

## **Estudo da estabilidade de materiais certificados de referência utilizados em análises toxicológicas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD)**

**Palavras-Chave:** materiais certificados, estabilidade, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), análises toxicológicas

**Autores(as):**

Laura de Souza Borbi - UNICAMP - FCF e CIATox  
Leonardo Costalonga Rodrigues (coorientador) - UNICAMP - FCM e CIATox  
Kauê de Oliveira Chinaglia - UNICAMP - FCM e CIATox  
Prof. Dr. José Luiz da Costa (orientador) - UNICAMP - FCF e CIATox

---

### **INTRODUÇÃO:**

Comumente chamados de padrões analíticos, os materiais de referência certificados (MRC), materiais de referência (MR) e padrões de trabalho (ou materiais de controle) são extensamente utilizados para calibração de aparelhos e métodos analíticos; atribuição de valores a outros materiais; avaliação da qualidade dos procedimentos; e controle de qualidade interno e externo de laboratórios. Variam sobretudo conforme sua origem e caracterização metrológica, e a escolha do material a ser usado é dependente do propósito requerido.

O uso desses materiais é fundamental para garantir a confiabilidade da medição e, assim, sua reprodutibilidade, visto que são idênticos ou semelhantes ao analito de interesse e possuem determinada propriedade bem estabelecida, como os valores de concentração e pureza. Além disso, o uso de Materiais de Referência é requerido para obtenção e manutenção da acreditação do laboratório pela ISO 17025, norma que define os requisitos para laboratórios de ensaios e calibração atestar sua competência técnica e, assim, a qualidade de seus resultados.

Uma vez que a maioria das empresas credenciadas para fornecimento de MRC são internacionais, para a obtenção e uso dos padrões analíticos, é preciso importá-los, o que torna o processo custoso e demorado. Os parâmetros como homogeneidade e estabilidade são características fundamentais para materiais de referência e seus fabricantes devem apresentar tais dados na certificação do material, segundo os guias 31 e 34 da ISO. Assim, precisam declarar o prazo de validade, considerando a instabilidade após longo tempo de armazenamento, inclusive após aberto, bem como sua medida de incerteza. Entretanto, a ausência de boas práticas de laboratório, bem como armazenamento incorreto dos MR, pode levar a alteração dos dados fornecidos na certificação do material, quanto a sua estabilidade.

Uma vez que, para assegurar a qualidade de métodos analíticos, inclusive durante as análises toxicológicas, é necessária a utilização de materiais de referência, estes que garantem a confiabilidade e reprodutibilidade de diversos métodos analíticos, faz-se necessário avaliar a estabilidade dos mesmos. Por isso, esse trabalho buscou avaliar a estabilidade desses padrões através de análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

## METODOLOGIA:

Cada material de referência teve um método único, desenvolvido para a análise de sua estabilidade, cada um foi desenvolvido com base na literatura e em suas propriedades físico-químicas. A descrição de cada método está ilustrada na tabela 1.

**Tabela 1.** Condições analítico-instrumentais dos métodos de acordo com cada analito estudado.

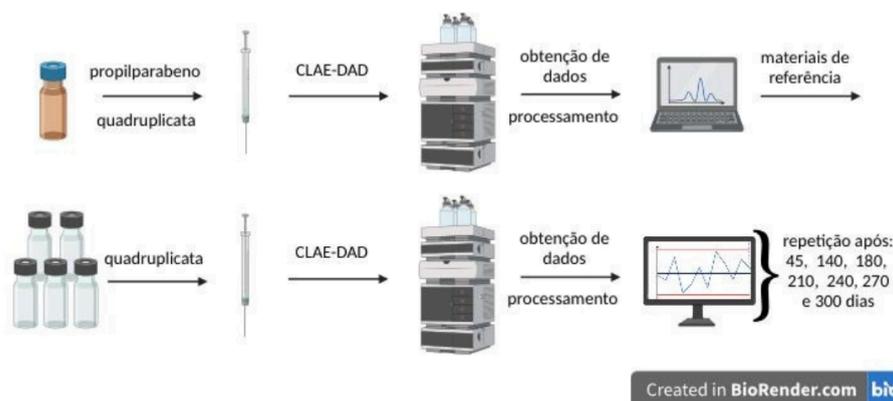
Analito	Tempo de corrida	Eluição	% B	Fluxo	Temperatura coluna (°C)	Absorção (nm)	Volume de injeção (µl)	Pressão inicial (bar)
6-acetil morfina	6,5	Isocrático	20	0,5	40	284	0,5	193
7-COOH-CBD	8	Isocrático	70	0,5	40	220	1	214
7-OH-CBD	8	Isocrático	75	0,5	40	220	1	201
Acetaminofeno	8	Isocrático	15	0,5	40	244	0,5	184
Benzoilecgonina	8	Isocrático	30	0,5	40	232	1	222
Clorpromazina	13	Gradiente (início em 5% de B, indo até 95%)	NA	0,5	40	249	1	154
Clozapina	7	Isocrático	45	0,5	40	292	0,5	240
Desipramina	9	Gradiente (início em 15% de B, indo até 90%)	NA	0,5	40	251	1	185
Imipramina	9	Gradiente (início em 15% de B, indo até 90%)	NA	0,5	40	250	1	184
Lamotrigina	10	Gradiente (início em 10% de B, indo até 40%)	NA	0,5	40	292	1	169
N-desmetil clozapina	10	Gradiente (início em 10% de B, indo até 60%)	NA	0,5	40	293	0,5	170
Olanzapina	10	Gradiente (início em 15% de B, indo até 90%)	NA	0,5	40	259	0,5	184
Propilparabeno	10,5	Isocrático	60	0,5	40	254	1	233
Zolpidem	8	Gradiente (início em 15% de B, indo até 90%)	NA	0,5	40	296	1	184
Zolpidem-COOH	8	Gradiente (início em 15% de B, indo até 90%)	NA	0,5	40	296	1	185

*\*%B porcentagem inicial de fase móvel B; NA não aplicável*

A análise de cada analito foi realizada durante intervalos de tempo, sendo eles 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 dias. Assim, caso a diferença da área inicial e da área do dia tenha sido de, no máximo, +/-20%, é possível determinar que o padrão encontra-se estável para aquele período.

Antes de cada análise das substâncias de interesse, uma solução de propilparabeno foi injetada no sistema, para verificação do funcionamento adequado do equipamento e, assim, da robustez do método já que os parabenos são utilizados como conservantes em formulações farmacêuticas, como medicamentos e cosméticos, visto que apresentam estabilidade bem conhecida. Desse modo, foi possível avaliar, através da variação nas áreas obtidas em diferentes tempos, se existiu algum problema intrínseco ao material de referência ou ao equipamento analítico que possa ter atrapalhado a análise de estabilidade.

Após esse procedimento, o analito foi injetado conforme as especificações de seu método, em quadruplicata, com uma mistura de fases móveis, sendo água (A) e metanol (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v) e 2 mmol/L de formiato de amônio. O resultado das áreas obtidas foi compilado em uma planilha para análise de sua estabilidade. A figura 1 contém um esquema ilustrativo do processo descrito.

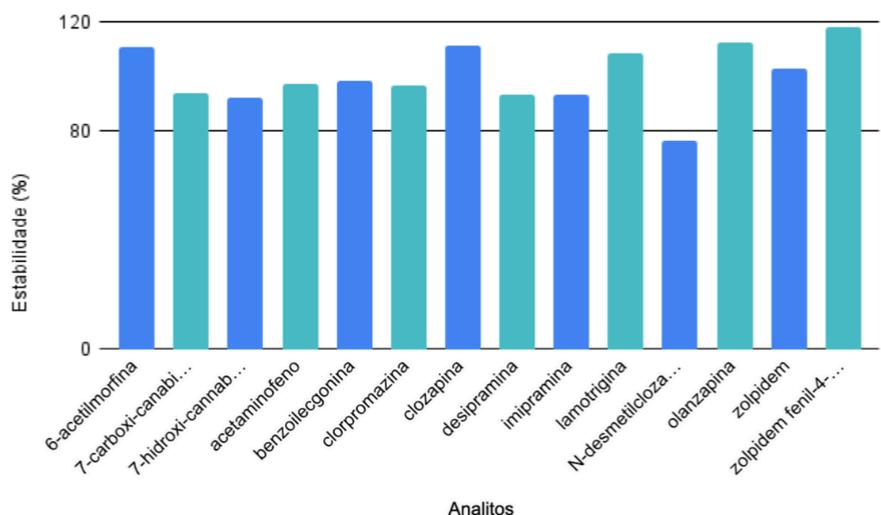


**Figura 1.** Esquema demonstrativo para o processo de análise de estabilidade de cada analito. Criado com [BioRender.com](https://www.biorender.com)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após 300 dias, foi possível identificar se cada analito se manteve estável ou não, sendo considerado estável aquele que manteve diferença de área absoluta inicial e final em até  $\pm 20\%$ . Com exceção da N-desmetilclozapina, todos mantiveram-se estáveis, com variações inferiores à  $\pm 20\%$ , como ilustrado na Figura 2.

Em suma, pôde-se observar que, após 300 dias de análise, a maior variação registrada na área da 6-acetilmorfina, clozapina e olanzapina foi de 11,0%, 11,1%, e 12,7%, respectivamente. Já o 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD e benzoilecgonina apresentaram alteração de 7,9%, 6,5% e 1,6%, respectivamente. Para clorpromazina, desipramina e imipramina, foi de 3,3%, 6,4%, e 6,9%. Para o zolpidem e zolpidem-COOH houve alteração na área de 2,8% e 17,9%, respectivamente. E por fim, para o acetaminofeno, lamotrigina e N-desmetilclozapina houve alteração na área de 2,9%, 8,4% e 23,4%, respectivamente. Sendo assim, com exceção da N-desmetilclozapina que se apresentou instável no 60º dia de experimento, todos os demais analitos apresentam-se estáveis durante os 300 dias de análise.



**Figura 2.** Gráfico da maior variação em porcentagem de todos os analitos.

## CONCLUSÃO:

Por meio deste trabalho, foi possível realizar a análise da estabilidade de quatorze analitos, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). A eluição dos analitos foi realizada com uma mistura de fases móveis, em condições distintas, sendo que sete analitos foram eluídos em modo isocrático, e os outros sete através do método de gradiente. Destes, treze analitos se mostraram estáveis após os 300 dias de avaliação, com exceção da N-desmetilclozapina que, após 60 dias, apresentou decaimento da área acima de 20% em relação à área inicial.

## BIBLIOGRAFIA:

Shilito R, Brooker N (2022). Reference Materials and Working Standards. In R. Shilito, G. Shan (Ed.), *Application of Sampling and Detection Methods in Agricultural Plant Biotechnology* (1a. ed., Cap 8, pp. 141-160). Duxford, United Kingdom: Elsevier Inc. in co-operation with Cereal & Grains Association.

ABNT ISO Guide 30 (2015). Reference Materials - Selected Terms and Definitions.

ABNT ISO Guide 31 (2017). Reference Materials - Contents of Certificates, Labels and Accompanying Documentation.

ABNT NBR ISO/IEC 17025 (2017). Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração.

ABNT ISO Guide 34 (2009) General Requirements for the competence of reference material producers.

Linsinger TP, Pauwels J, van der Veen AM, Schimmel H, Lamberty, A (2001). Homogeneity and stability of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance*, 6:20-25.

ABNT ISO Guide 35 (2017). Reference materials - guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability]

Martins, I (2017). In: R. Moreau, M. Siqueira (Coord.). *Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica* (2a. ed., Cap. 3, pp. 39-60). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.

Engelhard T, Dreazen, O (2004). Current best practice for traceability in testing laboratories, when certified reference materials are unavailable. *Accreditation and quality assurance*, 9(7), 397-398.

Moura SSD, Costa SRRD (2009). Estudo da utilização de materiais de referência nas análises de água por laboratórios envolvidos no sistema de acreditação. *Production*, 19, 304-316.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. (2010). Resolução nº 391, de 9 de agosto de 1999: Regulamento técnico para medicamentos genéricos.

Lanças FM (2009) A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica* 1(2): 35-61.

Dong MW (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Snyder LR, Kirkland JJ & Dolan JW (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Meyer, VR (2010). *Practical high-performance liquid chromatography*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

McMaster MC. (2007). *HPLC: a practical user's guide*. John Wiley & Sons.

M.A. Moreno, D. Castro, R Frutos, M. R Ballesteros, J. L. Lastres (2000). *Liquid Chromatographic Determination of Methylparaben and Propylparaben in Nortriptyline Hydrochloride Oil-Water Microemulsions*. Madrid, Spain: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Rafífa Hamoudová, Marie Pospíšilová, Jan Šícha (2006). *Separation and determination of clotrimazole, methylparaben and propylparaben in pharmaceutical preparation by micellar electrokinetic chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Volume 40, Issue 1, Pages 215-219).