

Ensaio de identificação de paracetamol: uma jornada através de diferentes técnicas analíticas

Identification tests for paracetamol (acetaminophen): a journey through different analytical techniques

Juliana Y. D. Wu; Márcia Lombardo; Jaqueline Kalleian Eserian*

Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes. Instituto Adolfo Lutz

***Autor correspondente:** Jaqueline Kalleian Eserian. ORCID 0000-0002-4824-6339

Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes.

Instituto Adolfo Lutz. Avenida Doutor Arnaldo, 355, Prédio BQ, 5º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902

Telefone: +55 (11) 3068-2930 . E-mail: jaqueline.eserian@ial.sp.gov.br

Citar: WU, J. Y. D.; LOMBARDO, M.; ESERIAN, J. K. Ensaio de identificação de paracetamol: uma jornada através de diferentes técnicas analíticas. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 37-44, 2022. DOI: 10.29327/226760.4.3-4

Data de Submissão: 06/04/2022; Data do Aceite: 23/06/2022

RESUMO

Introdução: O controle de qualidade é uma parte essencial das Boas Práticas de Fabricação, estando presente em todas as fases de produção do medicamento a fim de remover ou prevenir qualquer não conformidade em potencial. O ensaio de identificação é um dos primeiros a ser realizados ao analisar-se um medicamento, uma vez que é necessário verificar a presença da substância ativa no produto para prosseguir com sua quantificação. Este estudo teve por objetivo apresentar de forma ilustrativa as diversas técnicas analíticas utilizadas para fins de identificação de paracetamol. Cinco técnicas analíticas diferentes descritas no compêndio oficial nacional vigente foram exploradas: colorimetria, temperatura de fusão, espectrofotometria no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência. As técnicas foram exploradas em amostras (comprimidos comerciais de paracetamol), utilizando-se padrão primário de paracetamol para obtenção dos resultados. Todas as técnicas selecionadas evidenciaram a identificação de paracetamol nas amostras, conforme proposto. A escolha da técnica analítica para a realização de ensaios de identificação deve ser feita levando-se em consideração o objetivo da análise, as condições do laboratório e o número de técnicas diferentes necessárias para conclusão do ensaio. A espectrofotometria no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência são consideradas em geral como técnicas conclusivas/ confirmatórias. Já a colorimetria é considerada apenas como uma técnica eliminatória. Cada técnica tem suas particularidades, vantagens e desvantagens, portanto, cabe ao analista considerar todos esses pontos ao avaliar quais técnicas irá utilizar em seu laboratório. Independentemente da técnica aplicada, o maior propósito de uma análise farmacêutica é garantir a qualidade dos medicamentos disponíveis na sociedade.

Palavras chaves: Controle de qualidade; Paracetamol; Técnicas de pesquisa.

ABSTRACT

Introduction: Quality control is an essential part of Good Manufacturing Practice and it is present in all stages of production of a drug product aiming to remove or prevent any potential non-conformity. The identification test is one of the first tests to be performed when analyzing a drug product as it is necessary to verify the presence of the active substance in the product to proceed quantitative tests. This study aimed at presenting in an illustrative way different analytical techniques used for identifying acetaminophen. Five different analytical techniques described in the current national official compendia were explored: colorimetry, melting point, infrared spectrophotometry, ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. The techniques were explored in samples (commercial paracetamol tablets) and the paracetamol

primary standard was used for obtaining the results. All selected techniques showed acetaminophen identification in the samples, as proposed. The selection of an analytical technique for identification tests must be done considering the objective of the analysis, laboratory conditions and the number of different techniques needed for concluding the test. Infrared spectrophotometry, ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography are generally conclusive/ confirmatory techniques. Alternatively, colorimetry is considered only as eliminatory. Each technique has its own peculiarities, advantages and disadvantages, hence, it is up to the analyst to consider all these points when evaluating which techniques will be chosen in the laboratory. Apart from the applied techniques, the greatest aim of a pharmaceutical analysis is to ensure the quality of the drug products available in society.

Keywords: Quality control; Acetaminophen; Investigate techniques.

INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica exige uma grande regulação de seus produtos, os quais devem apresentar um perfil seguro e efetivo. O controle de qualidade é uma parte essencial das Boas Práticas de Fabricação, estando presente em todas as fases de produção do medicamento, a fim de remover ou prevenir qualquer não conformidade em potencial (AHMED et al., 2020).

O serviço de um laboratório de controle de qualidade de medicamentos envolve atividades especializadas baseadas em legislação específica, que visam à emissão de resultados analíticos confiáveis, com fins de prevenção de riscos à saúde pública. As especificações de qualidade e os métodos de análise dos medicamentos são descritos nos compêndios oficiais, tais como a Farmacopeia Brasileira, em nível nacional, e a Farmacopeia Americana, entre outras, em nível internacional (LOMBARDO; ESERIAN, 2017).

Para a realização das análises dos medicamentos de acordo com os compêndios é necessária a utilização de padrões de referência com alto grau de pureza, na forma de padrões primários ou secundários. Os padrões primários são fornecidos diretamente por comissões especializadas, relacionadas às próprias Farmacopeias, enquanto que os padrões secundários são aqueles preparados no laboratório por meio de análise comparativa com os padrões primários (GIL, 2010).

O ensaio de identificação é um dos primeiros a ser realizados ao analisar-se um medicamento, uma vez que é necessário verificar a presença da substância ativa no produto para prosseguir com sua quantificação (AHMED et al., 2020). Este ensaio, portanto, tem como objetivo comprovar de forma qualitativa a identidade da substância, sendo que o parâmetro mais importante para sua realização é a capacidade de detectar o analito em sua matriz e também na presença de outras substâncias (GIL, 2010). Desta forma, é possível verificar a identidade da substância em análise e sua conformidade ou não com o rótulo do produto.

O paracetamol é um analgésico e antitérmico de grande relevância no cenário dos medicamentos de venda livre. Um aumento expressivo em suas vendas foi relatado pelo Conselho Federal de Farmácia recentemente. Entre os meses de janeiro e março de 2019, 11.150.452 unidades do medicamento foram vendidas, enquanto que no mesmo período do ano de 2020, este número subiu para 19.774.819. Acredita-se que este aumento de 77,35% nas vendas deste medicamento esteja associado à pandemia de Covid-19 (CFF, 2020).

Este estudo teve por objetivo apresentar de forma ilustrativa as diversas técnicas analíticas utilizadas para fins de identificação de paracetamol.

MÉTODO

Cinco técnicas analíticas diferentes descritas no compêndio oficial nacional vigente foram exploradas:

a. Colorimetria; b. Temperatura de fusão; c. Espectrofotometria no infravermelho; d. Espectrofotometria no ultravioleta e e. Cromatografia líquida de alta eficiência.

Para fins de padronização metodológica, todas as análises foram realizadas em comprimidos de paracetamol de 500 mg obtidos comercialmente. Em todas as análises foi utilizado padrão primário de paracetamol fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS (Rio de Janeiro, Brasil).

Obtenção das amostras para os ensaios

Os comprimidos foram pulverizados. O pó obtido foi extraído com acetona P.A. (Pureza mínima: 99,5%, Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) na proporção 0,5 g de paracetamol:20mL de acetona. O líquido foi filtrado em papel filtro qualitativo 80 g/m², porosidade 3 µm (Nalgon, Itupeva, Brasil) e então evaporado em capela de exaustão em temperatura ambiente até obtenção do resíduo na forma de pó ou cristais.

a. Colorimetria

Preparou-se uma solução a partir do resíduo obtido na proporção 1% (p/v) utilizando água destilada como solvente. Realizou-se o mesmo procedimento para o padrão de paracetamol. Em 10mL das soluções amostra e padrão, adicionou-se uma gota de cloreto férrico SR. Deve-se observar coloração azul-violácea como indicativo de que o ensaio foi positivo (ANVISA, 2019).

b. Temperatura de fusão

Mediu-se a temperatura de fusão do resíduo obtido e do padrão de paracetamol. O ensaio foi realizado utilizando-se tubos capilares em equipamento

Ponto de Fusão PF1500 Farma (Gehaka, São Paulo, Brasil), com amostra em duplicata.

A fusão do paracetamol ocorre em aproximadamente 169°C (ANVISA, 2019). O ensaio é considerado positivo se as temperaturas de fusão da amostra e do padrão forem similares e em torno do valor estabelecido (169°C).

c. Espectrofotometria no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho do resíduo obtido e do padrão de paracetamol foram adquiridos por meio da técnica de refletância total atenuada (ATR), a qual possibilita leitura direta sem preparo prévio da amostra. Foi utilizado o equipamento Espectrômetro FT-IR (Infravermelho por Transformada de Fourier) Cary 630 (Agilent, Santa Clara, EUA) com varredura de 4.000 a 650 cm⁻¹, número de scans igual a 32 e resolução de 4 cm⁻¹.

O espectro da amostra deve ser comparável ao espectro do padrão de paracetamol para indicar um ensaio com resultado positivo (ANVISA, 2019).

d. Espectrofotometria no ultravioleta

Preparou-se soluções da amostra e do padrão em hidróxido de sódio 0,01 M em concentração de 6ppm. Utilizou-se o mesmo solvente como branco. As amostras foram analisadas em duplicata. Para isto, utilizou-se o equipamento Espectrofotômetro UV-Vis HP 8453 (HP/ Agilent, Santa Clara, EUA).

O ensaio é positivo se os espectros da amostra e do padrão forem comparáveis, apresentando absorbância máxima em torno de 257 nm (ANVISA, 2019).

e. Cromatografia líquida de alta eficiência

Em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Waters Alliance 2695 (Waters, Milford, EUA) equipado com detector de ultravioleta, utilizou-se coluna C18 (150x4,6 mm, partículas de 5 µm, Waters,

Milford, EUA) e as seguintes condições: fase móvel água:metanol (75:25 %v/v), fluxo de 1mL/min, temperatura de 25°C, volume de injeção de 10 µL e detecção em 243 nm.

Preparou-se as soluções amostra e padrão na concentração de 10 ppm, utilizando fase móvel como solvente. O resultado do ensaio é positivo se os cromatogramas da amostra e do padrão forem comparáveis, apresentando pico no mesmo tempo de retenção (ANVISA, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as técnicas analíticas exploradas evidenciaram a identificação de paracetamol nas amostras, conforme proposto.

A colorimetria é uma técnica relativamente simples realizada a olho nu, a qual compreende o gotejamento da solução reagente na amostra a ser avaliada. Ressalta-se que a intensidade da cor gerada na amostra após reação com a solução reagente depende da concentração da substância ativa na amostra (BATISTA et al., 2019).

A Figura 1 apresenta o resultado do ensaio de identificação por colorimetria realizado na amostra e no padrão de paracetamol.

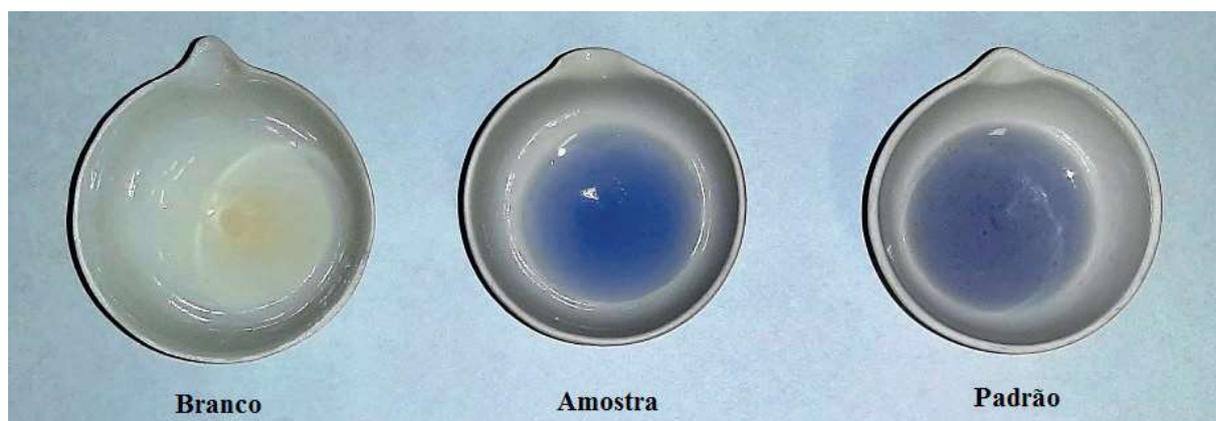


Figura 1. Fotografia do ensaio de identificação de paracetamol por colorimetria realizado na amostra, branco (água destilada) e padrão de paracetamol.

Foi possível observar mudança de cor na amostra e no padrão de paracetamol após a reação com a solução reagente, indicando resultado positivo para o ensaio de identificação de paracetamol na amostra.

A faixa de fusão de uma substância é definida como o intervalo de temperatura em que a substância começa a se fluidificar até o completo desaparecimento da fase sólida, sendo a temperatura de fusão a temperatura em que a substância está completamente fundida. Desta forma, a temperatura de fusão é uma

propriedade intrínseca da substância, e, como tal, é utilizada para confirmar sua identidade ou indicar sua pureza (ANVISA, 2019; OLIVEIRA et al., 2011).

Uma variação de aproximadamente até $\pm 0,5^\circ\text{C}$ na temperatura de fusão em relação ao valor esperado indica tratar-se de substância pura. Quando há impurezas na amostra, a faixa de fusão aumenta (valores maiores que 5°C), ou seja, quanto mais curta for esta faixa (de $0,5$ a $2,0^\circ\text{C}$), mais puro será o material (IOWA COMMUNITY COLLEGE, 2009).

As temperaturas de fusão foram de 169,2°C e 169,8°C para as replicatas da amostra (média de 169,5°C) e de 169,4°C para o padrão de paracetamol, indicando resultado positivo para identificação de paracetamol na amostra analisada. A Figura 2 apresenta um esquema gráfico com o resultado do ensaio de identificação por temperatura de fusão realizado na amostra e no padrão de paracetamol.

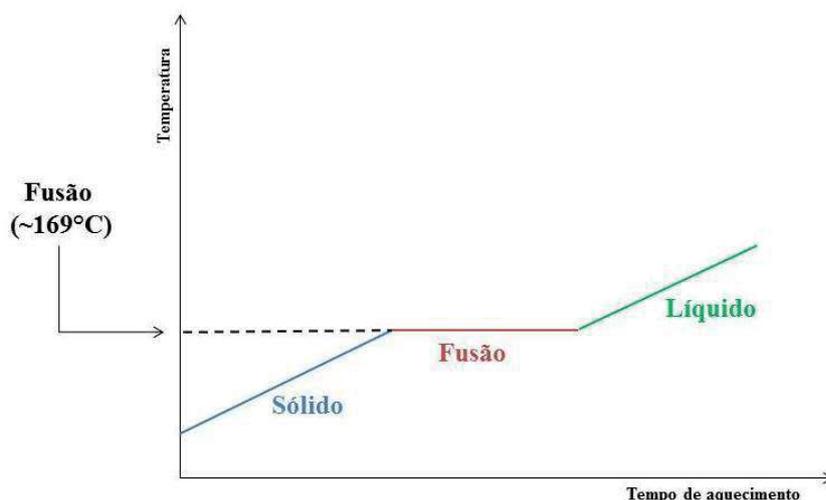


Figura 2. Esquema teórico da realização do ensaio de identificação de paracetamol por temperatura de fusão.

A espectrofotometria no infravermelho é utilizada para evidenciar a presença de grupos funcionais da estrutura das substâncias, de modo a servir para sua identificação ou investigação de sua composição química. Por meio da técnica de ATR, tem-se como principal vantagem o fato de não precisar de preparação da amostra, o que traz grande praticidade à rotina do laboratório, além de ser uma técnica de análise não destrutiva e muito rápida que ocorre em apenas alguns segundos (ZAPATA et al., 2021). Os espectros de absorção no infravermelho da amostra e do padrão de paracetamol são apresentados na Figura 3.

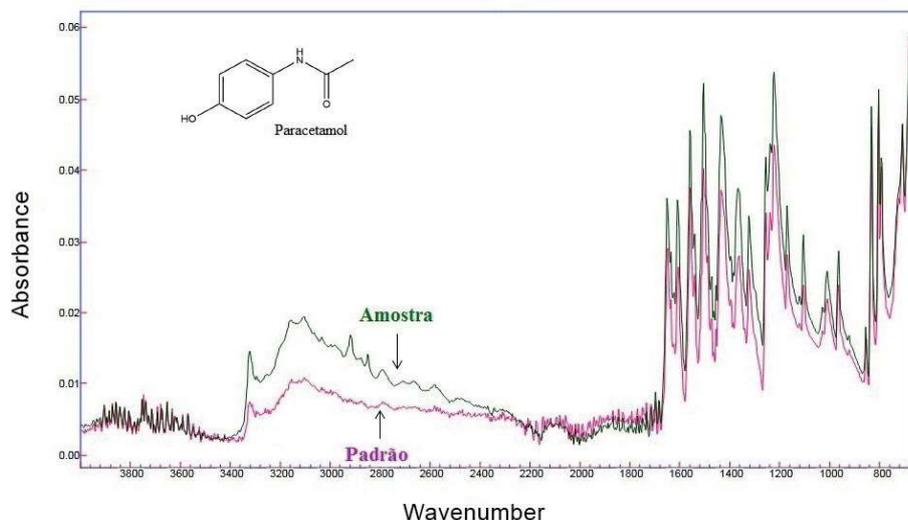


Figura 3. Espectros de absorção no infravermelho sobrepostos da amostra e do padrão de paracetamol resultantes do ensaio de identificação de paracetamol.

Os sinais esperados para o paracetamol ocorrem devido às vibrações moleculares das ligações O-H (3500-3200 cm^{-1}), C-H aromática (3080-3030 cm^{-1}), bandas combinadas - aromáticas (2000-1650 cm^{-1}) e C=O (1660-1650 cm^{-1}) (ZAPATA et al., 2021). É possível observar que os espectros apresentaram aspectos similares com sinais característicos nas regiões esperadas, indicando que o ensaio de identificação de paracetamol foi positivo.

A espectrofotometria no ultravioleta é uma técnica bastante utilizada na realização de ensaios de identificação e doseamento de substâncias devido a seu custo relativamente baixo (quando comparada à cromatografia líquida e espectrofotometria no infravermelho), robustez e grande número de aplicações possíveis. As medidas obtidas dependem da concentração da substância, de sua absorvidade molar, do comprimento de onda selecionado e do tamanho do caminho óptico (ROCHA et al., 2004). Na Figura 4, são apresentados os espectros no UV da amostra e do padrão de paracetamol.

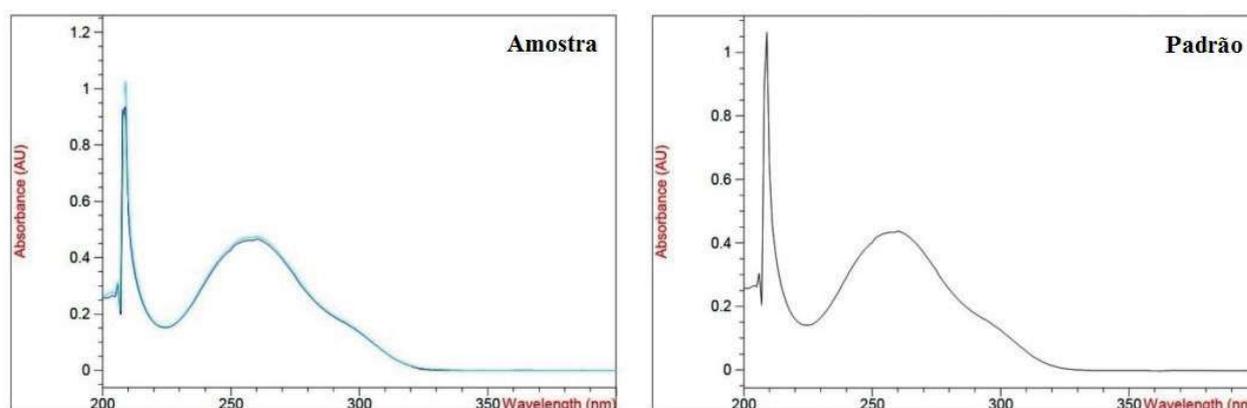


Figura 4. Espectros no ultravioleta da amostra e do padrão de paracetamol resultantes do ensaio de identificação de paracetamol, com absorbância máxima em torno de 257 nm.

Foi possível observar que ambos os espectros da amostra e do padrão de paracetamol apresentaram o mesmo perfil e absorção máxima em torno de 257 nm, evidenciando a identificação positiva de paracetamol na amostra analisada.

A cromatografia é um método de análise físico-químico de separação de componentes de uma mistura, tendo como princípio básico a migração diferencial destes componentes devido às suas interações entre uma fase móvel e uma fase estacionária. A cromatografia líquida de alta eficiência é um método de separação de compostos em solução, geralmente não voláteis e/ou sensíveis à temperatura. É importante que a fase móvel solubilize a amostra e não decomponha a fase estacionária. Além disso, deve

apresentar alto grau de pureza, baixa viscosidade, polaridade adequada e compatibilidade com o detector (MOUDGIL et al., 2019).

Em análises farmacêuticas, a fase estacionária mais comumente utilizada é aquela composta por grupos silanóis (SiOH) derivados da sílica-gel que se ligam a grupos funcionais apolares, tais como C8 e C18. Já a fase móvel é composta por solventes mais polares, denominando-se esta modalidade então como cromatografia de fase reversa (MOUDGIL et al., 2019). O tempo de retenção da substância analisada depende da intensidade de sua interação com a fase estacionária e com as características da fase móvel. Os cromatogramas sobrepostos da amostra e do padrão de paracetamol são apresentados na Figura 5.

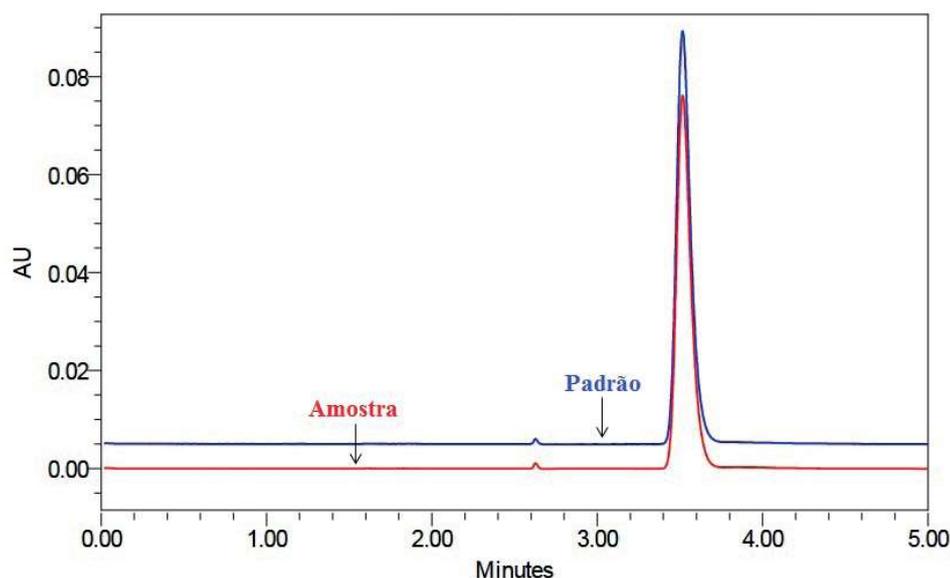


Figura 5. Cromatogramas sobrepostos da amostra e do padrão de paracetamol resultantes do ensaio de identificação de paracetamol. Condições cromatográficas: HPLC Waters Alliance 2695, coluna C18 (150x4,6mm, partículas de 5µm, Waters), fase móvel água:metanol (75:25 %v/v), fluxo de 1mL/min, temperatura de 25°C, volume de injeção de 10 µL, detecção em 243nm, tempo de corrida de 5 minutos e tempo de retenção do paracetamol de 3,5 minutos.

É possível observar que os cromatogramas obtidos para a amostra e para o padrão de paracetamol apresentaram mesmo perfil e tempo de retenção coincidente, indicando a presença de paracetamol na amostra analisada.

As técnicas analíticas descritas neste estudo apresentam diferentes parâmetros de especificidade (capacidade de detecção do analito em presença de outros componentes), limite de detecção (menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada) e robustez (capacidade do método em permanecer inalterado sob pequenas variações em suas condições) (FDA, 2021).

É importante salientar que ensaios de identificação que utilizem técnicas analíticas como espectrofotometria no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência são consideradas em geral

como conclusivas/confirmatórias. Já os ensaios baseados em técnicas que envolvem reações químicas com grupos funcionais da substância em análise, tal como a colorimetria, são considerados apenas eliminatórios, uma vez que outras substâncias podem apresentar grupos funcionais em comum (ANVISA, 2019; GIL, 2010).

A escolha da técnica analítica para a realização de ensaios de identificação deve ser feita levando-se em consideração o objetivo da análise, as condições do laboratório e o número de técnicas diferentes necessárias para conclusão do ensaio. A depender da situação, pode ser interessante a aplicação de ao menos duas técnicas analíticas diferentes para responder ao ensaio de identificação, como nos seguintes casos: demanda de investigações mais complexas e resultado negativo para uma substância esperada para o produto ou resultado positivo para uma substância não esperada para o produto.

CONCLUSÃO

Neste estudo, buscou-se demonstrar que diversas técnicas analíticas podem ser aplicadas para responder uma mesma questão, neste caso, a identificação de paracetamol. Evidentemente, cada técnica tem suas particularidades, vantagens e desvantagens, portanto, cabe ao analista considerar todos esses pontos ao avaliar quais técnicas irá utilizar em seu laboratório visando à realização de ensaios de identificação. Em grande parte dos casos, o aspecto econômico é o ponto mais crítico na escolha da técnica utilizada, muitas vezes limitando a execução de maior número de ensaios. Os compêndios oficiais indicam diversas técnicas para os ensaios relativos ao controle de qualidade de medicamentos, cada qual com suas características próprias, a depender do produto. Independentemente da técnica aplicada, o maior propósito de uma análise farmacêutica é garantir a qualidade dos medicamentos disponíveis na sociedade.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE:

Nada a declarar

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; ISLAM, S.; ULLAH, B.; BISWAS, S.K.; AZAD, A.S.; HOSSAIN, S. A review article on pharmaceutical analysis of pharmaceutical industry according to pharmacopoeias. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 1-10, 2020. DOI: 10.13005/ojc/360101

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª ed., v.2, Brasília: Anvisa, 2019.

BATISTA, F.G.A.; FEITOSA, A.F.B.; SILVA, R.G. Método colorimétrico para identificação de formas nitrogenadas em águas de reservatórios destinados ao consumo humano no estado da Paraíba. **Revista Ambientale**, v. 11, n. 21, p. 48-63, 2019. DOI: 10.34032/ambientale.v11i2.99

CFE. CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Levantamento mostra como o medo da Covid-19 impactou venda de

medicamentos. 2020. Disponível em: <<https://www.cff.org.br/noticia.php?id=5747>>. Acesso em 07 mar 2022.

FDA. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Q2(R1) **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry**. September 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/152208/download>>. Acesso em 04 mar 2022.

GIL E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ª ed., São Paulo: Pharmabooks, 2010.

IOWA COMMUNITY COLLEGE ONLINE CONSORTIUM HOME. Melting Point Determination: Purity and Identity of Crystalline. 2009. Disponível em: <<https://iowaconline.instructure.com/courses/5606/files/1298616/download?wrap=1>>. Acesso em 09 jun 2022.

LOMBARDO, M.; ESERIAN, J.K. A análise da qualidade de medicamentos e o papel do laboratório oficial no contexto da saúde pública. **Revista de Administração em Saúde**, v. 17, n. 67, p. 1-14, 2017. DOI: 10.23973/ras.67.28

MOUDGIL, P.; BEDI, J.S.; AULAKH, R.S.; GILL, J.P.S.; KUMAR, A. Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milks. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 338-346, 2019. DOI: 10.1007/s12161-018-1365-0

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; LIMA GOMES, E.C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011. doi: 10.1590/S0100-40422011000700022

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004. doi: 10.1590/S0100-40422004000500021

ZAPATA, F.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A.; ORTEGA-OJEDA, F.; QUINTANILLA, G.; GARCÍA-RUIZ, C.; MONTALVO, G. Introducing ATR-FTIR spectroscopy through analysis of acetaminophen drugs: practical lessons for interdisciplinary and progressive learning for undergraduate students. **Journal of Chemical Education**, v. 98, n. 8, p. 2675-2686, 2021. doi: 10.1021/acs.jchemed.0c01231