

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Impacto e confiabilidade das análises tardias em um lote de ácido
acetilsalicílico submetido à condição de Holding time**

Rafael Antonio Haruo Morita Baldo

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Orientador:

Prof. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2023

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado para todos aqueles que contribuíram direta e/ou indiretamente com a minha formação profissional e caráter, muito obrigado pelo suporte.

SUMÁRIO

Lista De Abreviaturas	4
Lista De Figuras.....	5
Lista De Tabelas.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	8
1.2. GARANTIA DE QUALIDADE.....	8
1.3. VALIDAÇÃO.....	10
1.4. <i>HOLDING TIME</i>	10
1.5. CONTROLE DE QUALIDADE	13
1.6. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. LISTA DE MATERIAIS	16
3.1.1. VIDRARIAS UTILIZADAS.....	16
3.1.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	16
3.1.3. SOFTWARES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS.....	16
3.2. MÉTODO DE DILUIÇÃO E PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	17
3.3. MÉTODOS DE ESTUDO DE <i>HOLDING TIME</i>	17
3.3.1. MÉTODO CONVENCIONAL.....	17
3.3.2. MÉTODO CONVENCIONAL COM ATRASO.....	18
3.3.3. MÉTODO ALTERNATIVO	18
3.4. AMOSTRAGENS.....	19
3.5. ESPECTROSCOPIA UV-VIS	19
3.6. ESTATÍSTICA	20
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

Lista de Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AS	Ácido Salicílico.
AAS	Ácido Acetilsalicílico.
BPF	Boas Práticas de Fabricação.
CM	Controle de Mudanças.
EMA	<i>European Medicines Agency.</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
GQ	Garantia de Qualidade.
HT	<i> Holding Time.</i>
IF	Instrução de Fabricação.
IN	Instrução Normativa.
LT	<i>Lead Time.</i>
OP	Ordem de Produção.
POP	Procedimento Operacional Padrão.
PCP	Planejamento e Controle de Produção.
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada.
T0, 7, 14 ...	T refere-se a time point e o índice ao período de HT entre uma etapa e marco inicial.
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde).

Lista de Figuras

- Figura 1 Fluxograma de fabricação de um comprimido revestido.
- Figura 2 Estrutura Molecular e Reação de Síntese do AAS.
- Figura 3 Hidrólise do Ácido Acetilsalicílico.
- Figura 4 Espectrogramas das soluções padrão (esquerda) e amostra (direita) obtidos na faixa de comprimento de onda de 252 a 308 nm.
- Figura 5 Gráfico de dispersão dos valores preditos (Y) e AS (direita) obtidos para o modelo PLS referente ao dia 21.
- Figura 6 Gráficos de dispersão de concentração de AAS (Y) ao longo do tempo (X) obtidos para os métodos convencional (esquerda), convencional com atraso (centro) e alternativo (direita).
- Figura 7 Contribuição da variabilidade devido ao tempo (azul) e a variabilidade devido às réplicas (vermelho) para os métodos convencional (esquerda), convencional com atraso (direita) e alternativo (centro).

Lista de Tabelas

- Tabela 1 Soluções padrão (#1 a #9) contendo diferentes concentrações de AAS (54,0 a 126,0 $\mu\text{g/mL}$) e AS (0,0 a 9,7 $\mu\text{g/mL}$).
- Tabela 2 Resultados de concentração de AAS obtidos para as amostras analisadas ao longo do tempo (T0, T7, T14, T21) para os métodos convencional, convencional com atraso e alternativo.
- Tabela 3 Resumo dos dados dos modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) utilizados nos experimentos convencional (T0, T7, T14 e T21), convencional com atraso (T0+7, T7+7, T14+7 e T21+7) e alternativo (T0A, T7A, T14A e T21A).
- Tabela 4 Resumo dos modelos de regressão para cada lote analisado conforme o método alternativo.

RESUMO

Baldo, R. A. H. M.. Impacto e confiabilidade das análises tardias em um lote de ácido acetilsalicílico submetido à condição de Holding time. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: Ácido acetilsalicílico; *Holding Time*; metodologia alternativa; variabilidade analítica.

A fabricação de medicamentos é um processo complexo e multiprofissional que depende da atuação dos vários setores de uma companhia farmacêutica e dos órgãos regulatórios e de vigilância sanitária para o atendimento de padrões de qualidade no sistema de saúde. O Holding Time é um estudo que busca avaliar o impacto do tempo e condições de armazenamento na integridade do produto, a partir de testes de suas propriedades físico-químicas, além de análises microbiológicas. Com o intuito de avaliar o impacto da estocagem assim como das análises laboratoriais tardias de um lote de ácido acetilsalicílico em escala laboratorial, foi elaborado um fluxo experimental de três metodologias, a convencional (amostragens dos time points em dias diferentes e análises de cada um no mesmo dia da coleta), a convencional com atraso (análises realizadas sete dias após as amostragens de cada um dos time points coletados em dias diferentes) e alternativa (análise no mesmo dia de todos os time points amostrados em dias diferentes) que também permitem a avaliação da variabilidade analítica considerando análises em dias diferentes ou no mesmo dia. Foram preparadas soluções padrão submetidas a leitura espectrofotométrica na faixa de 252 a 308 nm, para determinação da concentração do ativo (AAS) e produto de degradação (AS) nas amostras. Comparando os resultados analíticos das três metodologias foi observado que quando analisados em dias diferentes, os time points não permitiam uma determinação de tendência referente às concentrações de AAS e AS. Por outro lado, a metodologia alternativa, na qual os time points foram analisados no mesmo dia, permitiu a identificação do decaimento da concentração de ativo com o tempo de Holding Time proposto. Conclui-se que o método alternativo foi o mais adequado para analisar o AAS e definir seu perfil degradativo durante o período de HT, uma vez que permitiu reduzir a variabilidade analítica.

ABSTRACT

The manufacture of medicines is a complex and multiprofessional process that depends on the performance of the various sectors of a pharmaceutical company and the regulatory and sanitary surveillance bodies to meet quality standards in the health system. The Holding Time is a study that seeks to evaluate the impact of time and storage conditions on the integrity of the product, from tests of its physicochemical properties, as well as microbiological analyses. In order to evaluate the impact of storage as well as late laboratory analysis of a batch of acetylsalicylic acid on a laboratory scale, an experimental flow of three methodologies was elaborated, the conventional (sampling of time points on different days and analysis of each on the same day of collection), the conventional with delay (analyses performed seven days after the sampling of each of the time points collected on different days) and alternative (analysis on the same day of all time points sampled on different days) which also allow the evaluation of the analytic variability considering analyses on different days or on the same day. Standard solutions were prepared submitted to spectrophotometric reading in the range of 252 to 308 nm to determine the concentration of the active ingredient (ASA) and degradation product (AS) in the samples. Comparing the analytical results of the three methodologies it was observed that when analyzed on different days, the time points did not allow a trend determination regarding the concentrations of ASA and AS. On the other hand, the alternative methodology, in which the time points were analyzed on the same day, allowed the identification of the decay of the asset concentration with the proposed Holding Time time. It is concluded that the alternative method was the most appropriate to analyze the ASA and define its degradative profile during the HT period, since it allowed to reduce the analytical variability.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Indústria Farmacêutica

A indústria farmacêutica é um setor produtivo que tem impacto direto na qualidade de vida das pessoas, de modo que, a partir da produção de medicamentos, contribui para a manutenção da saúde e bem-estar global. São os medicamentos o método de tratamento de doenças, patologias e/ou comorbidades, além de em alguns cenários aplicados como medidas preventivas e/ou profiláticas contra comorbidades.

A fabricação de medicamentos é um processo complexo e que está sempre em busca de inovação, visto as diversas possíveis rotas de síntese de fármacos, formas farmacêuticas, vias de aplicação, variabilidade genotípicas e fenotípica entre indivíduos e também evolução sensível de microrganismos causadores de doenças. Esse processo é composto por diversas etapas, desde o planejamento do fármaco até a avaliação final do produto acabado e, posteriormente, sua comercialização no mercado, criteriosamente previstas e normatizadas. (Propec, 2021).

Com o intuito de se garantir o sucesso de um tratamento farmacológico é necessário um rígido controle da produção industrial, seguindo os critérios, legislações (RDCs) e instruções normativas (INs) aprovados e vigentes no momento do registro do medicamento para assegurar sua a qualidade, eficácia e segurança. (Almeida, 2020).

1.2. Garantia de Qualidade

O estabelecimento de normas e padrões de qualidade a serem seguidos pela indústria, pelos órgãos regulamentadores como ANVISA, FDA, EMA etc, com o intuito de assegurar que os medicamentos disponíveis no mercado sejam seguros e eficazes no tratamento dos pacientes alvo é vital para o direcionamento de uma empresa e de seu escopo de atuação. As normas vigentes referentes às Boas Práticas de Fabricação são a Resolução RDC N° 658 e a Instrução Normativa IN N° 138 de 30 de março de 2022 que trazem as definições e conceitos pertinentes ao gerenciamento do sistema da qualidade de uma empresa farmacêutica.

“A concepção do produto seja alcançada por meio do projeto, planejamento, implementação, manutenção e melhoria contínua de um sistema que permita a fabricação consistente de produtos com atributos de qualidade apropriados.” (RDC 658, 2022).

O trecho faz referência ao artigo 8 da resolução, que dispõe dos itens a serem garantidos para um sistema da qualidade adequado, reforçando que dentro desse segmento industrial não apenas deve ter-se com foco o setor de produção e a fabricação exponencial de medicamentos comercializáveis, a planta fabril deve estar certificada e apta aos processos, toda a documentação precisa seguir e atender aos critérios de integridade de dados, os equipamentos necessitam estar qualificados para uso, os colaboradores internos e/ou externos/terceiros devem ser devidamente treinados para a execução de suas atividades e todo o sistema de classificação de áreas, segurança e manutenção técnica mapeado, atendendo a todos os padrões de vigilância sanitária.

Todos esses tópicos estão intimamente ligados ao setor da qualidade, área essa muito ampla e que tem grande impacto na rotina de uma fábrica, podendo ser subdividida em controle de mudanças (gerenciamento das propostas de mudanças de processos e/ou condições já validadas e qualificadas), documentação (cadastro de informações e controle de procedimentos operacionais padrão), desvios de qualidade (controle de não conformidades com os fluxos já estabelecidos e validados), treinamentos (capacitação dos colaboradores), validação (assegurar a autenticidade e segurança das condições propostas), qualificação (realização da certificação das áreas e equipamentos), controle de qualidade (análise laboratorial dos produtos). (IN N° 138, 2022).

Visto a importância do setor, faz-se necessário que haja uma relação profissional de interdependência e multidisciplinaridade, de modo a não ser setorizada a qualidade de um produto, assim, resultado final, ou seja, o sucesso do tratamento farmacêutico será obtido com critérios de qualidade. Estes que serão regularmente avaliados em vistorias técnicas e auditorias regulamentares, seguindo o pensamento de Henry Ford, “quality means doing it right when no one is looking” (“qualidade é fazer o certo quando

ninguém está olhando”), logo, o atendimento das Boas Práticas de Fabricação deve ser um valor constante e não apenas uma prioridade. (Ford, s.d.).

1.3. Validação

Como uma das áreas englobadas dentro do escopo da garantia de qualidade, a validação é um setor crucial numa companhia farmacêutica. Este setor é responsável por assegurar a qualidade de um produto, através da avaliação dos processos envolvidos na síntese e comercialização de um medicamento, provando que desempenham o resultado esperado. (RDC 658, 2022).

Pode ser subdividida em Validação de Método, Processo, Limpeza, Filtração Esterilizante, Media Fill, Transporte e Holding Time (HT), que atuam desafiando os métodos de análise dos medicamentos, processos e equipamentos produtivos, os meios de limpeza dos equipamentos, as condições assépticas das áreas, o transporte dos produtos e sua estocagem.

Com isso, podem ser estabelecidos parâmetros de desempenho para operação dos equipamentos em múltiplos cenários, materiais de limpeza adequados para cada caso, tempo necessário para crescimento microbiano proveniente de resíduos pós fabricação e pré-limpeza, bem como filtros que reduzem a biocarga de uma etapa para a outra, o tempo de acondicionamento inter etapa e métodos que garantam uma análise precisa dos produtos a fim de se garantir suas especificações dentro dos limites aceitáveis, não prejudiciais ao paciente e que tenham o efeito terapêutico desejado.

1.4. Holding Time

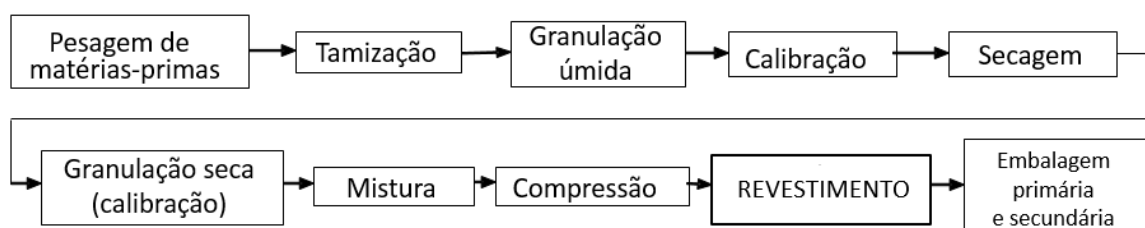
O Holding Time é um segmento ou continuidade da validação de processo que estuda o potencial efeito cumulativo que o tempo de parada entre as etapas produtivas durante a fabricação pode gerar o produto intermediário ou granel. Dessa forma, é um estudo que consiste em manter o produto armazenado pelo tempo máximo estipulado em determinadas etapas do processo, respeitando as condições de armazenamento e ambientais, atendendo as especificações do produto não impactando em sua qualidade, segurança e eficácia.

Essa avaliação a ser realizada com o produto é importante para a atuação de outros setores em caso de algum acidente ou incidente durante a fabricação que demande a interrupção da fabricação; necessidade de transportar e embalar um bulk em outra unidade ou empresa; possíveis adequações do processo e, primordialmente, o estabelecimento de tempos validados que garantam a estabilidade do medicamento e atendam às necessidades do setor de produção.

A elaboração e condução de um estudo de HT deve ser alinhada previamente com os setores da produção e com a equipe de planejamento (PCP) de modo a organizar tempos de parada produtiva a serem respeitados durante a fabricação. É necessário um conhecimento do produto, sua rota de síntese, as etapas produtivas, pontos de parada, quais análises laboratoriais podem ser realizadas em cada ponto do processo e todas essas informações devem estar mapeadas em protocolos de estudo e procedimentos operacionais padrão (POP) revisados e aprovados pelas áreas envolvidas. (WHO, 2015).

Cada um desses tópicos é referente a um setor específico da indústria farmacêutica, todas as informações técnicas podem ser obtidas com a equipe de desenvolvimento farmacotécnico, as análises laboratoriais e metodologias analíticas devem ser tanto de conhecimento do desenvolvimento quanto do controle de qualidade, o processo de fabricação (rota, equipamentos, matéria-prima etc) está contida nas ordens de produção (OPs) e instruções de fabricação (IFs) criadas pela equipe de documentação técnica e utilizadas pelo setor produtivo.

Figura 1. Fluxograma de fabricação de um comprimido revestido.



Fonte: Silva, B. M. S. R. da, Medina, F., Rocha, H. V. A., & de Oliveira, A. R. (2016).
(adaptado).

A figura 1 utilizada apresenta um fluxograma simplificado do ciclo de um produto farmacêutico dentro da indústria, sendo exemplificadamente descrito o processo de

fabricação de uma forma farmacêutica sólida (comprimido revestido). Após o planejamento do fármaco, desenvolvimento do medicamento, lotes piloto e lotes de validação, é então realizada programação para a fabricação do produto na rotina, de acordo com suas OP e IF vigentes. No caso de mudanças futuras, estas devem ser previstas e avaliadas em controle de mudanças - CM. Sobre o comprimido revestido, sua produção começa com a pesagem das matérias primas, as quais são peneiradas juntamente aos excipientes e então é feita uma mistura, que será compactada e submetida a uma granulação por via seca ou via úmida (com o emprego de uma solução aglutinante), permitindo a formação de grânulos que posteriormente passarão pelos processos de secagem e moagem. A seguir, os grânulos serão submetidos a compressão (adiciona-se um lubrificante para reduzir aderência ao equipamento e facilitar escoamento) e, posteriormente, revestidos com uma solução de revestimento (a fim de proteger suas propriedades físico-químicas, reduzindo degradações do ativo e/ou crescimento microbológico). Por fim, os comprimidos revestidos serão embalados e preparados para transporte. (Science Info World, 2012).

A fim de estudar a estabilidade do produto, são delineados pontos de interrupção de um processo rotineiramente contínuo em que o lote deverá ficar estocado nas condições de armazenamento e prazos definidos previamente. Sendo estabelecido pelos guias de Holding Time da Organização Mundial da Saúde, no anexo 4, deve ser realizada a avaliação, seguindo o exemplo da figura 1, do impacto da parada entre a pesagem e manipulação; entre a manipulação e a compressão; entre a compressão e o revestimento; entre o revestimento e a embalagem primária.

Para cada etapa definida no estudo ou time point (T0, 7, 14 ...), é feita a coleta de amostras específicas referentes àquele ponto do processo de fabricação, que são enviadas ao controle de qualidade para análise, com o intuito de obter dados que provem que o medicamento mantém sua descrição, pH, teor, produtos de degradação, uniformidade, umidade, biocarga, endotoxina e esterilidade dentro dos limites aceitáveis para seu desempenho sem causar potenciais efeitos tóxicos ao paciente. Todos os resultados analíticos devem ser compilados em relatório de estudo e avaliados estatisticamente para validação dos tempos de parada produtiva e condições de armazenamento.

1.5. Controle de Qualidade

O setor responsável por avaliar a qualidade dos produtos previamente à sua comercialização no mercado é o controle de qualidade. Seguindo as boas práticas laboratoriais, descritas na Resolução RDC N° 512, de 27 de Maio de 2021, a área é responsável pela realização de análises específicas para cada produto acabado, seguindo métodos analíticos validados para cada teste analítico a fim de se comprovar que as características e propriedades físico-químicas e microbiológicas atendem à faixa de especificação estabelecida, determinando se o medicamento é seguro e eficaz.

O controle de qualidade atua não apenas em produtos de linha, mas também em novos produtos que estão sendo desenvolvidos, isso porque é necessário avaliar o impacto de mudanças em produtos legados (produtos já estabelecidos) e o comportamento de um lançamento quando introduzido na linha de produção. Dessa forma, está sempre em atuação conjunta com os setores de desenvolvimento, produção e validação. (Parekhplast India Limited, 2016).

Por ser um setor que atua juntamente a outros, há um elevado recebimento de amostras para análise. Essas análises devem ser realizadas o quanto antes, visto que o tempo de espera entre a coleta de amostra e o início de sua análise pode impactar em sua qualidade, na geração de produtos de degradação e crescimento microbiológico.

No âmbito de entrega de amostras de estudo de HT, é ainda mais crucial a priorização das análises, visto que o lote produtivo já está sob estresse devido à estocagem planejada por tempo determinado e o período de análise ou atraso não está previsto em um estudo para validação de tempos de Holding Time, podendo assim comprometer os resultados analíticos e sua representatividade para o lote de produção.

Outro fator importante quanto às análises e seus resultados são os pontos de variabilidade, ou seja, as condições de realização das análises. Isso porque, cada medicamento tem uma estabilidade própria a qual está sujeita a risco dependendo não somente do tempo até a realização das análises laboratoriais, mas também da temperatura e umidade ambientais de armazenamento que variam considerando análises realizadas em dias e condições diferentes.

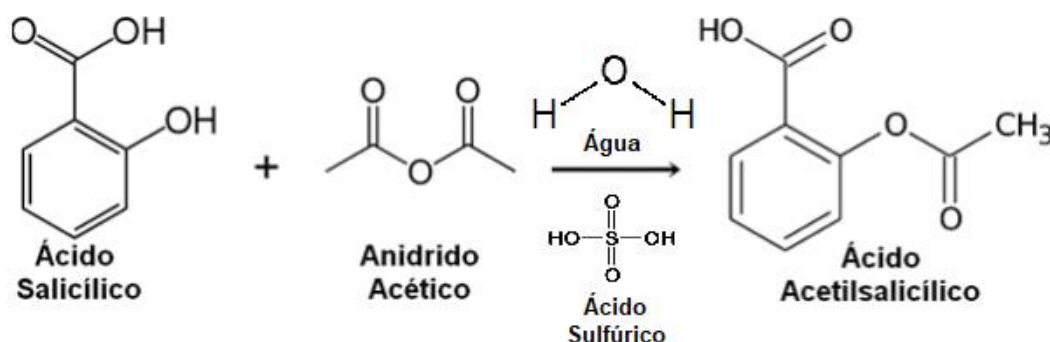
1.6. Ácido Acetilsalicílico

O tempo previsto de HT de um produto em estudo é um fator decisivo para validar um produto. Dessa forma, o tempo entre a coleta/entrega e a análise de uma amostra (conhecido como lead time ou LT) torna-se um ponto de impacto para esse segmento da validação.

Com o intuito de compreender o potencial efeito do aumento do LT em estudos de Holding Time foi pré-selecionado como objeto de análise o medicamento Ácido Acetilsalicílico (AAS).

O AAS é um anti-inflamatório não esteroidal administrado via oral recomendado no tratamento de quadros de dor e febre, sendo um comprimido não revestido analgésico e antipirético (EMS S/A, bula), e, também, na forma farmacêutica de comprimido revestido, como atenuante do agregamento plaquetário, bloqueando a formação de êmbolos e trombos venosos. (AAS® Protect, bula Sanofi).

Figura 2. Estrutura Molecular e Reação de Síntese do AAS.

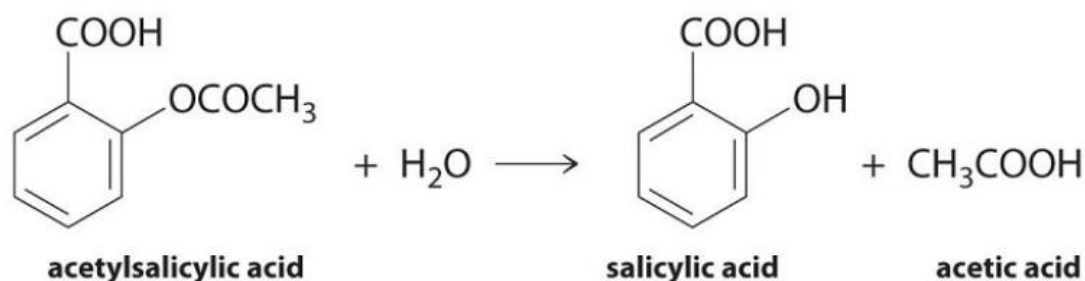


Fonte: Biologia - Manual do Enem (adaptado)

Assim como mostrado na figura 2, o ácido acetilsalicílico é um composto formado pela junção das funções químicas de ácido carboxílico e éster, logo contém o que é denominado agrupamento misto. O AAS é sintetizado a partir de uma reação química entre o ácido salicílico (AS) e o anidrido acético na presença de água e ácido sulfúrico, para catalisar a reação, e produzir uma mistura que passará por etapas de aquecimento, resfriamento, cristalização e filtração até que possa ser finalizada a produção da substância e o excesso de anidrido possa ser eliminado (MIRA, 2022).

O AAS é um composto que se degrada a partir de uma reação de hidrólise, como mostrado na figura 3.

Figura 3. Hidrólise do Ácido Acetilsalicílico.



Fonte: RecNotes

A umidade é um fator a ser considerado na avaliação desse medicamento, visto que sua hidrólise ocorre na presença de água, levando à formação de AS e ácido acético. A cinética de sua degradação segue reação de pseudo-primeira ordem, logo a medida que a concentração dos reagentes aumenta a velocidade da reação tem um aumento proporcional e em quantidades elevadas de um dos reagentes esse aumento é exponencial. Conseqüentemente, há uma degradação rápida do ácido acetilsalicílico como em uma reação de segunda ordem, considerando a concentração de AAS variante e a de água fixa. (ONAH, 2003).

Dessa forma, o ácido acetilsalicílico, quando submetido ao estudo de estresse que é o Holding Time, está sujeito à degradação por vários fatores interconectados: o tempo entre as amostragens realizadas; o tempo entre a coleta das amostras e as análises de fato; o tempo de retardo para início das análises e as condições térmicas e higroscópicas de seu acondicionamento ou estocagem.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar o impacto do retardo nas análises laboratoriais realizadas em um lote laboratorial de ácido acetilsalicílico estocado e acondicionado para estudo de Holding Time.

Serão considerados três métodos de estudo: amostragens pontuais e análises imediatas; amostragens pontuais e análises retardadas; amostragens pontuais e

análises realizadas no mesmo dia. Com isso, pretende-se comparar cada uma das três estratégias com as demais e determinar o potencial de variabilidade entre elas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Lista de Materiais

3.1.1. Vidrarias Utilizadas

A execução dos experimentos ocorreu com a utilização dos seguintes materiais:

- Balões volumétricos 50 e 100mL;
- Becker;
- Micropipetas;
- Pissetas;
- Ponteiras;
- Ácido acetilsalicílico (Lote: 229667 / Validade: 10/2023);
- Ácido salicílico (Lote: 230168 / Validade: 10/2026);
- Metanol (Lote: 231238 Validade: 10/2023).

3.1.2. Equipamentos Utilizados

A execução dos experimentos ocorreu com a utilização dos seguintes equipamentos:

- Balança Analítica (TAG: CF-001);
- Espectrofotômetro UV-Vis (TAG: CF-766).

3.1.3. Softwares Estatísticos Utilizados

A realização dos testes estatísticos ocorreu com o auxílio dos seguintes softwares:

- Microsoft Excel;
- Minitab 18.

3.2. Método de Diluição e Preparação da Curva de Calibração

Foram preparadas 9 soluções padrão contendo diferentes concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS) e de ácido salicílico (AS), conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Soluções padrão (#1 a #9) contendo diferentes concentrações de AAS (54,0 a 126,0 $\mu\text{g/mL}$) e AS (0,0 a 9,7 $\mu\text{g/mL}$).

Solução padrão	Concentração de AAS($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de AS ($\mu\text{g/mL}$)
#1	90,0	0,0
#2	72,0	1,4
#3	108,0	1,4
#4	54,0	4,1
#5	90,0	4,1
#6	126,0	4,1
#7	72,0	6,9
#8	108,0	6,9
#9	90,0	9,7

Fonte: Minitab 18

As soluções padrão foram analisadas por espectroscopia UV-VIS.

3.3. Métodos de Estudo de *Holding Time*

3.3.1. Método Convencional

O método convencional utilizado em estudos de Holding Time é a realização de coletas de amostras, respeitando os *time points* definidos, sucedidas por análises laboratoriais imediatas.

Foram definidos os *time points* para o método convencional de HT da seguinte forma: fracionou-se o AAS sólido em 4 porções:

- Porção 1 (controle): analisada no início do estudo (T0);
- Porção 2: mantida em estufa (50°C) e analisada após 7 dias (T7);
- Porção 3: mantida em estufa (50°C) e analisada após 14 dias (T14);
- Porção 4: mantida em estufa (50°C) e analisada após 21 dias (T21).

As amostras T0, T7, T14 e T21 foram diluídas e analisadas em espectroscopia UV-VIS.

3.3.2. Método Convencional com Atraso

O método convencional com atraso considerou a realização de coletas de amostras, respeitando os *time points* definidos assim como em um Holding Time convencional, porém com a realização de análises laboratoriais ocorreu apenas 7 dias após as coletas.

Foram definidos os *time points* para o método convencional com atraso de HT da seguinte forma: fracionou-se o AAS sólido em 4 porções:

- Porção 1 (controle): coletada no dia 0 e analisada no dia 7 (T0+7);
- Porção 2 mantida em estufa (50°C), coletada no dia 7 e analisada no dia 14 (T7+7);
- Porção 3 mantida em estufa (50°C), coletada no dia 14 e analisada no dia 21 (T14+7);
- Porção 4 mantida em estufa (50°C), coletada no dia 21 e analisada no dia 28 (T21+7) dias.

As amostras T0+7, T7+7, T14+7 e T21+7 foram diluídas e analisadas em espectroscopia UV-VIS.

3.3.3. Método Alternativo

O método alternativo utilizado para fins de estudos é a realização de coletas de amostras, respeitando os *time points* definidos assim como em um *Holding Time* convencional, porém com a realização de análises laboratoriais no mesmo dia.

Foram definidos os *time points* para o método alternativo de HT da seguinte forma: fracionou-se o AAS sólido em 4 porções:

- Porção 1: mantida por 21 dias no freezer (-20°C) (T0),
- Porção 2: mantida por 14 dias em freezer (-20°C) e 7 dias em estufa (50°C) (T7);
- Porção 3: mantida por 7 dias em freezer (-20°C) e 14 dias em estufa (50°C) (T14);
- Porção 4: mantida por 21 dias em estufa (50°C) (T21).

As amostras T0A, T7A, T14A e T21A foram coletadas no dia 21, diluídas e analisadas em espectroscopia UV-VIS.

3.4. Amostragens

As amostragens realizadas respeitaram os *time points* estabelecidos para estudo de cada um dos métodos de Holding Time, sendo realizadas as pesagens em balança analítica (TAG: CF-011) e diluídas para se obter concentração teórica de AAS de cerca de 90,0 µg/mL.

A estocagem das amostras foi realizada em freezer (TAG: CF-124) e estufa (TAG: CF-148), de modo a avaliar o perfil de degradação do AAS quando submetido a temperaturas extremas.

3.5. Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-VIS permite quantificação das concentrações de AAS e AS em solução para cada um dos três métodos, utilizando como referência a curva de calibração preparada (conforme descrito anteriormente) e lida em espectrofotômetro UV-Vis (TAG: CF-766).

As soluções padrão e amostras foram lidas em triplicata, na faixa de comprimento de onda de 252 a 308 nm. A quantidade de AAS e AS nas amostras foi calculada utilizando-se modelo de regressão por mínimos quadrados parciais obtidos a partir das soluções padrão.

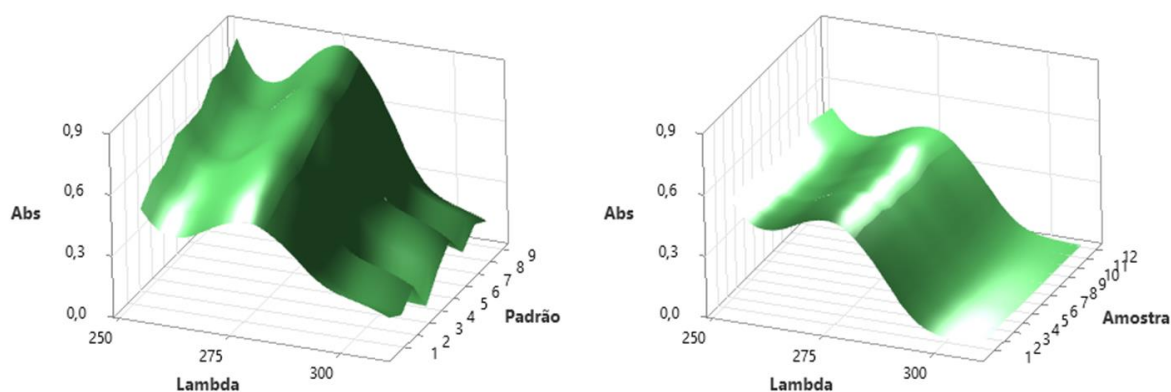
3.6. Estatística

A avaliação estatística permite a interpretação crítica dos dados numéricos obtidos. Dessa forma, utilizando o minitab 18 será avaliado em perfil comparativo todos os resultados obtidos para as três metodologias de estudo de *Holding Time* utilizadas para a avaliação do perfil degradativo do ácido acetilsalicílico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a realização das análises laboratoriais em dias diferentes de acordo com o plano de amostragem definido previamente, foram obtidas ao todo cinco curvas de calibração para adequação dos resultados das amostras referentes aos time points. Utilizando as curvas para adequação dos ajustes estatísticos, foram obtidos os resultados brutos de concentração de AAS e AS, em triplicata para cada amostra analisada, sendo calculados os seguintes valores médios para cada ponto amostral (Tabela 2). Na Figura 4 estão representados os espectrogramas obtidos para as soluções padrão (esquerda) e amostras (direita), na faixa de comprimento de onda de 252 a 308 nm.

Figura 4. Espectrogramas das soluções padrão (esquerda) e amostra (direita) obtidos na faixa de comprimento de onda de 252 a 308 nm.



Fonte: Minitab 18

Tabela 2. Resultados de concentração de AAS obtidos para as amostras analisadas ao longo do tempo (T0, T7, T14, T21) para os métodos convencional, convencional com atraso e alternativo.

Réplica	Tempo	Convencional	Convencional com Atraso	Alternativo
A	0	98,52	100,59	106,85
B	0	97,24	100,47	102,05
C	0	104,24	98,94	91,10
A	7	120,01	69,60	90,43
B	7	108,66	72,23	89,59
C	7	108,03	69,60	86,88
A	14	76,16	101,40	88,37
B	14	74,58	101,44	87,85
C	14	74,77	102,57	85,17
A	21	108,04	95,90	84,74
B	21	109,78	97,54	82,78
C	21	108,63	96,89	86,40

Fonte: Microsoft Excel

A quantificação de AAS e AS foi realizada empregando-se modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS - Partial least squares). O resumo dos ajustes dos modelos obtidos nos experimentos convencional, convencional com atraso e alternativo estão apresentados na Tabela 3.

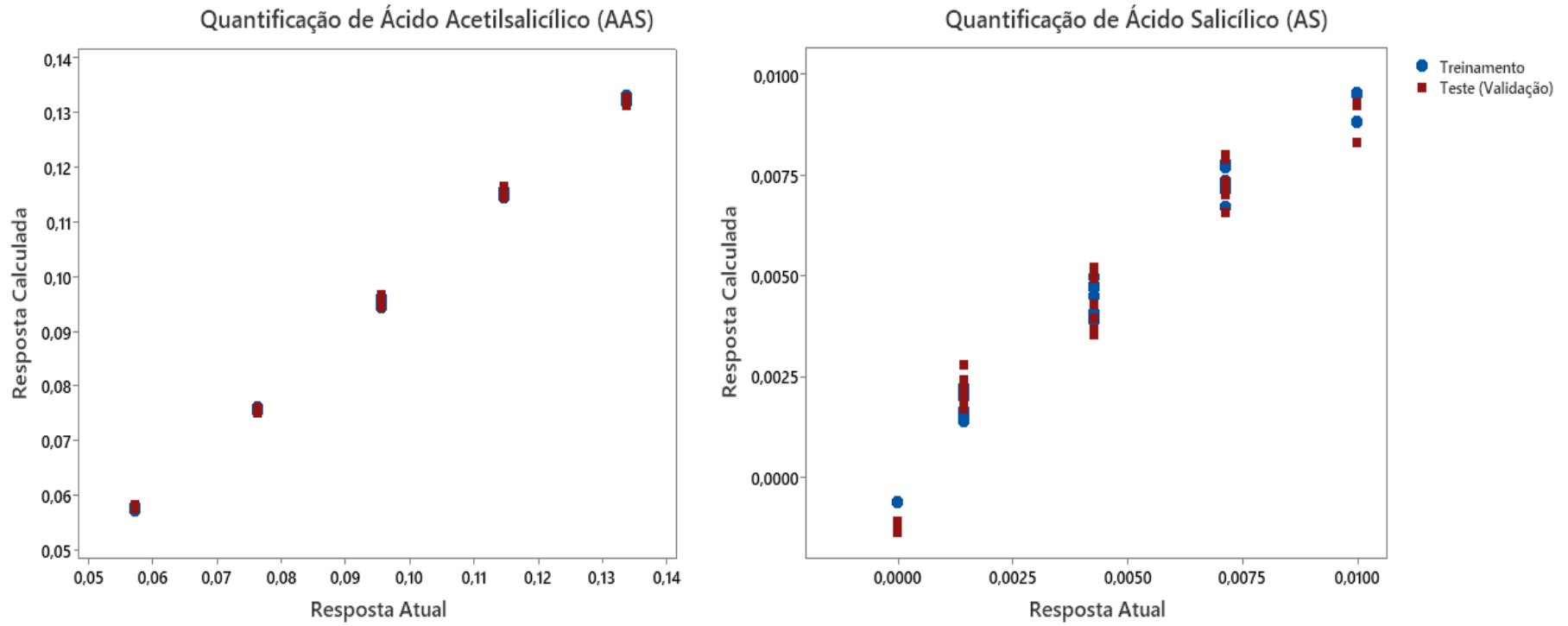
Tabela 3. Resumo dos dados dos modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) utilizados nos experimentos convencional (T0, T7, T14 e T21), convencional com atraso (T0+7, T7+7, T14+7 e T21+7) e alternativo (T0A, T7A, T14A e T21A).

Dia	R2 [AAS]	R2[AS]	Amostras
0	0,99952	0,99993	T0
7	0,99942	0,99991	T7 / T0+7
14	0,99984	0,99997	T14 / T7+7
21	0,99751	0,92654	T21 / T14+7 / T0A; T7A; T14A; T21A
28	0,99954	0,99954	T21+7

Fonte: Minitab 18

Os valores de R2[AAS] e R2[AS], apresentados na Tabela 2, indicam alta capacidade dos modelos de regressão PLS em predizer as concentrações de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico, respectivamente. Os gráficos de dispersão dos valores preditos (Y) e dos valores teóricos (X) de AAS (esquerda) e AS (direita) obtidos para o modelo PLS referente ao dia 21 (Tabela 3) estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Gráfico de dispersão dos valores preditos (Y) e AS (direita) obtidos para o modelo PLS referente ao dia 21.



Fonte: Minitab 18

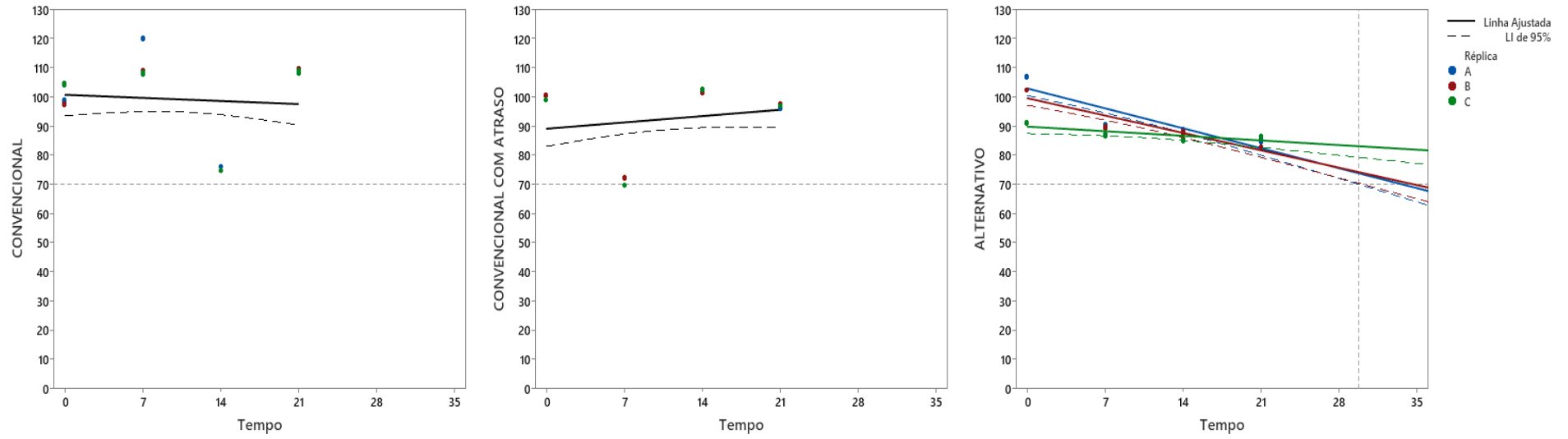
A expectativa do estudo de Holding Time é encontrar resultados decrescentes para a concentração de ácido acetilsalicílico e resultados crescentes para a concentração de ácido salicílico, de modo a comprovar que o teor de AAS decai em solução com o tempo e seu produto de degradação, o AS, aumenta em concentração. Entretanto, observando os dados dos experimentos convencional e convencional com atraso (ver Tabela 2), nota-se uma inconstância nos valores obtidos, com alta variabilidade nas concentrações de AAS. A alta variabilidade pode ser explicada pela variabilidade analítica entre os diferentes dias, o que dificulta avaliar o decaimento previsto das concentrações de AAS. Por outro lado, os resultados de concentração de AAS obtidos para o método alternativo apresentaram menor variabilidade (ver Tabela 2), o que permite identificar o padrão de degradação esperado.

Os gráficos de dispersão de concentração de AAS (Y) ao longo do tempo (X) obtidos para os métodos convencional (esquerda), convencional com atraso (centro) e alternativo (direita) estão apresentados na Figura 6. Para os métodos convencional e convencional com atraso, nota-se que não é possível avaliar tendência de decaimento das concentrações de AAS e, conseqüentemente, não é possível determinar o prazo de validade (ver Figura 6). Por outro lado, os dados de concentração de AAS obtidos pelo método alternativo apresentam tendência de decaimento, o que permitiu estabelecer um prazo de 30 dias até que a concentração de AAS atinja cerca de 70% da concentração inicial (ver Figura 6).

A realização das análises do método alternativo nas mesmas condições experimentais possibilitou reduzir a variabilidade analítica entre os diferentes dias. Dessa forma, o modelo de regressão linear obtido para a concentração de AAS (Y) em função do tempo (X) foi adequadamente ajustado. O ajuste do modelo de regressão para estudo de estabilidade envolve três etapas: 1ª etapa) avalia-se se há ou não interação entre tempo e lote (tempo*lote), o que significa dizer que os diferentes lotes apresentam velocidades de degradação diferentes entre si (diferentes coeficientes angulares). Se a interação é significativa (p-valor < 0,05), opta-se pelo ajuste de modelos de regressão individuais para cada lote. Por outro lado, se a interação não é significativa (p-valor \geq 0,05) procede-se com a segunda etapa de ajuste. 2ª etapa) avalia-se se há ou não diferença entre as concentrações iniciais de AAS para os diferentes lotes. Se há diferença da concentração inicial de AAS para os diferentes lotes, opta-se por ajustar um modelo de regressão para cada lote (com diferentes coeficientes lineares, porém com mesmo coeficiente angular). Se não há

diferença entre as concentrações iniciais de AAS para os diferentes lotes, procede-se a terceira etapa. 3ª etapa) ajusta-se um modelo de regressão único (mesmo coeficientes angular e linear) para todos os lotes. No caso do presente estudo, constatou-se que os diferentes lotes apresentam diferentes velocidades de degradação (1ª etapa). O resumo dos modelos de regressão para cada lote estão apresentados na Tabela 4.

Figura 6. Gráficos de dispersão de concentração de AAS (Y) ao longo do tempo (X) obtidos para os métodos convencional (esquerda), convencional com atraso (centro) e alternativo (direita).



Fonte: Minitab 18

Tabela 4. Resumo dos modelos de regressão para cada lote analisado conforme o método alternativo.

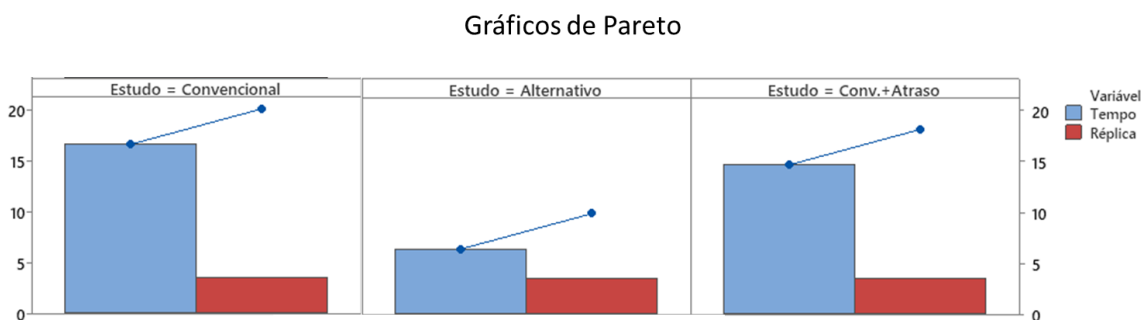
Lote	Modelo de regressão
A	$[AAS] = 102,85 - 0,997 t$
B	$[AAS] = 99,50 - 0,851 t$
C	$[AAS] = 89,76 - 0,226 t$

Fonte: Minitab 18

A Figura 6 representa a degradação do ácido acetilsalicílico em cada um dos três métodos de estudo, considerando dentro de cada um as triplicatas de análise individualmente. A partir das representações gráficas dos perfis degradativos do AAS para as metodologias convencional, convencional com atraso e alternativa, nota-se que o estudo alternativo evidencia de maneira mais adequada o decaimento da degradação de AAS com o tempo, enquanto os métodos convencional e convencional com atraso não permitem de maneira conclusiva ser feita essa análise, devido a alta variabilidade dos dados.

A fim de determinar a causa dessa diferença obtida entre as metodologias, foram realizados estudos de variabilidade para cada um dos três métodos, visando avaliar a contribuição de cada fator: variabilidade devido ao tempo e variabilidade devido às réplicas. Os gráficos de barras apresentados na Figura 7 demonstram a contribuição da variabilidade devido ao tempo (azul) e a variabilidade devido às réplicas (vermelho) para os métodos convencional (esquerda), convencional com atraso (direita) e alternativo (centro).

Figura 7. Contribuição da variabilidade devido ao tempo (azul) e a variabilidade devido às réplicas (vermelho) para os métodos convencional (esquerda), convencional com atraso (direita) e alternativo (centro).



Fonte: Minitab 18

Nos estudos convencional e convencional com atraso, nota-se uma grande contribuição da variabilidade devido ao tempo. Isso ocorre porque a variabilidade devido ao tempo é confundida com a variabilidade entre os diferentes dias de análise, uma vez que as amostras (T0, T7, T14, T21, T0+7, T7+7, T14+7 e T21+7) foram analisadas em dias diferentes (dias 0, 7, 14, 21, 7, 14, 21 e 28, respectivamente). Por outro lado, a contribuição da variabilidade devido ao tempo é inferior para o método alternativo. Isso ocorre porque a variabilidade entre os diferentes dias de análise é eliminada, uma vez que todas as amostras (T0A, T7A, T14A e T21A) foram analisadas no mesmo dia (dia 21). Dessa forma, a variabilidade devido ao tempo corresponde apenas a variabilidade devido a degradação de AAS ao longo do tempo de estudo. Portanto, o método alternativo permite reduzir a variabilidade devido a análise em diferentes dias e, conseqüentemente, permite avaliar melhor a degradação de AAS ao longo do tempo.

Dito isso, é importante destacar que os dados obtidos são específicos para o ácido acetilsalicílico e que a realização de um estudo de Holding Time é diferente para cada produto selecionado devido às diferenças entre formas farmacêuticas, diferenças de estabilidade dos produtos e dos perfis/cinética de degradação. Logo, é necessário considerar esses fatores previamente antes de ser estabelecido qual metodologia de estudo será abordada, bem como o impacto do atraso nas análises.

CONCLUSÃO

Dessa forma, é possível concluir que o método alternativo apresentou vantagens em relação ao método convencional e convencional com atraso, por reduzir a variabilidade devido às análises em dias diferentes. Não foi possível detectar diferenças entre os resultados obtidos pelo método convencional e convencional com atraso. No entanto, considerando-se a cinética de degradação do AAS, a diferença de sete dias entre as amostragens e análises pode ter impacto nos resultados obtidos. Visto que a cinética degradativa desse composto é de pseudo-primeira ordem e o mesmo possui uma degradação rápida, o tempo de HT contribui para com a redução da concentração do ativo. Com isso, o estabelecimento de prazos de espera prolongados pode levar a uma redução da concentração de AAS, e conseqüentemente, comprometer a qualidade final do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, L. Holding Time: como garantir a estabilidade de insumos farmacêuticos. Nexto. Segurança de Medicamentos, 16 de Abril de 2020. Disponível em: <https://nexus.com/holding-time-como-garantir-a-estabilidade-de-insumos-farmaceuticos>. Acesso em 04/06/2023.

ANVISA. Guias Relacionados à Garantia de Qualidade, de 31 de Outubro de 2006. Dispõe de orientações sobre o cumprimento de boas práticas de fabricação e vistorias técnicas.

ANVISA. Instrução Normativa N° 138, 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação. Edição 62 | São Paulo, 31 de março de 2022.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada N° 512, 27 de Maio de 2021. Dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade. Diário Oficial da União N° 101 | São Paulo, 31 de Maio de 2021.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada N° 658, 30 de Março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Sindusfarma. Edição N° 73.2022 | São Paulo, 31 de março de 2022.

Gráficos para Regressão de Mínimos Quadrados Parciais. Suporte ao Minitab® 21. Disponível em: <https://support.minitab.com/pt-br/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/regression/how-to/partial-least-squares/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/graphs/>. Acesso em 08/07/2023.

Como funciona o processo produtivo de fármacos. Propec, 25 de junho de 2021. Disponível em: <https://propeq.com/processo-produtivo-de-farmacos>. Acesso em 04/06/2023.

Entenda o ciclo de vida do produto farmacêutico. CDPI Pharma. Disponível em: <https://cdpipharma.com.br/entenda-o-ciclo-de-vida-do-produto-farmaceutico>. Acessado em 10/06/2023.

EMS S/A. Bula do medicamento Ácido Acetilsalicílico. Disponível em: https://www.ems.com.br/arquivos/produtos/bulas/bula_acido_acetilsalicilico_10425_1_501.pdf. Acesso em: 17/06/2023.

Importance of Quality Control and Quality Assurance. Parekhplast India Limited, 28 de Maio de 2016. Disponível em: <https://www.parekhplast.com/blog/importance-of-quality-control-and-quality-assurance>. Acesso em 11/06/2023.

Mandhu. Difference Between First Order and Pseudo First Order Reaction. Difference Between. Disponível em: <https://www.differencebetween.com/difference-between-first-order-and-pseudo-first-order-reaction/>. Acesso em: 17/06/2023.

Mira, W. Aspirina. Biologia - Manual do Enem. Quero Bolsa, 28 de Julho de 2022. Disponível em: <https://querobolsa.com.br/enem/biologia/aspirina>. Acesso em 17/06/2023.

Onah, J. The kinetics of hydrolysis of acetylsalicylic acid (Aspirin) in different polar media. Global Journal of Pure and Applied Sciences Vol. 10 N°. 2 March, 2004: 297-300. Copyright © Bachudo Science CO LTD. Printed in Nigeria.

Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Bula do medicamento AAS® Protect (ácido acetilsalicílico) Comprimidos Revestidos de Liberação Entérica 100mg. Disponível em: <https://static-webv8.jet.com.br/drogaosuper/Bulas/7897595903693.pdf>. Acesso em: 26/08/2022.

Silva, B. M. S. R. da, Medina, F., Rocha, H. V. A., & de Oliveira, A. R.. Uso do indicador de eficácia global de equipamentos como ferramenta para melhoria contínua: estudo de caso aplicado à produção farmacêutica. 31 de Março de 2016. Centro Tecnológico de Medicamentos (Farmanguinhos – Fiocruz). Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

To synthesize and submit salicylic acid by hydrolysis of aspirin. Recnotes - Keep Hunting Juniors, 28 de Março de 2021. Disponível em: <https://recnotes.com/to-synthesize-and-submit-salicylic-acid-by-hydrolysis-of-aspirin/>. Acesso em 17/06/2023.

WHO. Quality Assurance of Pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials, de 2001. Vol. 2, Good manufacturing practices and inspection, 2nd ed. Dispõe de informações referentes à garantia de qualidade e validação dentro da indústria farmacêutica | 2001.

WHO. General Guidance on Hold-time Studies. Forty-ninth report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations, de 2015. Dispõe de informações para o delineamento de estudos de Holding Time | 2015.

Rafael A.H.M. Baldo

Rafael Antonio Haruo Morita Baldo
29/09/2023

Prof. Dr. Felipe R. Lourenço
29/09/2023