e ANVISA.

5.1.5 Análise dos resultados do Limite de Detecção e Quantificação

Os métodos cromatográficos de separação possuem uma concentração mínima de detecção e quantificação com um nível de confiança estimado.

Estatisticamente, o limite de detecção (LD) é expresso para um pico com resposta relação sinal-ruído com cerca de 3: 1, e o limite de quantificação (LQ) é expresso para um pico com resposta relação sinal-ruído com cerca de 10:1.

Para CLAE, a faixa normal para LD e LQ está entre 0,01% e 0,2% para produtos não relacionados a peptídeos e/ou proteínas, do contrário o intervalo LD e LQ é tipicamente entre 0,1% e 0,5% (Kazakevich e Lobrutto, 2007).

O cálculo do LD e LQ pode ser estimado nos parâmetros da curva analítica, sendo estatisticamente confiável (Marsona et. al., 2020).

Os resultados apresentados no estudo de detecção e quantificação foram estatisticamente satisfatórios. Os valores do ativo paracetamol apresentaram maior grandeza de LD e LQ devido a alta concentração do analito usado para este estudo, com o propósito de proporcionar maior visibilidade aos picos cromatográficos do metilparabeno e propilparabeno, uma vez que esses conservantes apresentam baixa concentração na formulação do medicamento paracetamol.

5.1.6 Análise dos resultados da Seletividade

5.1.6.1 Estudo de degradação forçada do ativo paracetamol e dos conservantes metilparabeno e propilparabeno

A degradação forçada é um processo que envolve a degradação do ativo, excipientes e outras matrizes da formulação do medicamento, em condições mais severas do que as condições aceleradas para estabilidade e, assim, gerar produtos de degradação que podem ser estudados para delinear o perfil da estabilidade da molécula (Hasan et. al., 2016).

O estudo de degradação forçada ou teste de estresse é uma parte essencial da atividade de desenvolvimento de medicamentos que enriquece a compreensão do comportamento de decomposição dos ativos e seus produtos, da estabilidade intrínseca da molécula, das vias de degradação e corrobora para a validação dos procedimentos usados como indicadores de estabilidade (Hasan et. al., 2016; Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018).

Os órgãos regulatórios recomendam por meio de suas diretrizes, a realização de estudo de degradação forçada para a identificação de impurezas resultantes da degradação do ativo farmacêutico ou substâncias relacionadas, entretanto, nenhuma das diretrizes especificou a condição exata, concentração, quantidade ou duração das tensões a serem empregadas (Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018).

Todas as condições de degradação forçada foram implantadas para o presente estudo, a fim de demonstrar especificidade na estabilidade dos compostos em análise, porém o estudo de estresse por umidade não foi realizado por se tratar de uma formulação líquida.

A seguir, serão destacados os estudos que apresentaram menor estabilidade no processo de degradação forçada, para as demais condições de estresse, observou-se que nos processos termolítico, fotolítico e íons metálicos não ocorreram perdas significativas no que se refere à estabilidade dos compostos.

5.1.6.1.1 Degradação forçada por Hidrólise Ácida e Básica

A decomposição de fármacos por hidrólise ocorre na presença de água. Grupos ionizáveis das moléculas dos ativos e seus compostos são responsáveis por participar de sua hidrólise catalisada por ácido ou base. A instabilidade do fármaco devido à hidrólise ocorre principalmente em grupos ésteres. Diversos medicamentos possuem água em sua formulação, fazendo com que a hidrólise seja uma degradação muito comum de ocorrer. Normalmente as indústrias farmacêuticas priorizam o estudo de degradação com a condição de hidrólise ácida e básica em preparações de soluções e suspensões (Baertschi, Alsante e Reed, 2011; Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018).

Neste estudo, após 10 dias de exposição em meio ácido, (HCl 1M), os produtos acabados (A1 e A2) apresentaram degradação de 12,02%, 0,15%, 0,02%; 21,8%, 0,33%, 0,03% para PCM, MP e PP, respectivamente, demonstrando alta vulnerabilidade do ativo e dos compostos nesta formulação em meio ácido. O paracetamol sofre reação de descarboxilação após hidrólise, de igual modo, os parabenos, MP e PP, sendo uma derivação da esterificação do ácido para-hidroxibenzóico apresentam grupos carboxílicos, passíveis de

hidrólise. Em outros estudos, a hidrólise ácida mostrou-se estável para os mesmos componentes, porém, o grupo de Hasan et. al., 2016, relatou que seria necessário maior tempo de exposição para obter resultados concisos ao comportamento molecular diante à condição de estresse aplicada (Hasan et. al., 2016).

Na hidrólise básica, após 10 dias de exposição em meio básico (NaOH 0,1M), foi observado o mesmo comportamento mediante ao estresse por meio ácido, porém com maior degradação nos dados obtidos, sendo para a amostra A1 13,24%, 0,20% e 0,02% e A2 22,9%, 0,35%, 0,03% para o ativo PCM e seus compostos MP e PP respectivamente. Os mesmos pesquisadores do grupo de Hasan et. al., 2016, explicam que esse processo é atribuído à sensibilidade oxidativa provocado pelo grupo funcional amida, presente na molécula do PCM, sendo um retirador de elétrons. Para os parabenos, MP e PP, o mesmo comportamento em meio ácido se aplica ao meio básico, apresentando também maior degradação em meio alcalino.

5.1.6.1.2 Degradação forçada por Oxidação

Muitos medicamentos são decompostos pela reação de oxidação e, portanto, a oxidação é considerada uma via importante para a degradação do fármaco. O oxigênio atmosférico em temperatura ambiente é a principal causa da degradação oxidativa de produtos farmacêuticos durante o armazenamento. Os mecanismos das reações de oxidação envolvem múltiplas vias, e sendo o oxigênio um elemento químico com dupla ligação conferindo-lhe uma carga magnética alta, a maioria das oxidações são reações de radicais livres.

A degradação de fármacos por oxidação ocorre por meio de um mecanismo de transferência de elétrons para formar íons reativos. (Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018). Esses pesquisadores informam que no processo de teste de estresse, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é usado principalmente para oxidar uma substância medicamentosa, podendo ser numa concentração de 3 a 30%.

Neste estudo, a degradação oxidativa ocorreu com o uso de H₂O₂ a 3% em solução a temperatura ambiente. A exposição à solução de peróxido de hidrogênio em pH neutro e temperatura ambiente por sete dias é considerada suficiente para produzir os produtos de degradação necessários durante a

análise de estabilidade (Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018). Outros pesquisadores relatam que a dinâmica da reação está diretamente relacionada com a quantidade de oxigênio dissolvido em solução. Em altas temperaturas a velocidade de reação tende a diminuir em consequência da diminuição de oxigênio dissolvido. Por esse motivo, o estudo foi realizado em três dias, pois decorrente a este período pode ocorrer perda de oxigênio na solução (Baertschi, Alsante e Reed, 2011). O estudo apresentou um estresse oxidativo na porcentagem de 12,74%, 0,12% e 0,02% para amostra A1 no ativo PCM e nos compostos MP e PP, respectivamente, e para a amostra A2 16,02% e 0,24%, 0,03% para PCM, MP e PP, respectivamente. Essa perda é justificada pelo fato que aminas, sulfetos e fenóis sofrem oxidação para gerar N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido, respectivamente, portanto, dispondo o PCM de grupos funcionais amida e fenol em sua estrutura molecular e os parabenos MP e PP sendo compostos fenólicos, os resultados da degradação forçada oxidativa apontam condição experimental condizente com outras pesquisas (Hasan et. al., 2016; Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018).

5.1.6.1.3 Degradação forçada por Fotólise

O estudo de fotólise ou fotodegradação é o ensaio conduzido em câmara de fotoestabilidade para determinar a degradação do placebo, fármaco e produto acabado submetidos em fontes de luz a um mínimo de 1,2 milhões de lux-h e de 200Wh/m². Embora seja um ensaio experimental com as especificações do ICH estabelecidas no guia Q1B, a diretriz não estabelece critérios na condução do ensaio, apenas determina que a fonte de luz seja capaz de produzir saídas combinadas de visível a ultravioleta na faixa de 320 a 400nm, e os níveis de exposição devem ser justificados (*International Conference on Harmonisation*, 1998, Blessy et. al., 2014).

Outra maneira de realizar a fotodegradação é por meio da luz solar. Os produtos de interesse são expostos à luz por quatro dias e a formação de produtos de degradação são monitorados (Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018).

As moléculas do paracetamol, metilparabeno e propilparabeno possuem grupos cromóforos, capazes de absorver na região do infravermelho, ultravioleta ou visível por meio do anel aromático e carboxila. Essas moléculas

são passíveis de serem ativadas fotoquimicamente. Por esse motivo, o ensaio foi conduzido por controle de luz ambiental em temperatura controlada.

No ensaio de fotodegradação, o cromatograma B expresso na Figura 8 demonstra que o ativo paracetamol e os respectivos conservantes MP e PP não foram sensíveis à fotólise. Não houve coeluição, picos extras ou áreas cromatográficas aumentadas. O mesmo resultado foi observado por outros pesquisadores (Hasan et. al., 2016).

5.1.6.1.4 Degradação forçada por Termólise

A degradação térmica, ou calor seco, é o estudo que emprega altas temperaturas para a degradação de ativos a fim de acelerar a taxa da reação química e, conseqüentemente, as substâncias químicas sofrem mais degradação em temperaturas elevadas. Kennon, 1964, orienta que a exposição de um produto a 40°C e 75% de umidade relativa (UR) por três meses é equivalente à temperatura ambiente em 24 meses. Essa mesma recomendação é oriunda do guia do ICH Q1A (R2) para exposição inicial térmica, podendo elevar a temperatura de 10 em 10°C (Kennon, 1964; *International Conference on Harmonisation*, 2003).

Alguns pesquisadores recomendam começar com condições extremas, a 80°C e testar em menor duração analisando a amostra em intervalos de tempo de 2h, 5h, 8h, 24h, e assim sucessivamente (Sengupta, Chatterjee e Tekade, 2018). O grupo de Blessy, et. al., 2014 explica que, a aplicação do aquecimento a seco quanto o úmido é realizado para a degradação de medicamentos sólidos ou produtos farmacêuticos, enquanto o aquecimento exclusivamente a seco é aplicado às formulações líquidas.

O estudo foi conduzido por calor seco, em estufa a 60°C no intervalo decorrente de 10 dias, com exposição simultânea do placebo, produto acabado e padrão combinado de paracetamol, metilparabeno e propilparabeno.

Esta condição não apresentou degradação significativa do ponto de vista da estabilidade do produto, como relatado em estudos anteriores (Hasan et. al., 2016).

5.1.6.1.5 Degradação forçada por Oxidorredução - Íons metálicos

A degradação oxidativa do fármaco envolve um mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos. Além da degradação por decomposição de peróxidos como citado anteriormente, pode ser por oxidação direta do substrato através de um radical ou mecanismo iônico, ou por meio da ativação do oxigênio molecular por complexação. Metais como Fe (II) e Cu (I), devem ser usados para avaliar a sensibilidade do ativo à oxidação catalisada por metais. As reações de complexação afetam as propriedades físico-químicas dos íons metálicos, modificando a sua solubilidade, carga e potencial redox (Baertschi, Alsante e Reed, 2011; Blessy et al., 2014).

Por razões técnicas, a RDC Nº 53 de 2015 estabeleceu requisitos para realizar testes com íons metálicos, sendo a única norma do sistema de harmonização das diretrizes internacionais a incluir essa recomendação.

A seleção de um agente oxidante, sua concentração e condições dependem da estrutura do fármaco. Íons metálicos de cobre e ferro são catalisadores extremamente eficazes, capazes de acelerar a reação oxidativa significativamente. Sendo assim, diversas reações podem ocorrer na presença dessas substâncias, podendo desta forma serem aplicadas no estudo de degradação forçada (Blessy et al., 2014; Tattersall et al., 2016).

Da mesma forma que os resultados citados apresentaram variações não significativas para estabilidade do fármaco, o mesmo se aplica ao estudo de degradação forçada por oxidorredução. Embora tenha ocorrido uma pequena alteração no tempo de retenção, nenhum pico cromatográfico apresentou alteração na área cromatográfica dos compostos analisados.

5.1.7 Análise dos resultados do doseamento do medicamento paracetamol e dos conservantes metilparabeno e propilparabeno nas amostras comerciais

O ensaio de doseamento é uma ferramenta indispensável para identificar e quantificar o teor do ativo e seus insumos presentes na formulação do medicamento. Os métodos empregados e os critérios de aceitação em conjunto com os limites de concentração para cada componente presente na formulação podem ser encontrados em compêndios oficiais ou metodologia analítica do fabricante (Hasan et. al., 2016).

Para a determinação e quantificação do IFA paracetamol, a FB 6^aed. estabelece um limite de, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da quantidade declarada do ativo no produto acabado. Os resultados das amostras do estudo por meio do método validado cumpriram o teste de acordo com sua especificação (Farmacopeia Brasileira, 2019).

Para a determinação e quantificação de parabenos, especificamente metilparabeno e propilparabeno, os compêndios oficiais nacionais e internacionais não estabelecem uma especificação da quantidade declarada na formulação de paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais. Os limites de aceitação estimados podem ser encontrados em compêndios não oficiais, monografias, guias farmacotécnicos ou de formulações farmacêuticas, que fornece dados importantes sobre as propriedades físico-químicas e informações sobre seu uso e aplicações seguras.

Dentre as pesquisas realizadas para o emprego da quantidade permitida de parabenos nas formulações solução e suspensão orais, foram encontrados valores entre 0,02% a 0,04% e 0,01% a 0,02% para metilparabeno e propilparabeno, respectivamente, ou combinações desses parabenos de 0,1% a 0,2% (Ansel, Popovich e Allen, 2000; Rowe, Sheskey e Quinn, 2009).

Outros pesquisadores definem esse valor em 0,18%; 0,05% a 0,25% para metilparabeno e 0,02% e 0,02% a 0,04% para propilparabeno (Prista, Alves e Morgado, 1996; Thompson e Lawrence, 2013).

O uso de um ou mais conservantes nas formulações farmacêuticas se deve ao fato que, a medida que a cadeia alquil desses ésteres aumentam, maior é a ação conservante desses agentes e o uso de dois parabenos, um com cadeia curta e o outro com cadeia longa aumenta o sinergismo desses conservantes, garantindo maior estabilidade dos produtos.

O ensaio de doseamento das amostras comerciais analisadas apresentou resultados que não contemplaram com as especificações da literatura. A presença de propilparabeno nas formulações farmacêuticas analisadas confronta com a norma citada quanto ao veto de propilparabeno, uma vez que, esse conservante foi proibido para uso em alimentos, 100% das amostras comerciais analisadas continham esse conservante na formulação e parte delas são formulações pediátricas.

6. Conclusão

Os parabenos identificados nas amostras comerciais do medicamento Paracetamol foram metilparabeno e propilparabeno, de acordo com o descrito na bula do medicamento.

A determinação da concentração de parabenos no medicamento paracetamol nas formas farmacêuticas solução e suspensão orais foi realizada utilizando o método analítico por CLAE que foi desenvolvido e validado de acordo com as diretrizes da RDC Nº 166 de 2017 estabelecidas pela ANVISA e do ICH para o parâmetro de Especificidade.

Os valores encontrados nos resultados quantitativos nas amostras comerciais demonstram a aplicabilidade do método para controle de formulações do medicamento paracetamol solução e suspensão em laboratórios de controle de qualidade, tanto para fins de liberação do lote quanto para fiscalização.

O ativo paracetamol possui limite de aceitação e limite de concentração nas formulações do estudo, sendo este preconizado pelos órgãos competentes de ordem nacional e internacional. Os parabenos, especificamente o metilparabeno e o propilparabeno não possuem critério de aceitação ou legislação nacional ou internacional que estabeleça limites de aceitação e concentração em formulações farmacêuticas.

Pelo exposto, existe a necessidade de oficialização de ensaios analíticos bem como especificações nas monografias compendiais desses conservantes nas formulações farmacêuticas.

7. Referências

Aalto TR, Firman MC, Rigler NE. pHydroxybenzoic acid esters as preservatives: I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. *J Am Pharm Assoc. (Sc. Ed.)*. 1953; 42(8): 449-57. <https://doi.org/10.1002/jps.3030420802>.

Abbas, S., Greige-Gerges, H., Karam, N., Piet, M.H., Netter, P., Magdalou, J. Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man. *Drug Metab. Pharmacokinet*; 2010. 25(6): 568-577. <https://doi: 10.2133 / dmpk.dmpk-10-rg-013>.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA conquista vaga no Comitê Gestor do ICH. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5696612&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=anvisa-conquista-vaga-no-comite-gestor-do-ich&inheritRedirect=true>. [acesso Fevereiro 2020].

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Bulário Eletrônico. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/sistemas/bulario-eletronico>. [acesso em Agosto 21].

Ansel, C. H; Popovich, N. G.; Allen, L. V. Jr. Desenvolvimento Farmacotécnico: considerações gerais, matérias-primas e boas práticas de fabricação. *Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. Cap.4.

Araujo, A. C. F.; Borin, M. F. Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. *Brasília Med*. 2012; 49(4):267-278.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO 17025: Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, Rio de Janeiro, 2017.

Aun, M. V.; Mafra, C.; Philippi, J.C.; Kalil, J; Agondi, R.C.; Motta, A.A. Aditivos em Alimentos. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol*; 2011.34(5): 177-186. <https://doi: 0103-2259/11/34-05/177>.

Baertschi, S. W.; Alsante, K. M.; Reed, R. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. 2. ed. London: Informa Healthcare, 2011.

Barber, W.E; Joseph, M. Eclipse XDB-CN provides excellent selectivity and resolution for urea pesticides. *Aplication Environmental, Agriculture*, 2004. <https://www.agilente.com/chem>.

Berardi, G.; Tuckfield, L.; DeVecchio, M.T.; Aronoff, S. Differential Diagnosis of Acute Liver Failure in Children: A Systematic Review. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2020;23(6):501-510. doi:10.5223/pghn.2020.23.6.50

Bateman D.N.; James D. Medicine, poison, and mystic potion: a personal perspective on paracetamol, 2010. Louis Roche lecture, Stockholm, 2009, *Clinical Toxicology*, 48:2, 97-103, doi: 10.3109/15563651003610179

Bledzka, D., Gromadzinska, J.; Wasowicz, W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International - Elsevier.* 2014. 67:27-42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>.

Blessy, M.; Patel, R.D.; P.N. Prajapat, P.N.; Agrawal, Y. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - a review *J. Pharmaceut. Anal.*, 4, 2014, pp. 159-165.

Bosch, B.M.; Sánchez, R.A.J.; Rojas, S.F.; Ojeda, B.C. Determination of paracetamol: Historical evolution, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 42, Issue 3, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.007>.

Brunton, L. L.; Parker, K, L.; Blumenthal, D. K.; Buxton, I. L. O. Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica. Porto Alegre: AMGH, 2010.

Carnevale, L. Simultaneous Determination of Acetaminophen, Guaifenesin, Pseudoephedrine, Pholcodine, and Paraben Preservatives in Cough Mixture by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 72, Issue 2, 1983. <https://doi.org/10.1002/jps.2600720227>.

ChemDraw-ChemAxon. Produzido por CambridgeSoft, versão Ultra 12.0

Cherian, P.; Zhu, J.; Bergfeld, W. F.; Belsito, D. V.; Hill, R. A.; Klaassen, C. D.; Liebler, D. C.; Marks, J. G Jr.; Shank, R. C.; Slaga, T. J.; Snyder, P.W.; Heldreth, B. Amended Safety Assessment of Parabens as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology* 39. 5S-97S, 2020. doi: 10.1177/1091581820925001

Elrefay, H.; Omnia, A.I.; Wafaa, S. H.; Abdalla, S. RP-HPLC stability-indicating method for simultaneous determination of sodium valproate, methylparaben and propylparaben in oral solution. *Acta Chromatographica.* 34, 2011. doi: 10.1556/1326.2021.00907.

Ennis, Z.N; Dideriksen, D.; Vaegter H.B.; Handberg G.; Pottegard, A. Acetaminophen for Chronic Pain: A Systematic Review on Efficacy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 118(3):184-9, 2016. doi: 10.1111/bcpt.12527.

European Union - Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Union L 311 de 28.11.2001, p.67–128. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083&from=en>. [acesso em Março 2021].

European Union. Commission Regulation (EU) N° 1004/2014 of 18 September 2014a. Amending Annex V to Regulation (EC) N°1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. Official Journal of the European Union, L282, p. 5-14. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1004/oj>.

European Union. Commission Regulation (EU) N° 358/2014 of 9 April 2014b. Amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. Official Journal of the European Union, L107, p. 5-9. Disponível em: <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/358/oj>.

European Union. Regulation (EC) No 1223/2009 of 30 November 2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. Official Journal of the European Union, L342, p. 59-209. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32009R1223>.

European Union. Scientific Committee on Consumer Safety – SCCS. Clarification on opinion SCCS/1348/10 in the light of the Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age; 2011. p. 1-51.

European Union. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Opinion on parabens, 3 May 2013. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/sccs_13-16/opinions_en. [acesso em Fevereiro 2021].

European Union. Commission Regulation (EU) N° 257/2010 of 25 March 2010. Setting up a programme for the re-evaluation of approved food additives in accordance with Regulation (EC) N° 1333/2008 of the European Parliament and of the Council on food additives. Official Journal of the European Union, L80, p. 19-27. Disponível em: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:080:0019:0027:en:PDF>

Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019.

Fernandes, J.P.S; Savino, G; Amarante, A.C.G; Sousa, M.R; Silva, G.R.; Cianciulli, M.E.; Corrêa, M.F.; Ferrarini, M. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabens: uma aula prática. Quím. Nova. 2013. 36(6): 890-893. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600026>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization- FAO/WHO. Codex Alimentarius/International Food Standards. General Standard for Food Additives. Codex Stan 192-1995. p.490. Disponível em:http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS_192e.pdf. [acesso em Novembro 2021]

Food and Drug Administration. FDA Center for Drug Evaluation and Research, Acetaminophen Overdose and Liver Injury, 2011. Background and Options for Reducing Injury. Available on FDA's Committees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/DrugSafetyandRiskManagementAdvisoryCommittee/ ucm126014.htm.

Food and Drug Administration (FDA). What does FDA regulate? A Guide for Health Professionals. Disponível em: <https://www.fda.gov/about-fda/fda-basics/what-does-fda-regulate>. [acesso em Fevereiro 2021].

Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: Prescription acetaminophen products to be limited to 325 mg per dosage Unit; Boxed Warning Will Highlight Potential for Severe Liver Failure. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-prescription-acetaminophen-products-be-limited-325-mg-dosage-unit>. [acesso em Fevereiro 2021].

Food and Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Food and Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. 2019. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>. [acesso em Março 2021].

Fransway, A. F.; Fransway, P J.; Belsito, D. V.; Warshaw, E M.; Sasseville, D.; Fowler, J. F. Jr.; DeKoven, J.G.; Pratt, M. D.; Maibach, H. I.; Taylor, J. S.; Marks, J.G.; Mathias, C. G. T.; DeLeo, V.A.; Zirwas, J. M.; Zug, K. A.; Atwater, A. R.; Silverberg, J.; Reeder, M. J. Parabens. Dermatitis: 1/2 2019 - Volume 30 - Issue 1 - p 3-31. doi: 10.1097/DER.0000000000000429

Gabb, H.A.; Blake C. An informatics approach to evaluating combined chemical exposures from consumer products: a case study of asthma-associated chemicals and potential endocrine disruptors. Environ Health Perspect. 124:1155–1165, 2016.

Ghulam, A. S. Determination of combined p-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2004. 34. 207-13. 10.1016

Ghulam, A. S.; Shafique A. A. Determination of Paracetamol, Methyl parahydroxybenzoate, Ethyl parahydroxybenzoate, and Propyl parahydroxybenzoate in medicinal suspension and tablets by RPLC/UV-DAD. *Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies*, 2011; 34:9, 719-729. doi: 10.1080/10826076.2011.562593

Hasan, N.; Chaiharn, M.; Toor, U.A.; Mirani, Z.A.; Sajjad, G.; Sher, N.; Aziz, M.; Siddiqui, F. A. Development, Validation and Application of RP-HPLC Method: Simultaneous Determination of Antihistamine and Preservatives with Paracetamol in Liquid Formulations and Human Serum. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 2016. doi: 10.33-43. 10.2174/1874104501610010033.

Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1184, p. 474-503, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.075>

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008*, 2020.

International Conference on Harmonisation. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. ICH Harmonised Tripartite Guideline. November, p. 1–17, 2005.

International Conference on Harmonisation. *ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products*. European Medicines Agency. January, p. 1–9, 1998.

International Conference on Harmonisation. *Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Guidance for Industry. Revision 2*, p. 1–22, 2003.

Katzung, Bertram G.; Trevor, Anthony J. *Farmacologia Básica e Clínica*. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

Kazakevich, Y.; Lobrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons Inc., 2007.

Kennon, L. Use of Models in Determining Chemical Pharmaceutical Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 7, p. 815–818, 1964.

Kokoletsi, M. X.; Kafkala, S.; Tsiaganis, M. A novel gradient HPLC method for simultaneous determination of ranitidine, methylparaben and propylparaben in oral liquid pharmaceutical formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 38, Issue 4, 2005. doi: 10.1016/j.jpba.2005.02.022.

Kulikov, A.U.; Verushkin, A.G. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guaifenesin and preservatives in syrups by micellar LC. *Chroma* 67, 347-355, 2008. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0510-5>

Lanças, F.M. Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). *Scientia Chromatographica*. Instituto Internacional de Cromatografia, 2012; 4(1):13-19. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.002>

Ma, WL, Zhao, X, Lin ZY, Mohammed, MO, Zhang, ZF, Liu, LY, Song, WW, Li, YF. A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure. *Environment International - Elsevier*. 2016. 95:30-35. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.013>.

Marsona, B.M.; Concentino, V.; Junkert, A.M.; Fachi, M.M.; Vilhena, R.O.; Pontarolo, R. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. *Quím. Nova*. Vol. 43(8):1190-1203, 2020. doi: 10.21577/0100-4042.20170589

Ministério da Saúde (BR). Lei Nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 27 jan 1999. Seção 1.

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 29, de 01 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes” e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 04 jun 2012. Seção 1(107):81.

Ministério da Saúde (BR). Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 07 dez 2015. Seção 1 (48).

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN Nº 86, de 12 de março de 2021. Define a Lista de Medicamentos Isentos de Prescrição. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 17 mar 2021. Seção 1(251):51.

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 658, de 30 de março de 2022a. Dispõe sobre as diretrizes gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 31 mar 2022. Seção 1(62):320.

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 34, de 7 de agosto de 2015. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Excipientes Farmacêuticos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 10 ago 2015. Seção 1:41.

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 200, de 26 de dezembro de 2017a. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 dez 2017. Seção 1(248):84.

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 528, de 04 de agosto de 2021. Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL Nº 35/20. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 ago 2021. Seção 1(151):97.

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017b. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 25 jul 2017. Seção 1(141):87.

Ministério da Saúde (BR). Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME 2022b [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 181 p. ISBN 978-65-5993-140-8. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_2022.pdf

Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 8, de 20 de fevereiro de 2008. Proíbe o uso dos aditivos Propilparabeno e Propilparabeno de Sódio em alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 27 de fev de 2008. Seção 1(39):55

Moreira, C. G. Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda. [Tese]. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. 116 f, 2014.

Nascimento, J.; Santana, E., Silva, A. C.J. Descrição de excipientes presentes em medicamentos antimicrobianos de diferentes marcas comerciais. Revista Arquivos Científicos (IMMES). 2019.2(1):04-11.

Nowak, K.; Ratajczak, W.W.; Górska, M.; Jablonska, E. Parabens and their effects on the endocrine system. Mol. Cell. Endocrinol. 2018. 474:238-251.

Okubo, T.; Yokoyama, Y., Kano, K.; Kano, I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha PR. Food Chem. Toxicol. 2001. 39(12): 1225-1232. [https:// doi: 10.1016 / s0278-6915 \(01\) 00073-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00073-4).

Prista, L.V.N.; Alves, A.C.; Morgado, R.M.R. Tecnologia Farmacêutica. 4ª edição, vol. II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1996.

PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [acesso em Março 2022].

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; Henderson, G. Farmacologia. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, A.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

Rondon B.D. Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida para determinação de impurezas no iodixanol. [Tese] Repositório Institucional UFSCAR, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6653>. [acesso em Julho 2021].

Rosen, W.E.; Berke, P.A.; Matzin, T.; AF Peterson, A. F., Preservation of cosmetic lotions with imidizolidinyl urea plus J. Soc. Cosmético. Chem. 28: 83-87, 1977.

Rowe, R.C; Sheskey, P. J.; Quinn, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6ª ed., 2009.

Sengupta, P.; Chatterjee, B.; Tekade, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 543, n. 1–2, p. 328–344, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.007>

Shabir, G.; A. - Determination of combined p-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004. 34(1): 207-213.

Silva, A.V.A; Fonseca, S.G.C.; Arrais, P.S.D.; Francelino, E.V. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008. 44(3):397-405.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

Soni, M.G; Carabin, G.I.; Burdock, G.A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 2005. 43(7): 985-1015. <https://doi: 10.1016/j.fct.2005.01.020>.

Spadoto, M. Avaliação dos efeitos dos parabens sobre organismos aquáticos e comparação de sensibilidade de espécie. [Tese]. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Susann, F.; Kreiling, R.; Sauer, U. Application of grouping and read-across for the evaluation of parabens of different chain lengths with a particular focus on endocrine properties. *Archives of Toxicology*. 95, 2021. doi: 10.1007/s00204-020-02967-0.

Sweetman S.; C. Martindale: *The Complete Drug Reference*. 36th edition, London: Pharmaceutical Press, 2009.

Tattersall, P. et al. Impact from the Recent Issuance of ANVISA Resolution RDC-53/2015 on Pharmaceutical Small Molecule Forced Degradation Study Requirements. *Review American Pharmaceutical*, 2016.

Toda K. Is acetaminophen safe in pregnancy? *Scand J Pain*. 2017;17:445-446. doi:10.1016/j.sjpain.2017.09.007

Thompson, J.E.; Lawrence, W.D. *A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

Thompson, M.; Ellison, S. L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

Tonazio, L., Vilela, M. M. P., Jesus, R. R., Pinto, M. A. O., Amaral, M.P.H. Reações adversas dos adjuvantes farmacêuticos presentes em medicamentos para uso pediátrico. *Revista HU*. 2011.37(1):63-68.

U.S. Congress. United States Code: Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. §§ 301-392 Suppl. 4 - 1934. Periodical. Disponível em: <https://loc.gov/item/uscode1934-005021009/>. [acesso em Fevereiro 2020].

United States of America - Amended safety Assessment of Parabens as Used in Cosmetics. Aug, 2018. Disponível em: <https://www.cirsafety.org/sites/default/files/Parabens.pdf>. [acesso em Fevereiro 2020].

United States Pharmacopeia. *The United States Pharmacopeia and National Formulary*. 42. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.

Vane, J.R.; Botting, R.M. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, v. 23, p.41-48, 1995.

Vilela, R. L. T.; Pinheiro, J.H.P.A.; Souza, L. M. Ocorrência de parabens no ambiente aquático e seus efeitos na biota. XIV Fórum Ambiental, 2018. ISBN: 978-85-68242-76-6

World Health Organization. WHO Technical report series 929, Annex 5. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, n. 39, 2005.

Zor, S. D.; Donmez, O. A. A Facile HPLC-PDA Method for Simultaneous Determination of Paracetamol, Methyl Paraben, Sunset Yellow, and Carmosine in Oral Suspensions. JOTCSA. 2018; 5(2):763–74. <http://dx.doi.org/10.18596/jotcsa.403497>.

8. ANEXO

1. Pharmaceutical development (or preformulation) studies

Table A.1

Typical stress conditions in preformulation stability studies

Stress factor	Conditions	Concentration of API ^a	Time
Heat	60 °C	1: 1 with diluent ^b	1–10 days
Humidity	75% relative humidity or greater	Solid state	1–10 days
Acid	0.1N hydrochloric acid	2: 1 in 0.1N hydrochloric acid	1–10 days
Base	0.1N sodium hydroxide	2: 1 in 0.1N sodium hydroxide	1–10 days
Oxidation	3% hydrogen peroxide	1: 1 in 3% hydrogen peroxide	1–3 hours
Photolysis	Metal halide, mercury, xenon or ultraviolet-B fluorescent lamp	1: 1 with diluent ^b	1–10 days
Metal ions (optional)	0.05 M Fe ₂₊ or Cu ₂₊	1: 1 with solution of metal ions	1–10 days

^a When testing degradability of APIs in combination, the APIs should be in the same ratio as in the FDC-FPP.

^b In each case, the diluent is either an excipient or all excipients in the formulation in the same ratios as in the formulation. Other ratios of diluent may also be appropriate, for example the approximate ratio in which the drug and excipients will be used in a formulation.