

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACEUTICAS,
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

**ESTUDO DA EFICÁCIA DO D-SORBITOL SOBRE A ESTABILIDADE DE
MECOBALAMINA (VITAMINA B12)**

Lettícia Martinho de Paula

Anápolis, GO

2025

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

**ESTUDO DA EFICÁCIA DO D-SORBITOL SOBRE A ESTABILIDADE DE
MECOBALAMINA (VITAMINA B12)**

Lettícia Martinho de Paula

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Farmacologia e Terapêutica da Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Anápolis, GO

2025

P324

Paula, Lettícia Martinho de.

Estudo da eficácia do D-Sorbitol sobre a estabilidade de Mecobalamina (vitamina B12) / Lettícia Martinho de Paula - Anápolis: Universidade Evangélica de Goiás - UniEvangélica, 2025.

100p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências

Farmacêuticas, Farmacologia e Terapêutica – Universidade Evangélica

de Goiás - UniEvangélica, 2025.

1. Mecobalamina 2. Vitamina B12 3. D-Sorbitol 4. Estabilidade 5. CLAE

I. Vieira, Rodolfo de Paula

II. Título

CDU 615.1

Catálogo na Fonte

Elaborado por Rosilene Monteiro da Silva CRB1/3038

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DA EFICÁCIA DO D-SORBITOL SOBRE A ESTABILIDADE DE MECOBALAMINA (VITAMINA B12)

Lettícia Martinho de Paula

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas
/PPGCF da Universidade
Evangélica de
Goiás/UniEVANGÉLICA como
requisito parcial à obtenção do grau
de MESTRE.

Linha de Pesquisa:

Aprovado em 28 de fevereiro de 2025.

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **RODOLFO DE PAULA VIEIRA**
Data: 28/02/2025 11:39:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodolfo de Paula

Vieira Presidente da

Banca

Documento assinado digitalmente
 **LOIDE OLIVEIRA SALLUM**
Data: 28/02/2025 11:44:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lóide Oliviera Sallum

Avaliador Interno

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO**
Data: 10/03/2025 10:49:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Flavio Aimbire Soares de Carvalho

Avaliador Externo

Resumo

As vitaminas B são essenciais para o funcionamento do organismo, com destaque para a B12, que não pode ser armazenada no corpo e é importante para evitar anemia, disfunção neurológica e outros problemas de saúde. A B12 pode ser produzida industrialmente por fermentação de bactérias, sendo utilizada na fabricação de medicamentos genéricos. Os dados apresentados nesta pesquisa revelam que o reagente D-sorbitol é um ótimo estabilizante para as soluções da vitamina B12, mecobalamina, deste modo o mesmo consegue proteger a molécula desta vitamina impedindo que a mesma sofra algum tipo de interferência externa. Ao realizar testes com as três concentrações deste diluente foi possível concluir que a concentração que melhor estabilizou esta molécula foi a mais concentrada (2,0 g/L), que conseguiu ser estável por 6 horas em temperatura controlada de 25 °C, que simula a bancada neste tempo que é o horário de um turno de trabalho. Este reagente também conseguiu estabilizar a amostra por 20 horas quando no equipamento CLAE com temperatura controlada de 10 °C com um tempo de corrida de cada injeção de amostra de 6 minutos, oferecendo uma nova abordagem promissora para pesquisadores que buscam controlar a degradação da molécula de mecobalamina.

Palavras-chave: Mecobalamina, Vitamina B12, D-sorbitol, Estabilidade, CLAE.

Abstract

B vitamins are essential for the body to function, especially B12, which cannot be stored in the body and is important for preventing anemia, neurological dysfunction and other health problems. B12 can be produced industrially by fermenting bacteria and is used in the manufacture of generic drugs. The data presented in this research reveal that the reagent D-sorbitol is an excellent stabilizer for solutions of vitamin B12, mecobalamin, and thus it can protect the molecule of this vitamin, preventing it from suffering any type of external interference. When performing tests with the three concentrations of this diluent, it was possible to conclude that the concentration that best stabilized this molecule was the most concentrated (2.0 g/L), which was able to remain stable for 6 hours at a controlled temperature of 25 °C, which simulates the bench during this time, which is the time of a work shift. This reagent was also able to stabilize the sample for 20 hours when in the HPLC equipment with a controlled temperature of 10 °C with a run time of each sample injection of 6 minutes, offering a promising new approach for researchers seeking to control the degradation of the mecobalamin molecule.

Keywords: Mecobalamin, Vitamin B12, D-sorbitol, Stability, HPLC.

Lista de Abreviaturas

MP – Matéria-prima

PA – Produto Acabado

MC – Medicamento comercializado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

USP – Farmacopeia Americana

EST – Estabilidade Analítica

CQFQ – Controle de Qualidade Físico-Químico

Drug Master File – DMF

Co – Cobalto

Ciano – CN^-

Hidróxido – OH^-

Metilo – CH_3

Lista de Símbolos

μm – Micrómetro

μL – Microlitro

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por até aqui ter me ajudado, meus pais pela garra e persistência em que me inspiro, ao meu irmão pelo apoio e ao meu marido pela paciência comigo.

Aos meus colegas pelos conselhos e ajuda em dias difíceis serei sempre grata.

Agradeço também ao meu orientador, Professor Rodolfo Vieira que me aconselhou e me ajudou a tornar este trabalho possível.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	6
3. Objetivos.....	13
3.1. Geral.....	13
3.2. Específicos.....	13
3.2.1. Avaliar os efeitos do D-sorbitol na estabilização e proteção da molécula de Mecobalamina, nos diferentes estados: na matéria-prima, no produto acabado e no medicamento já comercializado dentro do período de 6 horas;	13
3.2.2. Realizar testes com diferentes concentrações de D-sorbitol;	13
3.2.3. Realizar as análises de decaimento de teor de Mecobalamina utilizando a CLAE.....	13
4. Materiais e Métodos.....	14
4.1. Reagentes.....	14
4.2. Soluções utilizadas.....	15
4.3. Materiais	15
4.4. Equipamentos	15
4.5. Preparo de Soluções	16
5. Resultados	20
6. Discussão	27
7. Conclusão	40
8. Referências Bibliográficas.....	41
9. Anexos	49
9.1. Anexo I – Relatório de mecobalamina em matéria-prima nas diferentes concentrações do diluente.	49
9.2. Anexo II – Relatório de mecobalamina em produto acabado nas diferentes concentrações do diluente.	64
9.3. Anexo III – Relatório de mecobalamina em medicamento comercializado nas diferentes concentrações do diluente.	79

1. Introdução

Vitaminas do complexo B são essenciais para o bom funcionamento do organismo de uma pessoa, uma vez que estimulam a produção de energia e mantêm o intestino e sistema nervoso em boas condições de funcionamento (RUBERT, et al, 2017). Dentre as vitaminas do complexo B a mais completa é a B12, onde a mesma apresenta grande estrutura molecular exibindo como átomo central o cobalto (Co), sendo chamada de cobalaminas (NUTRI-FACTS, 2016) onde apresenta a cianocobalamina, hidroxicobalamina e a Mecobalamina como suas derivadas.

A deficiência desta vitamina B12 no organismo leva a quadros de anemia profunda, disfunção neurológica, sintomas depressivos, fraqueza muscular, entre outros. Embora a vitamina B12 é encontrada em alimentos como o ovo e carnes, muitas pessoas restringem estes alimentos por fazerem parte de uma dieta vegana, então é preciso repor esta vitamina diariamente no organismo em decorrência da mesma não consegue ser estocada no corpo humano por integrar as classes de vitaminas hidrossolúveis (VANNUCCHI, 2010), (VIANA et.al. 2022).

Em escala industrial a vitamina B12 pode ser produzida através do processo de fermentação e filtração de bactérias Gram-negativas, (ROGEL, 2001). Geralmente o processo de produção de mecobalamina consiste em duas partes, onde na primeira parte a bactéria *Ensifer Adhaerens* é fermentada e filtrada e seu resíduo é cristalizado formando a cianocobalamina, na segunda parte a matéria-prima (MP) formado é centrifugado, purificado e cristalizado novamente, formando o produto final, mecobalamina (HEBEI, 2023) (LIU et.al. 2023).

Através deste processo de fermentação a matéria-prima de mecobalamina chega em indústrias do ramo farmacêutico atuante na área de medicamentos genéricos. Estes medicamentos são cópias de medicamentos referências, onde possuem a mesma dosagem, princípio ativo, posologia e indicação farmacêutica, apresentando somente o nome do princípio ativo no produto. No Brasil, em 1999 foi criada a lei do Genérico que permitiu a venda deste tipo de medicamento a um valor menor que o medicamento referência (ARAUJO, 2010).

Para que uma indústria possa produzir estes medicamentos é necessário cumprir com uma série de exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é órgão responsável pela regulamentação, como estudos de equivalência e bioequivalência farmacêutica em comparação *in-vitro* e *in-vivo*, que são testes realizados em equipamentos e após, em humanos para comprovar que o medicamento genérico está de acordo com o de referência (BRASIL, 2024).

Alguns destes testes realizados ocorrem nos equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção no Ultravioleta (UV), que se caracteriza por ser uma técnica analítica indispensável para garantir a segurança e eficácia de medicamentos, separando e quantificando o produto desejado (UNESP). Neste equipamento para a Matéria-prima (MP) mecobalamina será realizado o teste de Doseamento, que consiste em verificar se a dose descrita está sendo entregue e de acordo com seu medicamento comparador. Pelo fato de mecobalamina ser uma vitamina, ela se encaixa nos parâmetros de suplemento alimentar e não apresenta um medicamento de referência, então é utilizado um medicamento já comercializado no mercado para

servir como um comparador em relação ao medicamento em desenvolvimento (BRASIL, 2024), (SÃO PAULO, 2021). Neste caso o tanto o medicamento comercializado (MC), quanto o medicamento em desenvolvimento deve conter 1 mg/comprimido.

O método de partida utilizado na quantificação de mecobalamina para o teste de doseamento foi retirado da farmacopeia americana (USP), onde algumas condições cromatográficas foram alteradas. Após as alterações, a coluna utilizada foi uma Phenomenex Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm (5µm) com temperatura da coluna a 40 °C, temperatura do amostrador a 10°C, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 40 µL, faixa de detecção de 380 nm e tempo de corrida de 6 minutos. O diluente era uma mistura de água e metanol na proporção 60:40 (v/v) e para a fase móvel foi realizado uma mistura de 2,74 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado para um béquer de 1000 mL e seu pH aferido para 3,5 com ácido fosfórico, após é realizada uma mistura deste tampão com acetonitrila e metanol na proporção 70:15:15 (v/v).

Ao realizar análise com este método foi observado que as soluções não demonstraram estabilidade em bancada com temperatura controlada de 25 °C por mais de 5 minutos, sendo então necessário preparar apenas uma solução por vez e imediatamente colocá-la no compartimento de soluções (amostrador) do CLAE com temperatura controlada de 10 °C, onde a mesma é estável por apenas 12 horas.

Este método não apresentou ser indicativo de estabilidade por motivo de os laboratórios de Estabilidade Analítica (EST) e Controle de Qualidade Físico-Químico (CQFQ) analisarem muitos lotes de um só medicamento diariamente e a depender do teste, são realizados muitos preparos de Produto Acabado (PA)

e MP, que após seus preparos são injetados no CLAE ao mesmo tempo, demandando o tempo de um turno de trabalho (6 horas) entre o preparo na bancada até o equipamento. Pensando nisto, o teste de doseamento de mecobalamina não está adequado para ser reproduzido nestes laboratórios visto que em temperatura de bancada (25 °C), mecobalamina perde sua estabilidade após 5 minutos.

Ao estudar a estabilidade das vitaminas do complexo B, foi possível observar que açúcares como a glicose e sacarose conseguem estabilizá-las pelo fato de serem moléculas polares (hidrofílicas) apresentando uma grande quantidade de grupamentos OH que formam ligações de hidrogênio com a água, conseguindo então, reagir com o meio externo e livrando estas vitaminas deste contato com o mesmo (MARTINS et. al., 2013), (RIBEIRO, 1945).

Pensando em um reagente derivado de açúcares o d-sorbitol ou sorbitol foi encontrado, se destacando como um produto que protege contra a perda de humidade e decaimento de teor. Este reagente é classificado como um álcool do açúcar encontrado em muitas frutas e em escala industrial o mesmo é extraído através da produção de xarope de milho (BAAR, KOHN, TICE, 1957), (INFINITY PHAMA, 2022).

Este estudo teve como objetivo estabilizar a molécula de mecobalamina em relação ao tempo de preparo em bancada com temperatura controlada de 25 °C e também no amostrador do equipamento CLAE com temperatura controlada de 10 °C, para quando este produto chegar em laboratórios de Estabilidade Analítica (EST) e Controle de Qualidade Físico-químico (CQFQ) consiga ser estável por pelo menos um turno de trabalho para que não ocorra decaimento

de teor ainda em bancada de preparo, para posteriormente esta vitamina ser comercializada.

2. Revisão Bibliográfica

Atualmente o mundo tem se preocupado muito com a qualidade dos alimentos que diariamente são consumidos, o que incluía a falta de vitaminas no organismo humano (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008). Sendo consideradas essenciais para o crescimento e manutenção da vida humana, as vitaminas podem ser encontradas em alimentos vegetais e animais de forma natural.

Estas vitaminas podem ser definidas em duas classes, como vemos na figura 1. As vitaminas lipossolúveis são capazes de se solubilizarem em gordura corporal, desta forma conseguem ser armazenadas, dentre as quais temos como exemplo dessas vitaminas A, D, E e K. Vitaminas hidrossolúveis são vitaminas que não conseguem ser solúveis em gordura, porém são solubilizadas facilmente em água, sendo, portanto, excretadas do corpo humano. As vitaminas do complexo B e C se destacam nesta classe (RUBERT, et al, 2017).

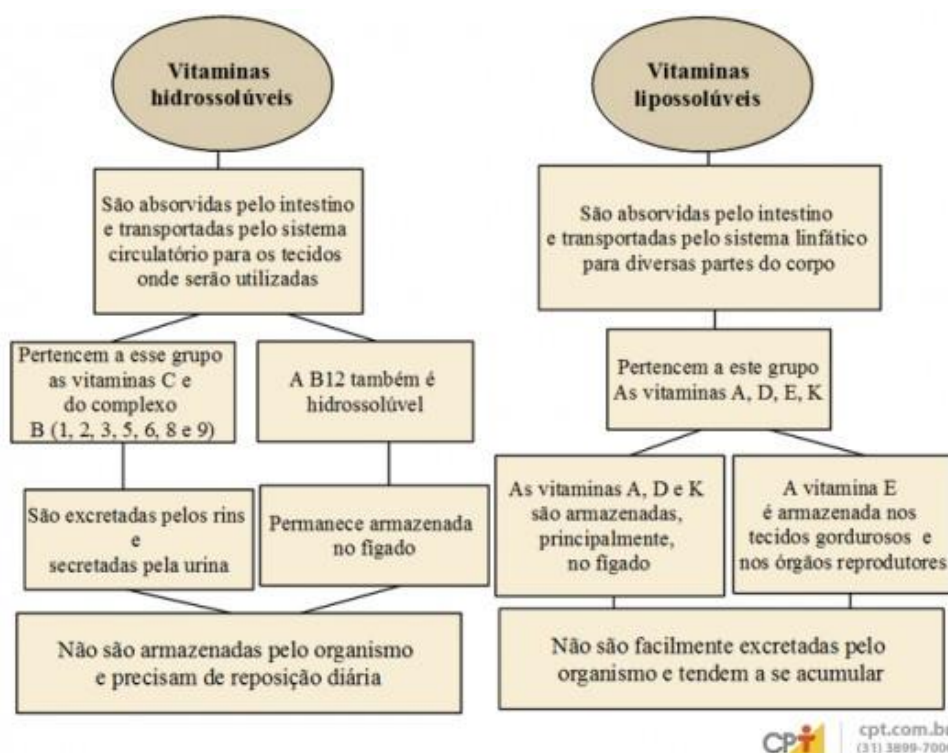


Figura 01: Diferenças entre vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis.

As vitaminas do complexo B são importantes, em pequenas quantidades, nas sínteses de ácido nucleico e proteínas, as quais são vitais para a produção de energia dos organismos. Existe uma vasta variedade destas vitaminas, sendo a B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 e B12 (GAZONI, MALEZAN, SANTOS, 2016; SAWANGJIT, et al, 2020). A mecobalamina é uma coenzima da vitamina B12, seu mecanismo de ação atua na condução nervosa, nos sintomas de neuropatias periféricas, no tratamento da diabetes, anemias e atua na síntese do DNA (Zhang, YF, & Ning, G. 2008), (SILVA, 2019).

Sua estrutura molecular apresenta um átomo central de cobalto (Co) um fosfato e uma base nitrogenada (5,6-dimetil benzimidazol) ligados ao anel corrina, (substância que possui Cobalto em sua estrutura) por um grupamento metila (CH_3), representado na figura 02, formando assim a mecobalamina, que se difere da cianocobalamina e hidróxidocobalamina pelos radicais CN^- (ciano), OH^- (hidróxido) e CH_3 (metilo), veja figura 03 (SILVA, 2019).

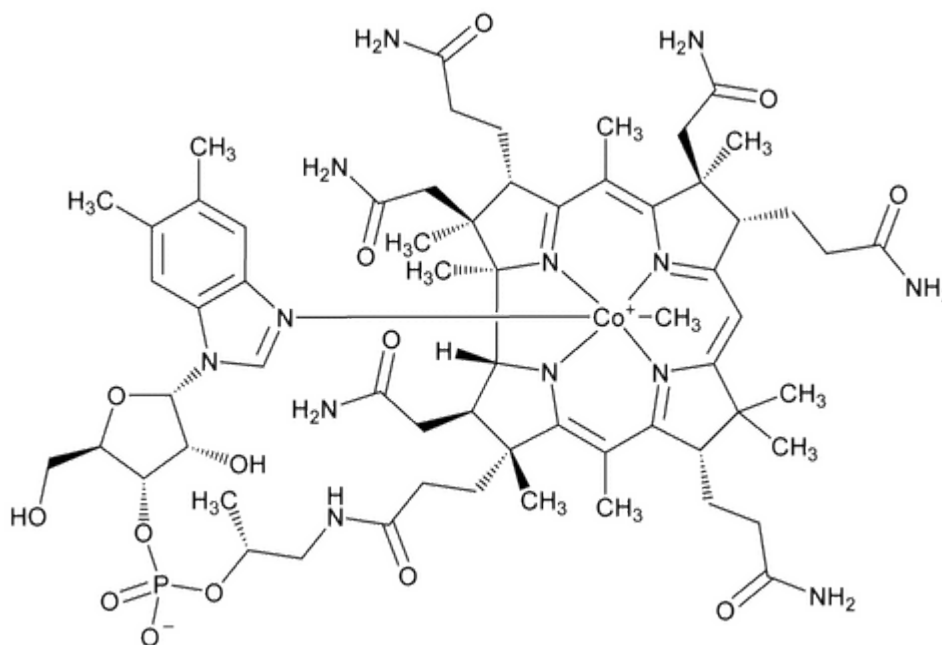


Figura 02: Estrutura molecular da Matéria-prima de mecobalamina. USP.

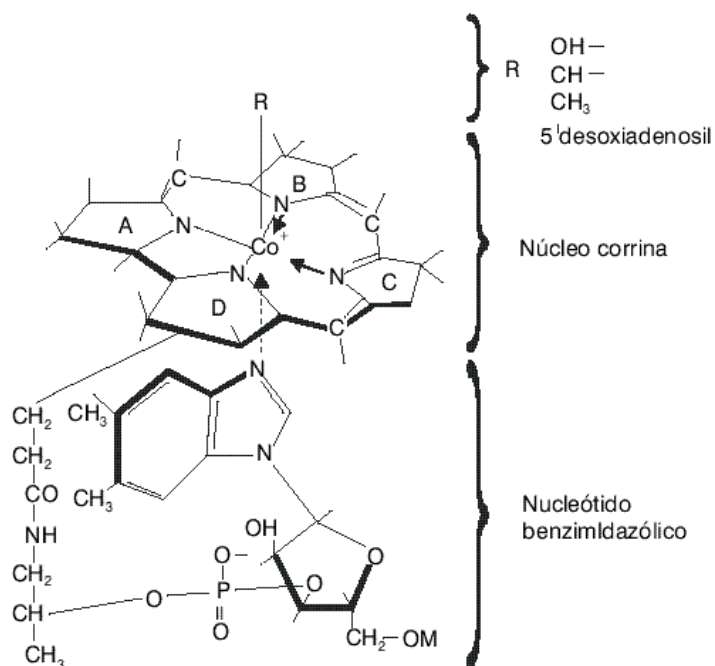


Figura 03: Estrutura molecular da cobalamina com seu radical OH^- , CH^- e CH_3 . (BARRIOS, HERNÁNDEZ, GÓMEZ, 1999)

Estas três vitaminas são muito sensíveis e podem degradar em contato com certas condições como a temperatura, humidade exposição a luz, mudança de pH, em que a mesma está inerte, processos industriais, entre outros (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO SANT'ANA, 2008).

De acordo com a USP, a massa molecular de mecobalamina é 1355.40 g/mol e sua fórmula molecular $\text{C}_{63}\text{H}_{91}\text{CoN}_{13}\text{O}_{14}\text{P}$, apresenta CAS 13422-55-4. O fabricante da Matéria-prima de mecobalamina (*Hebei Huarong Pharmaceutical Co., Ltd.*) traz em seu DMF (Drug Master File) suas características, onde ela apresenta ser um cristal vermelho escuro ou um pó cristalino (veja figura 04), moderadamente solúvel em água e ligeiramente solúvel em etanol. Por ser uma molécula instável o fabricante apresenta a matéria-prima de mecobalamina a 1% estabilizada com fosfato de cálcio.



Figura 04: Foto da matéria-prima de mecobalamina.

Por ser uma molécula grande seus métodos de quantificação podem ser demorados por envolver processos biológicos e pré-tratamento de amostras envolvendo reações químicas complexas como ocorre em processos de extração, fluorimetria, processos microbiológicos, entre outros, entretanto uma técnica rápida e mais prática ocorre com métodos em CLAE que são muito precisos, sensíveis, seletivos e robustos, além de apresentar uma economia nos solventes utilizados (POONGOTHAI, ILAVARASAN, KARRUNAKARAN, 2010).

O princípio da cromatografia é a separação de componentes de uma mistura ocorrendo pela interação entre duas fases imiscíveis entre si, a móvel e a estacionária. A fase móvel é um fluido, gasoso ou líquido, que percorre toda a fase estacionária, arrastando com ela a molécula de interesse para que seja separada e quantificada. A técnica por CLAE envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida em uma coluna, que é um tipo de tubo que contém partículas porosas, geralmente de sílica, movida pela fase móvel a um certo fluxo com o auxílio de uma bomba. Este líquido passa por um detector com um jogo de espelhos que identificam a molécula e mede seu valor através da sua

intensidade, como pode-se observar na figura 05 (CARVALHO, 2014), (Agilent Technologies, 2016).

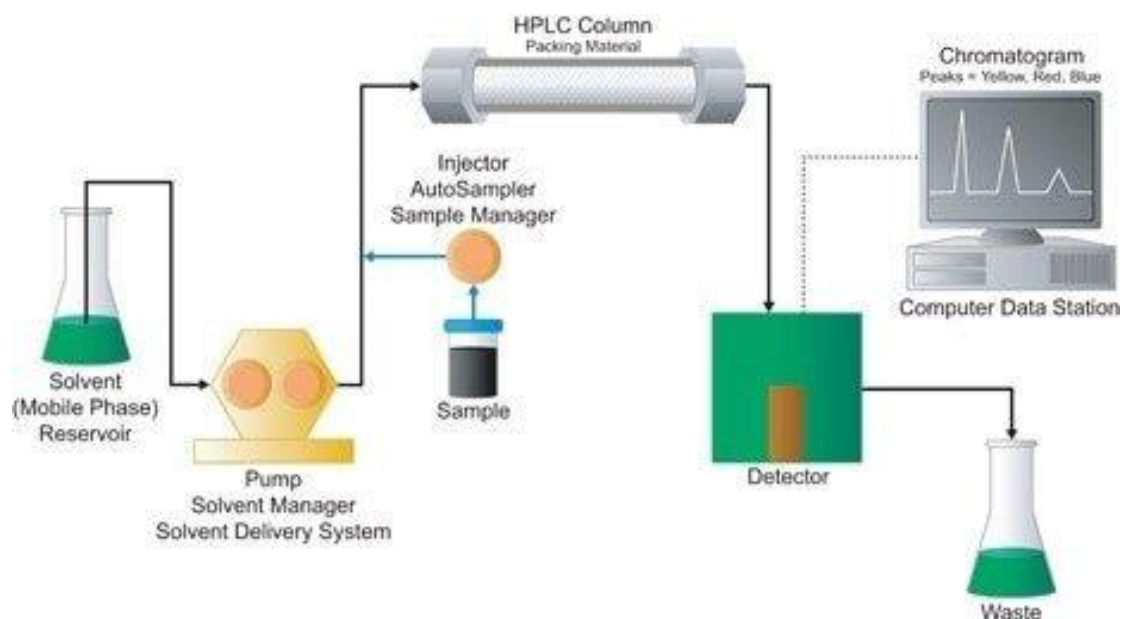


Figura 05: Sistema do processo de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (Waters, 2024).

É preciso que o método utilizado no equipamento CLAE seja estável e permita identificar o MP na presença de seus produtos de degradação formados, onde o ativo é submetido a muitas condições de estresse como a hidrólise ácida e básica, oxidação, ionização, luz, temperatura, entre outros. Este teste se faz necessário, pois segundo a ANVISA, para a concessão de um medicamento genérico o doseamento do MP é parte de um critério mínimo exigido para garantir sua qualidade, segurança e eficácia (BRASIL, 2017, ABREU, 2020).

Ao realizar o teste com a matéria-prima e produto acabado de mecobalamina foi observado que ela não apresenta estabilidade da solução quando em temperatura ambiente (25 °C) em bancada. O método foi realizado nas seguintes condições de coluna Phenomenex Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm (5µm) (L1), temperatura da coluna a 40 °C, temperatura do amostrador a 10°C, fluxo de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 40 µL, faixa de detecção de

380 nm e tempo de corrida de 6 minutos. O diluente utilizado é uma mistura de água e metanol na proporção 60:40 (v/v) e para a fase móvel foi realizado uma mistura de 2,74 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado para um béquer de 1000 mL e seu pH aferido para 3,5 com ácido fosfórico, após é realizada uma mistura deste tampão com acetonitrila e metanol na proporção 70:15:15 (v/v).

Com base neste método será testado um novo diluente, D-sorbitol, que é um derivado de açúcar que apresenta capacidade para estabilizar a molécula de mecobalamina tanto no MP quanto no PA, sua massa molecular é de 182,17 g/mol, fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$ e apresenta ser um sólido incolor e inodoro muito solúvel em água, veja figura 06. Este diluente será testado em diferentes concentrações para determinar qual será mais eficaz para estabilizar esta molécula pelo período de seis horas em temperatura ambiente (INFINITY PHAMA, 2022) (*Hebei Huarong Pharmaceutical Co., Ltd.*).

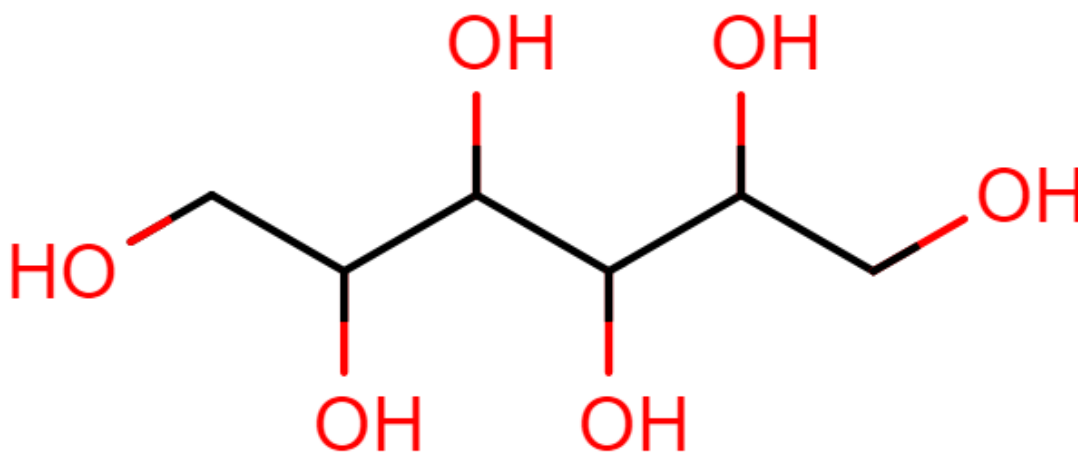


Figura 06: Estrutura molecular de D-sorbitol. Fonte: Chemicalize, 2024.

De acordo com BAAR, KOHN, TICE, 1957, D-sorbitol é um agente protetor das vitaminas do complexo B, pois ele envolve as moléculas e protege as

mesmas dos agentes estressantes minimizando significativamente as perdas por degradação. Segundo LIE, 2024, o açúcar sorbitol conseguiu estabilizar a molécula de mecobalamina quando aplicado como um diluente e sendo levado a condições estressantes como a variação de pH básica e ácida.

Nesta pesquisa fica claro que a mecobalamina é uma vitamina muito importante para o corpo humano se manter saudável e que para sua produção em escala industrial é preciso quantificá-la de acordo com os conceitos da agência reguladora. Neste intuito, para o teste de doseamento será testado o diluente D-sorbitol em diferentes concentrações para encontrar uma estabilidade em bancada de ao menos um turno trabalhado (6 horas) em temperatura controlada de 25 °C e no equipamento CLAE por ao menos 20 horas em temperatura controlada de 10°C para a molécula em questão, evitando assim o decaimento de seu teor em pouco tempo de preparo.

3. Objetivos

3.1. Geral

Testar o quanto o reagente D-sorbitol nas três concentrações seguintes (0,5 g/L, 1,0 g/L e 2,0 g/L) pode ser útil para estabilizar as soluções da vitamina B12, mecobalamina, e também proteger a molécula desta vitamina impedindo que a mesma sofra algum tipo de interferência externa.

3.2. Específicos

3.2.1. Avaliar os efeitos do D-sorbitol na estabilização e proteção da molécula de Mecobalamina, nos diferentes estados: na matéria-prima, no produto acabado e no medicamento já comercializado dentro do período de 6 horas;

3.2.2. Realizar testes com diferentes concentrações de D-sorbitol;

3.2.3. Realizar as análises de decaimento de teor de Mecobalamina utilizando a CLAE.

4. Materiais e Métodos

Nesta metodologia será testada a matéria-prima de mecobalamina a 1% estabilizada com fosfato de cálcio, o produto acabado ainda não comercializado e o medicamento já distribuído para venda no mercado com um diluente contendo D-Sorbitol, para substituir o diluente já utilizado (água e metanol na proporção 60:40 (v/v)) que não apresenta estabilização de seu teor para esta molécula. A seguir serão descritos os reagentes, soluções, materiais utilizados entre outros.

4.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nos estudos preliminares de estabilidade do método de doseamento de mecobalamina (Vit B12) matéria-prima a 1% estabilizada com fosfato de cálcio, o produto acabado ainda não comercializado e o medicamento já distribuído para venda no mercado por CLAE são:

Tabela 01: reagentes utilizados.

Reagentes	Fabricantes	CAS
Água purificada	Milli-Q	7732-18-5
Acetonitrila Grau CLAE	Biograde	75-05-8
Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado	Biograde	10049-21-5
Ácido Fosfórico	Biograde	7664-38-2
D-Sorbitol	Sigma – Aldrich	50-70-4
Metanol Grau CLAE	Biograde	67-56-1

Os reagentes metanol e acetonitrila precisam ser grau CLAE pelo fato de apresentarem propriedades químicas indicadas para este tipo de análise e a

água precisa ser purificada para retirar todos os sais contidos na mesma que podem interferir na análise pelo fato de o equipamento de detecção, CLAE ser muito sensível.

4.2. Soluções utilizadas

Solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 10%: Diluir 62 mL de ácido fosfórico em um 1L de água purificada. Transferir o volume para um frasco de vidro de 1 litro e armazenar em temperatura ambiente.

4.3. Materiais

Ao longo desta pesquisa, foram utilizados alguns materiais de laboratório:

- Balões volumétricos de 1000 mL, 200 mL, 50 mL e 10 mL;
- Filtro 0,45 μm ;
- Garrafas de vidro de 1 L;
- Pipetas de Pasteur descartáveis;
- Vials Âmbar;
- Seringas de 10 mL;
- Bastão;
- Ponteiras de Hand Step;
- Proveta volumétrica de 1 L.

4.4. Equipamentos

Nesta pesquisa foram utilizados alguns equipamentos do laboratório, como:

- Balança analítica com precisão de 0,0001 g e fabricante Mettler Toledo;
- Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity II, detector UV, injeção automática e sistema de aquisição de dados;

pHmetro manual, modelo SevenCompact da Mettler Toledo;

Vortex modelo laborglas;

Termo – higrômetro.

4.5. Preparo de Soluções

Tampão Fosfato de Sódio pH 3,50.

Este tampão é composto por 2,74 g (gramas) do reagente fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH_2PO_4) em 1 L (litro) de água (H_2O) após, esta solução é ajustada a pH 3,50 utilizando a solução de ácido fosfórico 10%.

Fase móvel

A fase móvel é preparada através da mistura da solução tampão fosfato de sódio pH 3,50, acetonitrila e metanol na proporção 70:15:15 (v/v), respectivamente.

Diferentes concentrações de diluente D-Sorbitol

D-Sorbitol a 0,50 g/L: Pesar 0,50 g do reagente D-sorbitol e diluir em 1L de água purificada;

D-Sorbitol a 1,00 g/L: Pesar 1,00 g do reagente D-sorbitol e diluir em 1L de água purificada;

D-Sorbitol a 2,00 g/L: Pesar 2,00 g do reagente D-sorbitol e diluir em 1L de água purificada;

Solução amostra Matéria-prima de Mecobalamina.

Pesar com precisão 200,00 mg da Matéria-prima de Mecobalamina 1% (equivalente a 2 mg de mecobalamina) e transferir para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cerca de 10 mL de diluente e levar ao Vortex com agitações severas por 2 minutos, dissolver e aferir o volume com diluente para obter a concentração final para o teste de doseamento de 0,02 mg/mL.

Solução amostra produto acabado ainda não comercializado de Mecobalamina 1mg por comprimido.

Pesar um comprimido de mecobalamina e transferir para balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 10 mL de diluente e levar ao Vortex com agitações severas por 2 minutos. Diluir e aferir com o diluente para obter a concentração final no teste de doseamento de 0,02 mg/mL.

Solução amostra do medicamento já distribuído para venda de Mecobalamina 1mg por comprimido.

Pesar um comprimido de mecobalamina e transferir para balão volumétrico de 50 mL, adicionar cerca de 10 mL de diluente e levar ao Vortex com agitações severas por 2 minutos. Diluir e aferir com o diluente para obter a concentração final no teste de doseamento de 0,02 mg/mL.

Para o método de doseamento a ser testado na molécula de mecobalamina (vit. B12) serão preparadas três soluções amostras descritas, onde serão filtradas em filtro de Nylon 0,45 µm e cada uma destas soluções irão ser transferidas para 15 vials como especificado na tabela 02, onde ficaram em temperatura ambiente 25°C em bancada e em intervalos de 1 hora um destes Vials será injetado no CLAE. Pelo fato de mecobalamina ser uma molécula muito sensível a fatores externos como a luz, sua solução deve ser estocada em balões e vials âmbar, sem contato direto com a luz.

Tabela 02: Quantidade de Vials em relação ao tempo e diferentes concentrações de diluentes.

	D-Sorbitol a 0,50					D-Sorbitol a 1,00					D-Sorbitol a 2,00					Total de Vials
	g/L					g/L					g/L					
Tempo (Horas)	0	2	4	5	6	0	2	4	5	6	0	2	4	5	6	
Quantidade de Vials para cada tempo com suas respectivas soluções																
Matéria-prima	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
produto acabado ainda não comercializado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
medicamento já distribuído para venda	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15

As condições cromatográficas de trabalho para determinação de teor de mecobalamina consistem na temperatura do forno da coluna em 40°C, amostrador em 10°C, fluxo de trabalho de 1,5 mL/minuto, volume de injeção de 40 µL, comprimento de onda para detecção de 380 nm e tempo de corrida de 6 minutos.

A fase móvel é composta por um tampão 2,74 g NaH₂PO₄ · H₂O pH 3,5 com solução 10% de H₃PO₄, metanol e acetonitrila na proporção 70:15:15 (v/v), respectivamente com eluição isocrástica em um equipamento de marca Agilent de bomba quaternária. A fase estacionária consiste em uma coluna da marca Phenomenex Luna C18 250 mm x 4,6 mm 5 micras de classificação USP L1,

onde seu recheio apresenta grupos silanos octadecil (TMS) e grupos funcionais $(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ ligados à sílica, formando esta fase estacionária muito hidrofóbica, como visto na figura 07 (Phenomenex, 2024).



Figura 07: Recheio da fase estacionária da marca Phenomenex Luna C18.
Fonte: Phenomenex, 2024.

5. Resultados

Nesta pesquisa foram realizadas análises em concentrações 0,5 g/L, 1,0 g/L e 2,0 g/L de diluente D-Sorbitol, utilizadas nas soluções de matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg por comprimido e medicamento já distribuído para venda 1 mg por comprimido. Cada solução de mecobalamina, foram pesadas em triplicata para serem diluídas nas três concentrações do diluente e após, transferiu-se cada solução para 15 Vials âmbar totalizando 45 Vials para os três preparos de mecobalamina.

Após o preparo foram injetados imediatamente no CLAE, um Vial de cada concentração de diluente e amostra, sendo chamado de tempo zero/inicial. Os outros vials restantes foram colocados em bancada de trabalho com temperatura controlada de 25°C, onde em períodos de tempos de 2 horas, 4 horas, 5 horas e 6 horas cada vial de concentrações de diluentes e tipos de amostras foram submetidas à injeções no equipamento CLAE.

Após a injeção dos tempos citados acima, foi possível analisar os dados a partir da área das amostras de soluções de matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg por comprimido e medicamento já distribuído para venda 1 mg por comprimido em bancada com temperatura de 25°C.

Após o tratamento dos dados, foi possível analisar o decaimento de teor pelas áreas destas soluções obtidas em cada concentração de diluente. Ao analisar a figura 08 e tabela 01, é possível notar que em concentração de 0,50 g/L do diluente as áreas de mecobalamina, injetadas nos intervalos de tempo de 0 horas (inicial), 2 horas, 4 horas e 6 horas (final) de cada solução, apresentou decaimento gradativo e significativo de área, pois a solução de matéria-prima a

1% em tempo zero apresentou área de 108,03 mAU.s e após 6 horas em temperatura ambiente de 25°C sua área decaiu para 103,27 mAU.s. A solução de produto acabado ainda não comercializado 1 mg por comprimido, também atingiu decaimento de área em 0,5 g/L do diluente, pois sua área inicial foi de 103,93 mAU.s e na final obteve 98,39 mAU.s., já a solução MC obteve uma área inicial de 106,32 mAU.s e final de 102,48 mAU.s.

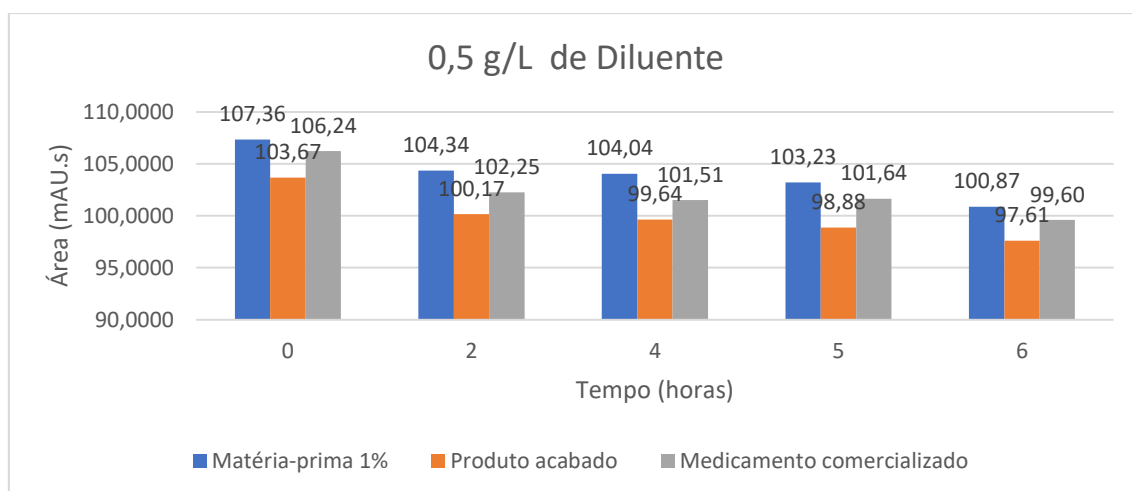


Figura 08: Dados das soluções de matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido e medicamento já distribuído para venda 1 mg/comprimido em exposição a temperatura de 25° C em bancada pelo período de zero a seis horas com diluente a 0,50 g/L. Fonte: autoria própria.

Tabela 01: Decaimento de mecobalamina com diluente 0,50 g/L em relação ao tempo zero.

Decaimento do diluente a 0,50 g/L					
	0 horas	2 horas	4 horas	5 horas	6 horas
Matéria-prima 1%	100%	97,19%	96,91%	96,16%	93,96%
Produto acabado	100%	96,62%	96,11%	95,37%	94,15%
Medicamento comercializado	100%	96,25%	95,55%	95,67%	93,75%

Em diluente de concentração 1,0 g/L de d-sorbitol, nota-se pela figura 09 e tabela 02, que as áreas de mecobalamina, injetadas nos intervalos de tempo de 0 horas (inicial), 2 horas, 4 horas e 6 horas (final) de cada solução, também obteve um decaimento de área, porém menor que a solução de diluente a 0,5

g/L. É possível analisar que a solução de matéria-prima a 1% em tempo zero obteve área de 111,24 mAU.s e após 6 horas em temperatura ambiente de 25°C sua área decaiu para 104,34 mAU.s, a solução de produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido em tempo inicial alcançou 105,34 mAU.s e na final obteve 103,01 mAU.s. de área e a solução MC apresentou área inicial de 98,65 mAU.s e final de 100,95 mAU.s.

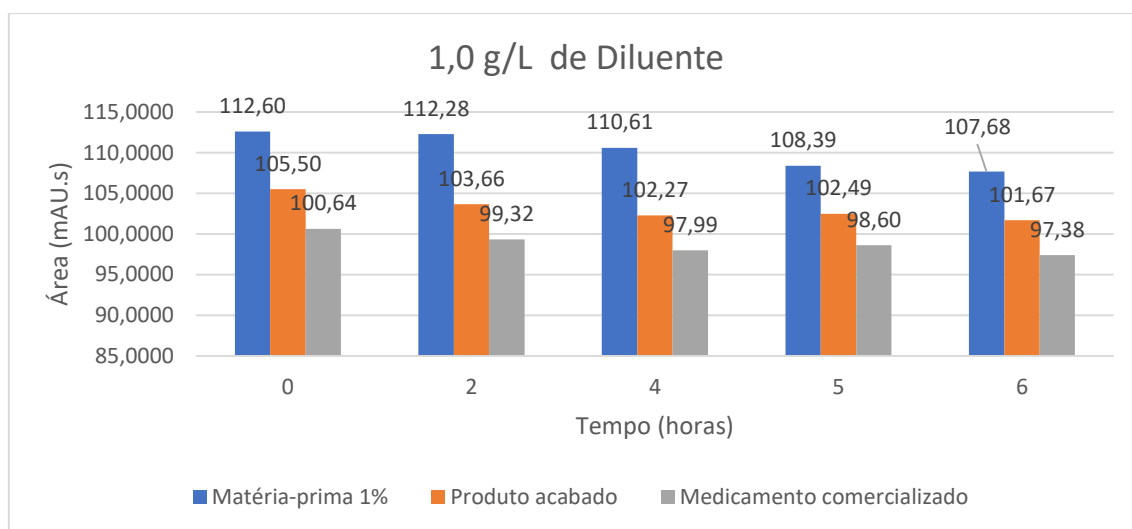


Figura 09: Dados das soluções de matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido e medicamento já distribuído para venda 1 mg/comprimido em exposição a temperatura de 25° C em bancada pelo período de zero a seis horas com diluente a 1,00 g/L. Fonte: autoria própria.

Tabela 02: Decaimento de mecobalamina com diluente 1,00 g/L em relação ao tempo zero.

Decaimento do diluente a 1,00 g/L					
	0 horas	2 horas	4 horas	5 horas	6 horas
Matéria-prima 1%	100%	99,72%	98,23%	96,26%	95,63%
Produto acabado	100%	98,26%	96,95%	97,15%	96,38%
Medicamento comercializado	100%	98,69%	97,37%	97,97%	96,76%

Analisando o diluente à 2,0 g/L de d-sorbitol, através da figura 10 e tabela 03, é observado que nas três soluções diferentes de amostras (matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido e

medicamento já distribuído para venda 1 mg/comprimido), suas áreas não variaram e não ocorreu decaimento ao longo de todo tempo de estudo.

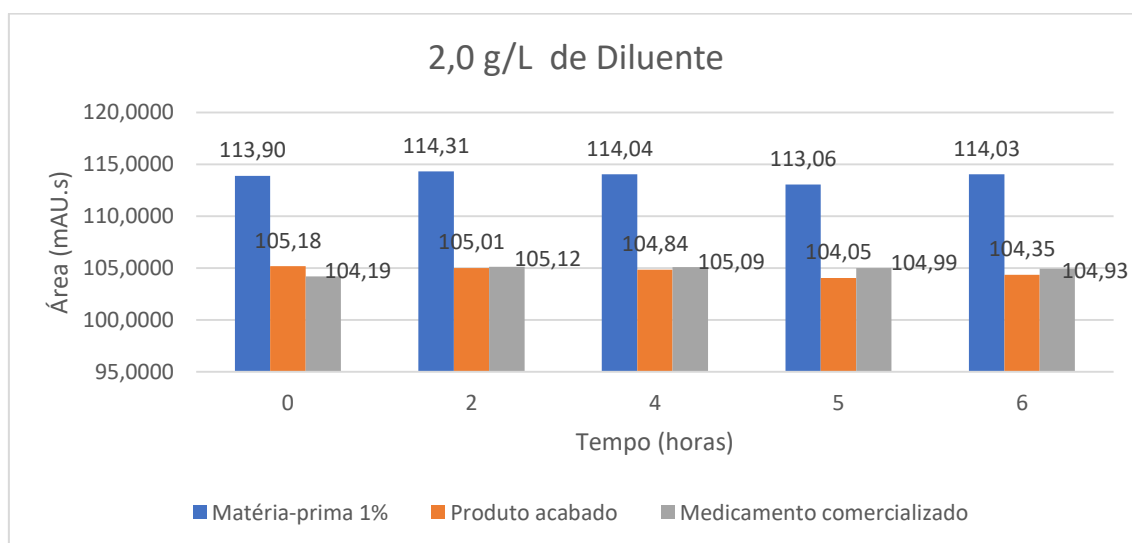


Figura 10: Dados das soluções de matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido e medicamento já distribuído para venda 1 mg/comprimido em exposição a temperatura de 25° C em bancada pelo período de zero a seis horas com diluente a 2,00 g/L. Fonte: autoria própria.

Tabela 03: Decaimento de mecobalamina com diluente 1,00 g/L em relação ao tempo zero.

Decaimento do diluente a 2,00 g/L					
	0 horas	2 horas	4 horas	5 horas	6 horas
Matéria-prima 1%	100%	100,36%	100,12%	99,27%	100,12%
Produto acabado	100%	99,83%	99,68%	98,92%	99,21%
Medicamento comercializado	100%	100,89%	100,86%	100,76%	100,71%

Ao comparar as áreas de mecobalamina nas três concentrações de diluente é possível observar que as soluções de matéria-prima a 1%, produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido e medicamento já distribuído para venda 1 mg/comprimido apresentam diferentes áreas logo, cada solução obteve diferente solubilização e é possível notar que a mesma aumenta de acordo com concentrações mais altas de d-sorbitol. Comparando a recuperação das soluções amostra no tempo final (6 horas) pelo inicial (0 horas)

para cada diluente através da figura 11, nota-se que apenas o diluente contendo 2,0 g/L de d-sorbitol conseguiu se manter em média 100% estável em todo o período de tempo analisado.

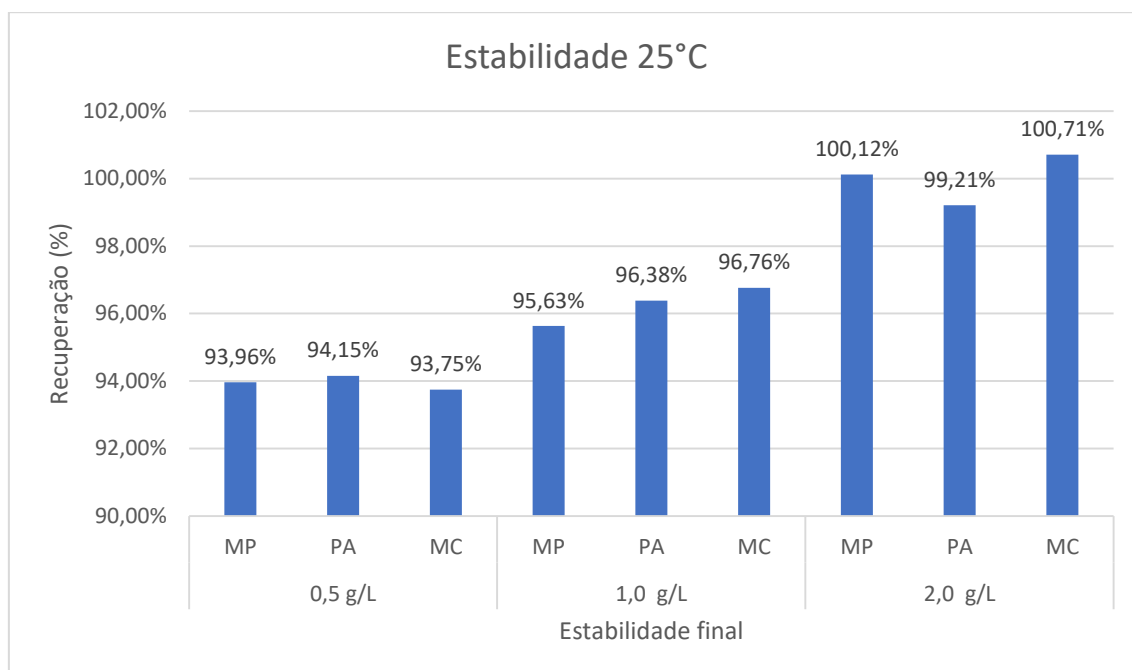


Figura 11: Relação entre a estabilidade final e inicial de Mecobalamina em porcentagem em relação as diferentes concentrações de diluentes. Fonte: autoria própria.

O diluente a 0,5 g/L de d-sorbitol apresentou recuperação média de 95% de mecobalamina em 6 horas, mantendo as mesmas em temperatura ambiente e o diluente a 1,0 g/L obteve média de 97% de recuperação em relação ao tempo final. A partir da figura 11 acima é possível notar que o melhor diluente ocorreu na concentração de 2,0 g/L do reagente d-sorbitol em água, para estabilizar mecobalamina em temperatura ambiente que simula uma bancada dos laboratórios em que a mesma será testada. Desta forma agora serão apresentados os testes da amostra em tempo zero horas deste mesmo diluente

após ser colocado em temperatura controlada de 10 °C no compartimento amostrador do CLAE e injetada de tempos em tempos.

O equipamento CLAE já estava em temperatura controlada de 10 °C, desta forma também foram realizados testes em tempo zero/inicial do diluente a 2,0 g/L e ocorreu o monitoramento das áreas desta amostra em tempos de 0 horas, 8 horas, 9 horas e 20 horas em 10° C.

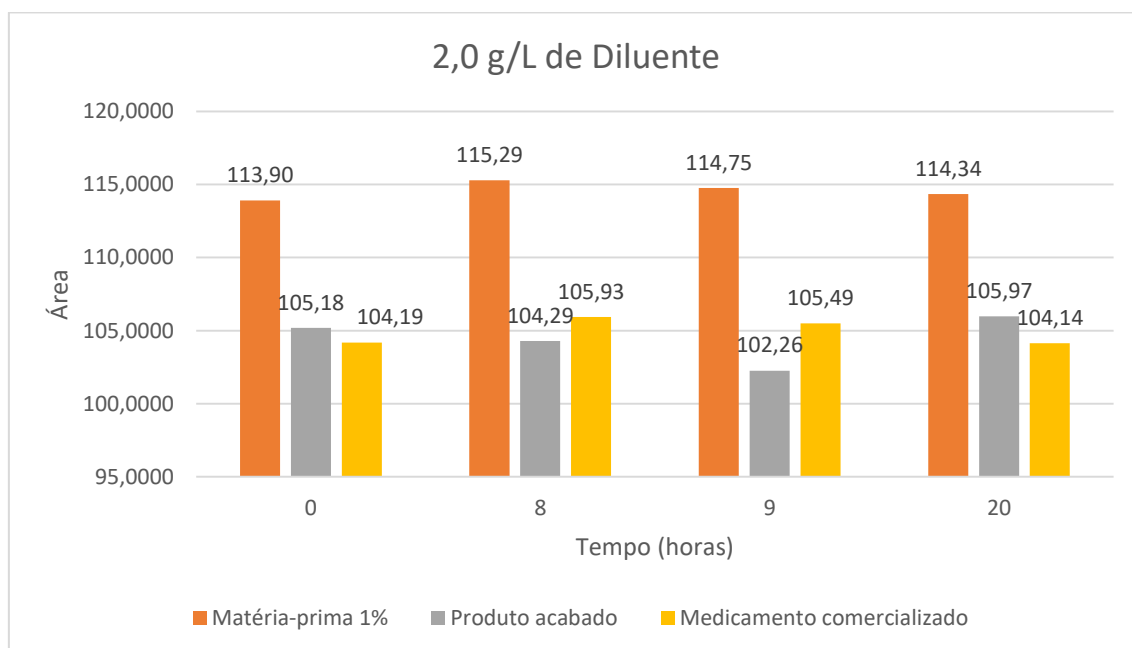


Figura 12: Diluente 2,0 g/L de d-sorbitol no CLAE com temperatura controlada de 10 °C. Fonte: autoria própria.

A partir da figura 12 é possível notar que desde o tempo de zero horas (inicial) até 20 horas (final), as soluções amostras desta vitamina se mantiveram estáveis obtendo praticamente a mesma área em todos os tempos apresentados.

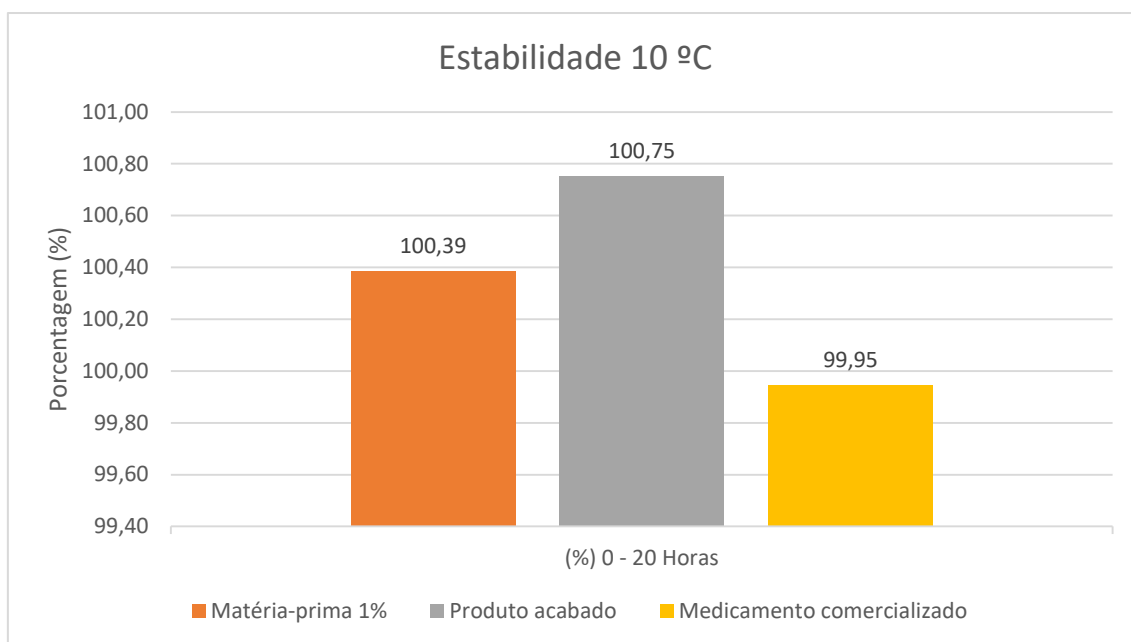


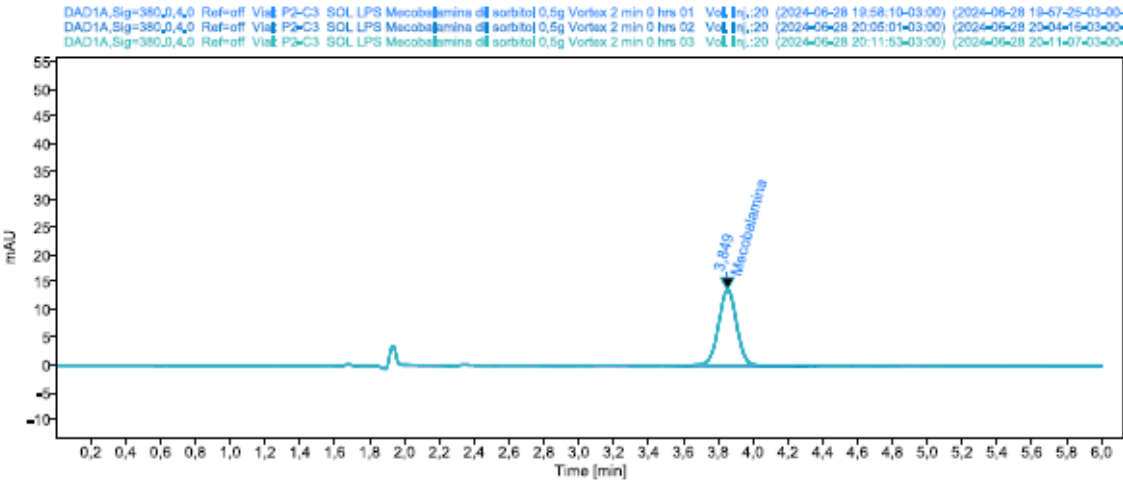
Figura 13: Relação entre a estabilidade final e inicial de Mecobalamina em porcentagem com temperatura controlada de 10 °C. Fonte: autoria própria.

Ao comparar somente o tempo inicial e o tempo final (figura 13), nota-se que para as soluções matéria-prima a 1% e produto acabado ainda não comercializado 1 mg/comprimido a variação não ultrapassou de $100 \pm 1,0 \%$ obtendo uma ótima estabilidade desta vitamina. A solução amostra MC conseguiu uma variação de $100 \pm 2,0 \%$. Apesar de a solução de medicamento já distribuído para venda 1 mg/comprimido não obter uma recuperação 100% em 20 horas dentro do equipamento com temperatura controlada, a amostra ainda foi estável, pelo fato de variar pouco em um longo período de tempo.

6. Discussão

No presente estudo foi pretendido demonstrar a estabilidade da vitamina B12 (mecobalamina) em solução utilizando diferentes concentrações do reagente D-sorbitol em temperatura controlada e quantificá-la pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Neste estudo foram utilizadas a matéria-prima de mecobalamina 1% estabilizada com fosfato de cálcio, um medicamento produto acabado ainda não comercializado e um medicamento já comercializado no mercado.

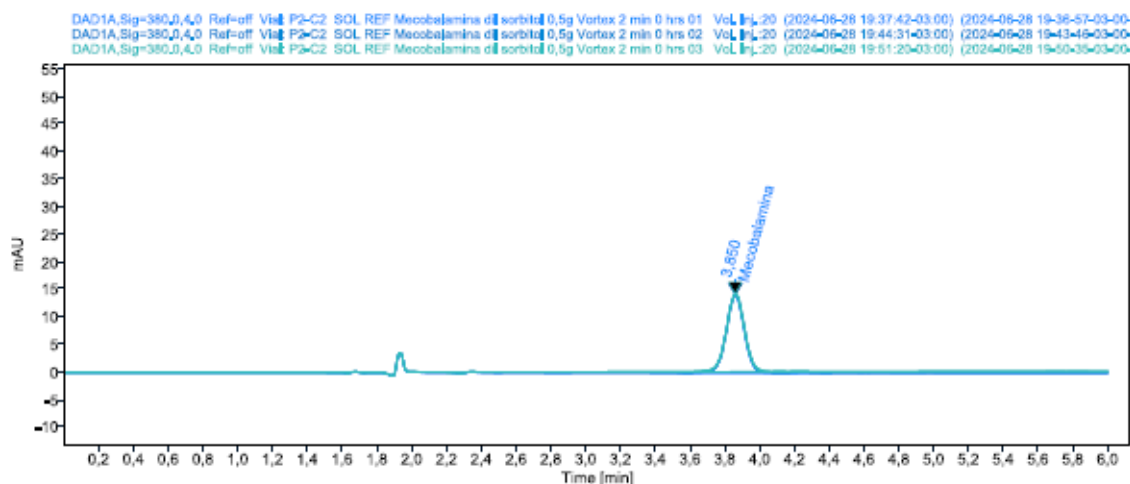
No método do equipamento CLAE, o tempo de corrida de cada injeção foi de 6 minutos, onde mecobalamina obteve tempo de retenção de 3,84 minutos, sua detecção ocorreu em 380 nm, volume de injeção na coluna de 40 µL, utilizando como fase móvel uma mistura de tampão 2,74 g de NaH₂PO₄ pH 3,5, metanol e acetonitrila na proporção 70:15:15 (v/v), respectivamente, a fase estacionária utilizada foi uma coluna do tipo L1 da marca Phenomenex Luna C18 250 mm x 4,6 mm 5 µm, fluxo de 1,5 mL/minutos, temperatura do forno da coluna em 40 °C e temperatura do compartimento de amostrador de amostras em 10 °C, a partir da figura 14 é possível visualizar as soluções das três apresentações de mecobalamina testadas com as três concentrações de diluente do reagente D-Sorbitol no tempo inicial/zero horas, o restante dos cromatogramas estarão nos anexos.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecoba[amina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	103,8802	6569	1,03	
SOL LPS Mecoba[amina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	103,9697	6535	1,02	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	103,1626	6564	0,98	
Min	3,85	103,1626	6535	0,98	
Max	3,85	103,9697	6569	1,03	
Average	3,85	103,6709	6556	1,01	
RSD	0,04	0,43	0,28	2,72	

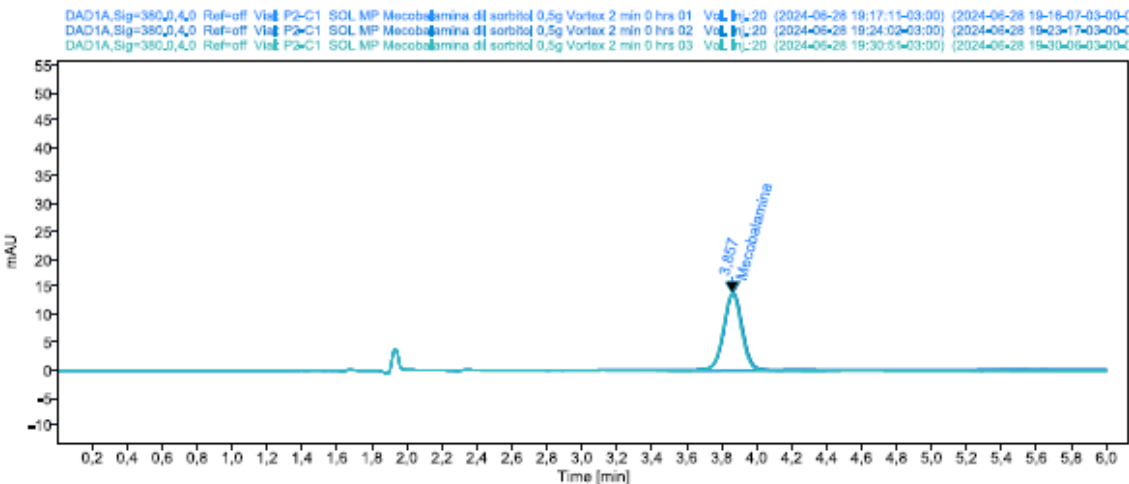
(A)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	106,5603	6542	0,98	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,86	106,2004	6536	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	105,9520	6550	0,98	
Min	3,85	105,9520	6536	0,98	
Max	3,86	106,5603	6550	0,99	
Average	3,85	106,2375	6543	0,98	
RSD	0,11	0,29	0,11	0,50	

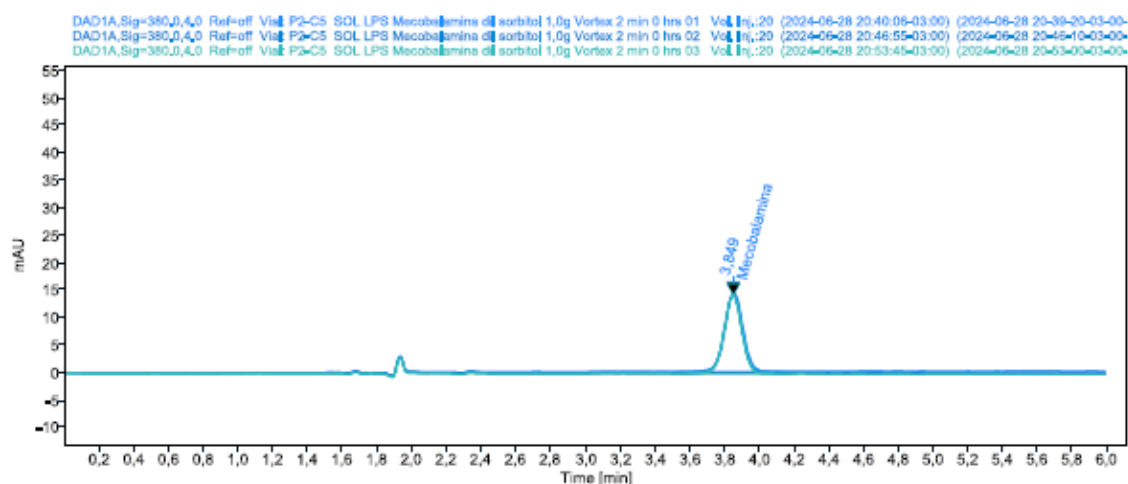
(B)



Nome: Mecobalaminina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalaminina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,86	107,5764	6509	0,98	
SOL MP Mecobalaminina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,86	107,0286	6500	1,00	
SOL MP Mecobalaminina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	107,4627	6519	1,02	
Min	3,85	107,0286	6500	0,98	
Max	3,86	107,5764	6519	1,02	
Average	3,86	107,3559	6509	1,00	
RSD	0,15	0,27	0,14	2,01	

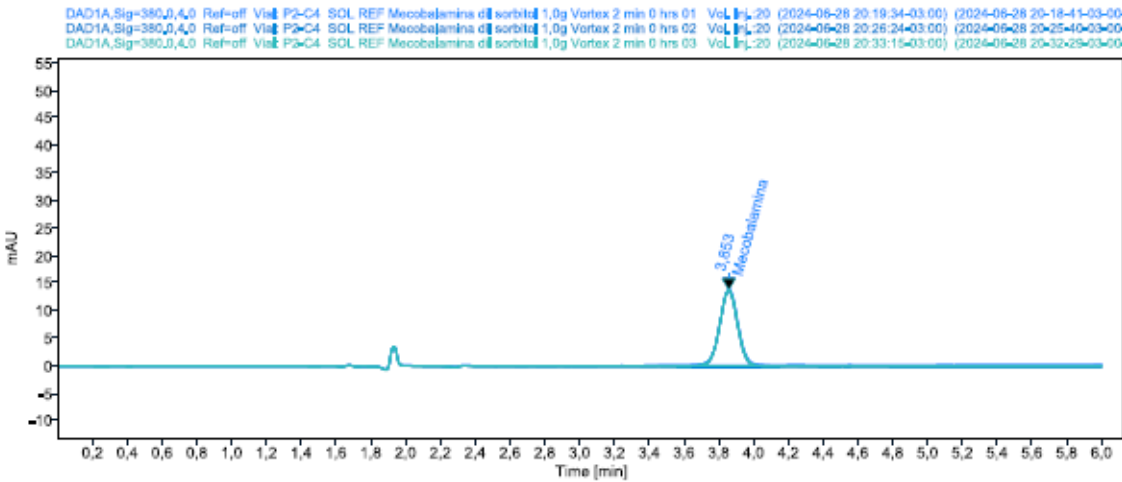
(C)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	105,7532	6560	0,99	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	105,7032	6562	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	105,0340	6592	0,99	
Min	3,85	105,0340	6560	0,99	
Max	3,85	105,7532	6592	1,00	
Average	3,85	105,4968	6572	0,99	
RSD	0,00	0,38	0,27	0,62	

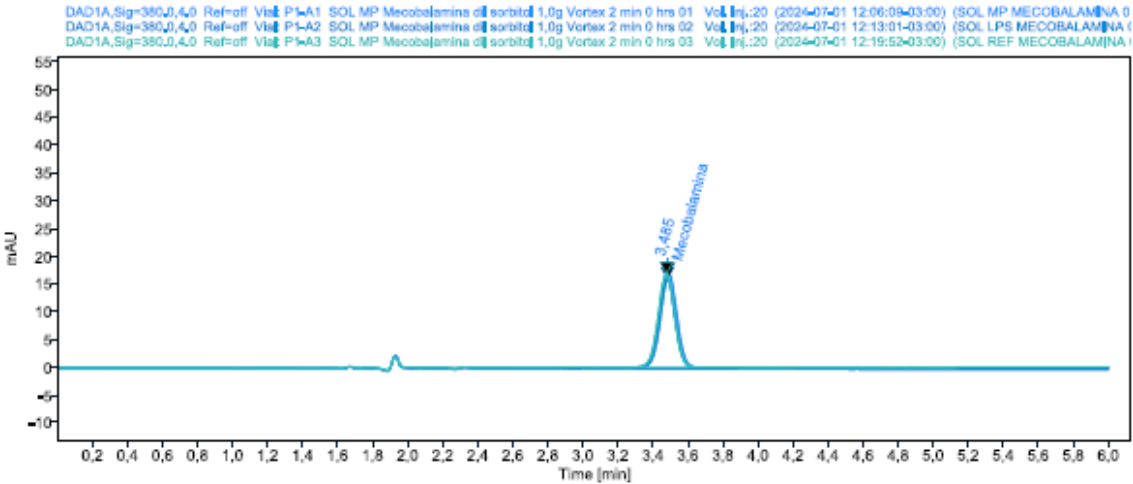
(D)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	100,7595	6593	1,01	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	100,5974	6599	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	100,5658	6593	1,00	
Min	3,85	100,5658	6593	1,00	
Max	3,85	100,7595	6599	1,02	
Average	3,85	100,6409	6595	1,01	
RSD	0,02	0,10	0,05	0,75	

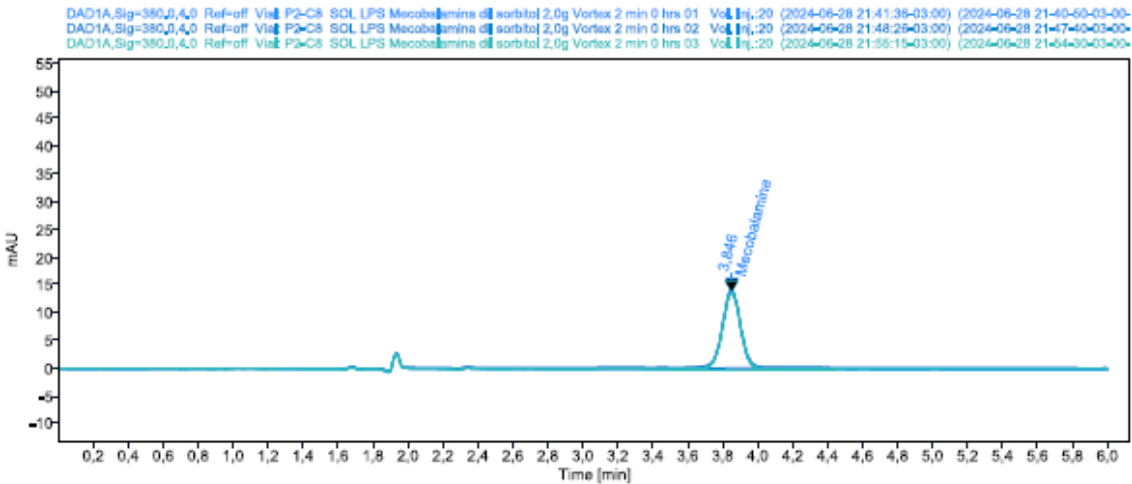
(E)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,48	112,4625	6447	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,47	112,5479	6528	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,49	112,7921	6492	1,02	
Min	3,47	112,4625	6447	1,00	
Max	3,49	112,7921	6528	1,02	
Average	3,48	112,6008	6489	1,01	
RSD	0,18	0,15	0,63	1,44	

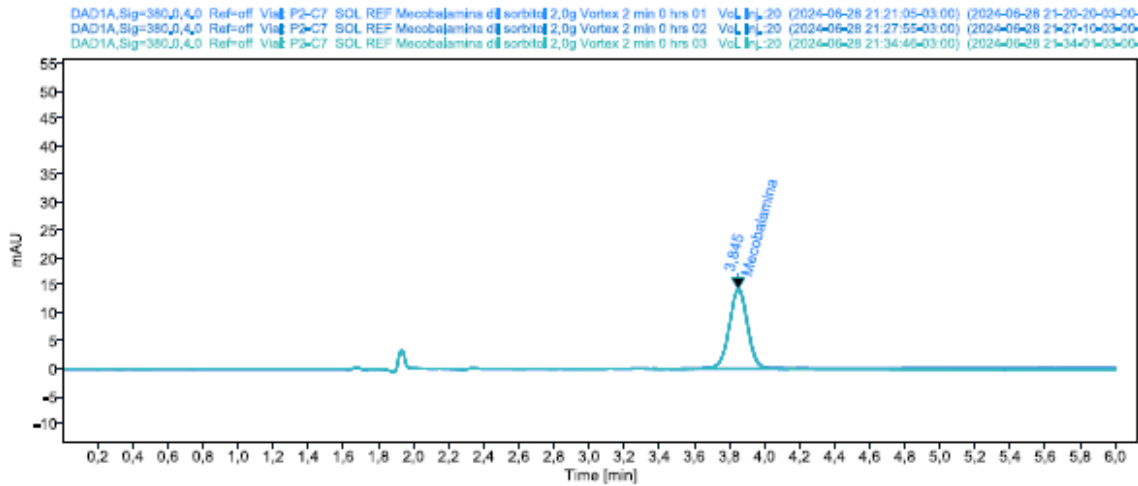
(F)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	105,0448	6630	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,84	105,1460	6548	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	105,3524	6559	1,00	
Min	3,84	105,0448	6548	0,98	
Max	3,85	105,3524	6630	1,00	
Average	3,84	105,1811	6579	0,99	
RSD	0,04	0,15	0,68	1,13	

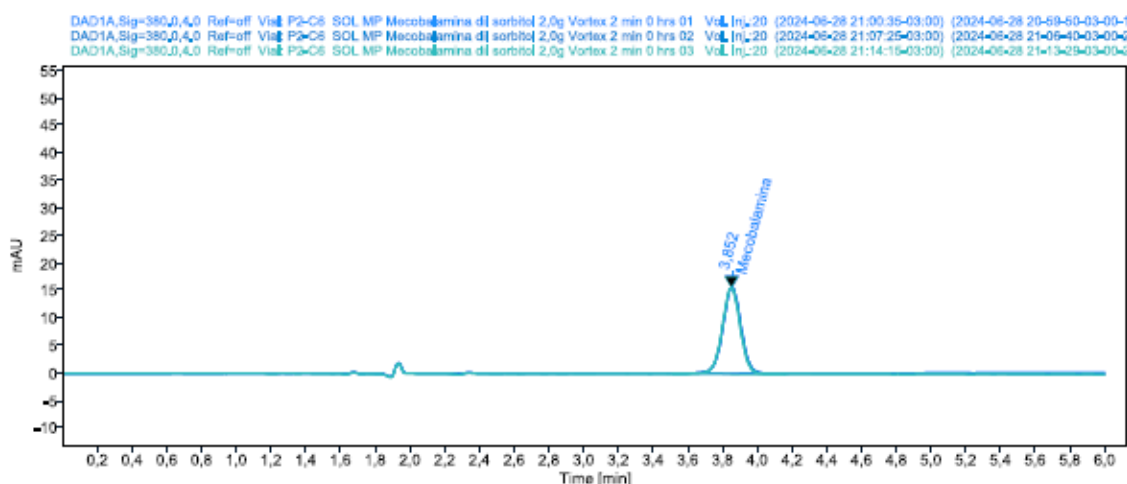
(G)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,84	105,0864	6548	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	103,8999	6631	1,03	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	103,5890	6616	1,01	
Min	3,84	103,5890	6548	1,01	
Max	3,85	105,0864	6631	1,03	
Average	3,85	104,1917	6598	1,02	
RSD	0,02	0,76	0,67	1,14	

(H)



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	113,5064	6609	0,99	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,84	113,6324	6609	0,98	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,84	114,5568	6584	1,00	
Min	3,84	113,5064	6584	0,98	
Max	3,85	114,5568	6609	1,00	
Average	3,85	113,8985	6601	0,99	
RSD	0,10	0,50	0,22	1,23	

(I)

Figura 14: Cromatogramas de mecobalamina no tempo zero horas, produto ainda não comercializado em 0,5 g/L de diluente (A), medicamento já distribuído para venda em 0,5 g/L de diluente (B), matéria-prima em 0,5 g/L de diluente (C). produto ainda não comercializado em 1,0 g/L de diluente (D), medicamento já distribuído para venda em 1,0 g/L de diluente (E), matéria-prima em 1,0 g/L de diluente (F). produto ainda não comercializado em 2,0 g/L de diluente (G), medicamento já distribuído para venda em 2,0 g/L de diluente (H), matéria-prima em 2,0 g/L de diluente (I).

A partir da figura 14 foi possível observar o pico referente a mecobalamina no tempo zero horas para a MP, PA e MC para as concentrações de 0,5 g/L, 1,0 g/L e 2,0 g/L do diluente D-Sorbitol, onde as amostras foram preparadas e imediatamente injetadas no equipamento CLAE. É possível observar também o tempo de retenção desta vitamina, a quantidade de pratos teóricos demonstrando a boa eficiência da coluna e a assimetria do pico, é observado também o desvio padrão relativo (RSD) entre as três injeções do mesmo Vial, nota-se que o RSD

não ultrapassa o critério de 2,00, tornando as amostras em triplicatas aprovadas neste parâmetro.

No presente estudo, observa-se que o diluente de concentração 0,50 g/L de D-sorbitol não atingiu estabilidade para a molécula de mecobalamina logo no tempo de 2 horas, ocorrendo também um decaimento significativo de em média 94,73% de área para as apresentações de MP, PA e MC entre o tempo inicial e seis horas após. O diluente a 1,00 g/L de D-sorbitol conseguiu estabilizar as soluções de matéria-prima até o tempo de 4 horas e após ocorre decaimento de sua área. Já o diluente a 2,00 g/L resultou numa melhora significativa em função do tempo de sua estabilidade nas formas de MP, PA e MC apresentando uma recuperação média de 99,55% entre as três apresentações no intervalo de tempo de zero a seis horas.

Em temperatura controlada de 10 °C, no compartimento de amostras do equipamento CLAE, foram injetadas as três apresentações da molécula de mecobalamina, apenas na concentração 2,0 g/L do reagente D-Sorbitol, visto que em temperatura controlada de 25° C (temperatura de bancada) está foi a concentração que melhor estabilizou esta vitamina. Ao analisar os dados obtidos conclui-se que esta vitamina é estável por 20 horas nas soluções de matéria-prima, produto acabado e medicamento comercializado com recuperação média de 99,48%, trazendo um impacto positivo para implementação deste método nas rotinas laboratoriais.

A estabilidade de mecobalamina foi estudada por Barr et al. (1957) onde demonstrou em seu estudo que a molécula de D-sorbitol consegue estabilizar a mecobalamina através da redução da água livre, que proporciona a hidrólise desta vitamina fazendo com que a mesma sofra degradação, neste estudo os

resultados obtidos indicam que em maiores concentrações deste diluente D-sorbitol, a estabilização de mecobalamina em função de tempo e agentes externos tende a aumentar. O estudo de Lie et al. (2018) realizou testes com a molécula de D-sorbitol em concentração de 1,0 g/L, para também melhorar a estabilidade da Mecobalamina em alimentos, seu estudo demonstrou efeito de melhora significativa em sua estabilidade quando exposta as condições de estresse, como temperatura, pH, luz, entre outros. Neste estudo foi comprovado que quanto maior a concentração do reagente D-Sorbitol, melhor a estabilidade a vitamina B12.

Ao realizar pesquisas sobre os grupos funcionais da molécula de mecobalamina que poderiam reagir com a água, BAERTSCHI, Steven, et; al; pode notar que os grupamentos de amidas primárias apresentam forte reação com a água formando ácido carboxílico é um grupamento amina, nas figuras 15 e 16 está descrito o mecanismo de ação.

Grupo Reativo: Amida primária

Condição: Água

Reação:

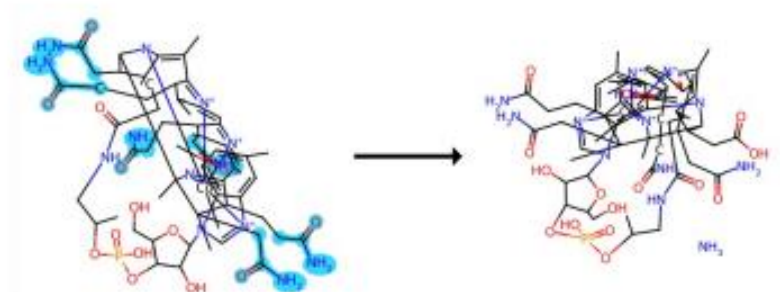


Figura 15: Grupamento reativo das amidas primárias na molécula de mecobalamina.

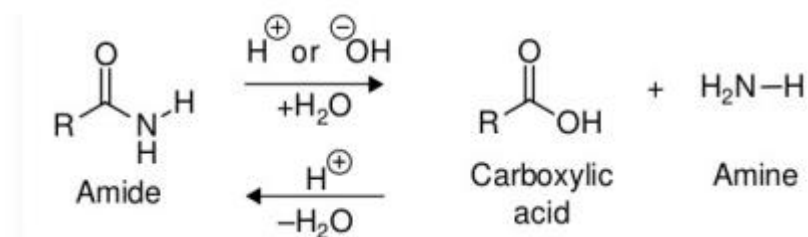
Mecanismo Geral:

Figura 16: Mecanismo geral da reação.

O efeito de estabilidade de mecobalamina comprovado neste trabalho poderá ser utilizado posteriormente para quantificar esta vitamina em indústrias farmacêuticas, produção de suplementos alimentares de alta qualidade e para novos estudos de estabilidade desta molécula ou até mesmo de outras vitaminas. Em resumo, este estudo fornece evidências robustas de que o derivado de açúcar, D-sorbitol é eficaz em estabilizar a molécula da vitamina B12, mecobalamina quando em maior concentração de 2,0 g/L analisadas em equipamentos CLAE com tempo de corrida de cada injeção de amostra de 6 minutos, oferecendo uma nova abordagem promissora para pesquisadores que buscam controlar a degradação da molécula de mecobalamina.

7. Conclusão

Os dados apresentados nesta pesquisa revelam que o reagente D-sorbitol é um ótimo estabilizante para as soluções da vitamina B12, mecobalamina, deste modo o mesmo consegue proteger a molécula desta vitamina impedindo que a mesma sofra algum tipo de interferência externa, onde as ligações de hidrogênio de D-sorbitol reagem com o meio externo. Ao realizar testes com as três concentrações deste diluente foi possível concluir que a concentração que melhor estabilizou esta molécula foi a mais concentrada (2,0 g/L), que conseguiu ser estável por 6 horas em temperatura controlada de 25 °C, que simula a bancada neste tempo que é o horário de um turno de trabalho. Este reagente também conseguiu estabilizar a amostra por 20 horas quando no equipamento CLAE com temperatura controlada de 10 °C.

8. Referências Bibliográficas

RUBERT, Aline et al. Vitaminas Do Complexo B: Uma Breve Revisão. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 7, n. 1, p. 30-45, 2018. Disponível em: <<https://Core.Ac.Uk/Download/Pdf/228508153.Pdf>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

CORREIA, Laura. FARAONI, Aurélia. PINHEIRO-SANT'ANA, Helena. Efeitos do Processamento Industrial de Alimentos Sobre a Estabilidade de Vitaminas. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19 n.1, p.83-95, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/49599789_Efeitos_do_processamento_industrial_de_alimentos_sobre_a_estabilidade_de_vitaminas>. Acesso em: 03 ago. 2024.

GAZONI, Fernanda. MALEZAN, Willian. SANTOS, Fânia. **O uso de vitaminas do complexo B em terapêutica analgésica**, São Paulo, v.17, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rdor/a/kT5mLw4Y4HMJtxYzkgH86XD/?page=2&q=alwaysfit%3Fpost_type%3Dproduct?pr_prod_strat=description&pr_rec_id=bef909fe2&pr_rec_pid=7693212451067&pr_ref_pid=7693137641723&pr_seq=uniform%3Ffeed%3Drss2&q=alwaysfit%3Fpost_type%3Dproduct>. Acesso em: 03 ago. 2024.

ZHANG Yi-Fei, NING, Guang. Mecobalamin, **Expert Opinion on Investigational Drugs**, China, v.17 n.6 p.953-964, 2008. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/13543784.17.6.953>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

SAWANGJIT, Ratree, et al. Efficacy and Safety of Mecobalamin on Peripheral Neuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, Tailândia, v.26 n.12, 2020. Disponível em: <<https://liebertpub.com/doi/abs/10.1089/acm.2020.0068>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

BARRIOS Mareila; HERNANDEZ, Irma; GOMEZ, Hortensia. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter**, Ciudad de la Habana, v. 15, n. 3, p. 159-174, dic. 1999. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02891999000300001&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 03 ago. 2024.

POONGOTHAI, S; ILAVARASAN, R; KARRUNAKARAN, C.M. Simultaneous And Accurate Determination Of Vitamins B1, B6, B12 And Alphalipoic Acid In Multivitamin Capsule By Reverse–Phase High Performance Liquid Chromatographic Method, **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, India, v.2, n.4, p. 133-139, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Ilavarasan-Raju/publication/285538678_Simultaneous_and_accurate_determination_of_vitamins_B1_B6_B12_and_alpha-

lipoic_acid_in_multivitamin_capsule_by_reverse-phase_high_performance_liquid_chromatographic_method/links/5c35d50992851c22a3666259/Simultaneous-and-accurate-determination-of-vitamins-B1-B6-B12-and-alpha-lipoic-acid-in-multivitamin-capsule-by-reverse-phase-high-performance-liquid-chromatographic-method.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2024.

CARVALHO. A.J.P. Implementação e Validação de um Método de Pesquisa e Quantificação de Vitamina E por HPLC. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Novo de Lisboa, Portugal, 2014. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/157629409.pdf>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

Agilent Technologies. Performance robusta, LC rápida e com confiança. Estados Unidos. 2016. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-7435PTBR.pdf>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

Brasil. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

ABREU, J. C. Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a Bromoprida e seus produtos de degradação aplicando princípios de *Analytical Quality by Design*. 2020. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química, USP 2020. Disponível em:

<<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-08112021-165735/pt-br.php>>. Acesso em: 03 ago. 2024.

Brasil. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 200, de 26 de dezembro de 2017.

BAAR M., KOHN R. S, TICE L.F. The Effect of Various Sugars and Polyols on the Stability of Vitamin B12. Journal of the American Pharmaceutical Association, v. 46, nº 11, p. 650-652, nov. de 1957.

LIE, Andrew H., HIOE-CHANDRA Maria V., e ARCOT Jayashree. Sorbitol Enhances the Physicochemical Stability of B12 Vitamers. Int. J. Vitam Nutr. Res, p. 1-9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000578>>. Acesso em: 03 de ago. de 2024.

NUTRI-FACTS. Vitamina B12 RESUMEN Introdução. DSM Nutritional Products Europe Ltd, Nutrição Humana e Saúde, 2009. p. 1–3. Disponível em: <www.nutri-facts.org>. Acesso em: 29 de nov. de 2024.

VANNUCCHI, Helio. Cobalamina (Vitamina B 12). Instituto Internacional de Ciências da Vida Do Brasil, p. 1–24, 2010. Disponível em: <<https://www.mendeley.com/catalogue/094fc0b3-395e-30b2-a596-824a71720ea1/>>. Acesso em: 29 de nov. de 2024.

VIANA, A. da S. T. .; SANTOS, L. S. dos; PASQUALOTTO, M. F.; FERREIRA , T. R. L. .; PLACIDO, G. R. . **Did you know that a lack of vitamin B12 can trigger neurological diseases?. Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e43311326712, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i3.26712. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/26712>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

ROGEL, Antônio. **Nitrogen-Fixing Nodules with Ensiferadhaerens Harboring Rhizobium tropici Symbiotic Plasmids**. 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3264–3268.2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.67.7.3264-3268.2001>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

ARAUJO Lorena, et, al. **Medicamento genérico no Brasil: panorama, histórico e legislação**. Rev Panam Salud Publica 28(6), 2010. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2010.v28n6/480-492/pt>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

LIU, Yongheng, et.al. **Vitamin B12 synthesis in Ensifer Adhaerens casida A**. 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-023-02939-5#citeas>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

BRASIL. **Medicamentos genéricos**. 2024. Disponível em:
 <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/genericos>>. Acesso
 em: 29 de nov. 2024.

UNESP. **Cromatografia Líquida**. 2024. Disponível em:
 <<https://ceatox.ibb.unesp.br/padrao.php?id=15>>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

BRASIL. **Normas regulatórias da Anvisa**. 2024. Disponível em:
 <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6485886/IN_281_2024_.pdf/f3273af0-89eb-488c-a81d-0844d4819018>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

SÃO PAULO. **Suplementos alimentares**. 2021. Disponível em:
 <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/Suplementos_Alimentares_Manual_Covisa.pdf>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

USP. **Methylcobalamin**. 2024. Disponível em:
 <https://doi.org/10.31003/USPNF_M7768_05_01>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

MARTINS, Cláudia; et. al. **Solubilidade das substâncias orgânicas**.
 2013. Disponível em:
 <<https://www.scielo.br/j/qn/a/9q5g6jWWTM987mDqVFjnSDp/?lang=pt#>>.
 Acesso em: 29 de nov. 2024.

RIBEIRO, O. F e ACHÉ, Lucia. **Sobre a estabilidade da vitamina B, em
 soluções para uso hipodérmico**. 1945. Disponível em:

<<https://www.revistas.usp.br/rfmvusp/article/view/62145/66284>>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

INFINITY PHARMA. **Sorbitol**. 2022. Disponível em: <<https://www.infinitypharma.com.br/wp-content/uploads/2023/06/Sorbitol-po.pdf>>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

CPT. **Saúde: conheça as vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis**. 2024. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/saude/conheca-as-vitaminas-hidrossolueis-e-lipossolueis>>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

Waters. 2024. Disponível em: <<https://www.waters.com/nextgen/br/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/how-does-high-performance-liquid-chromatography-work.html>>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

Phenomenex. 2024. Disponível em: <https://www.phenomenex.com/products/luna-hplc-column/luna-c18-2?srsId=AfmBOoqC_8Ld5ui4cAVwqFygXMH6AskB0NHGWfZxPxtfnH-OO121hqU9>. Acesso em: 29 de nov. 2024.

Hebei Huarong Pharmaceutical Co. Ltd. **Common Technical Document for Mecobalamin**. China. Maio de 2023.

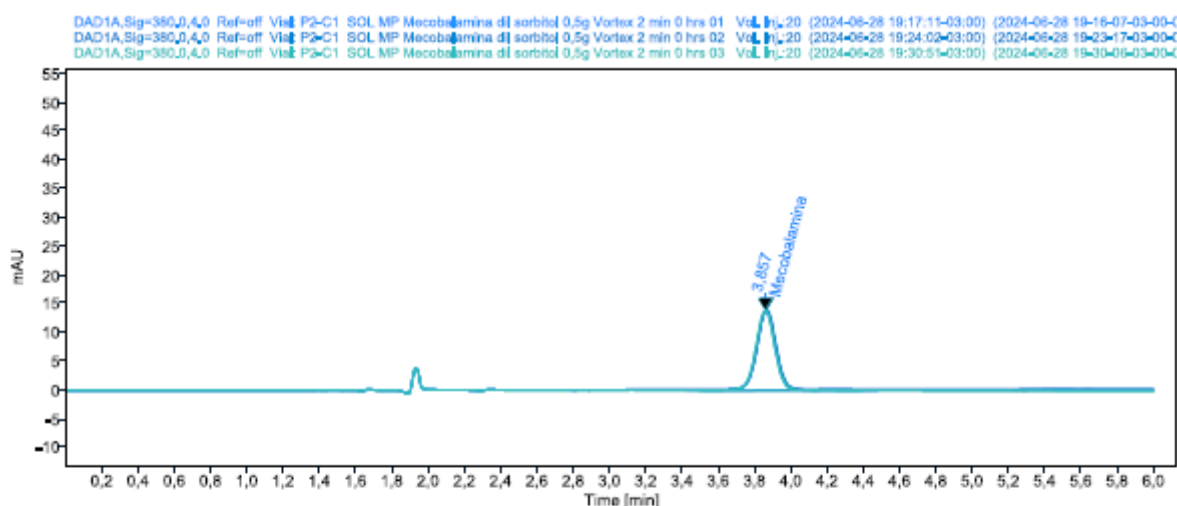
BAERTSCHI, Steven W.; ALSANTE, Karen M.; REED, Robert A. (Ed.).
Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation. CRC Press, 2016.
Pages: 55-59.

BAERTSCHI, Steven W.; ALSANTE, Karen M.; REED, Robert A. (Ed.).
Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation. CRC Press,
2016. Pages: 55-59.

9. Anexos

9.1. Anexo I – Relatório de mecobalamina em matéria-prima nas diferentes concentrações do diluente.

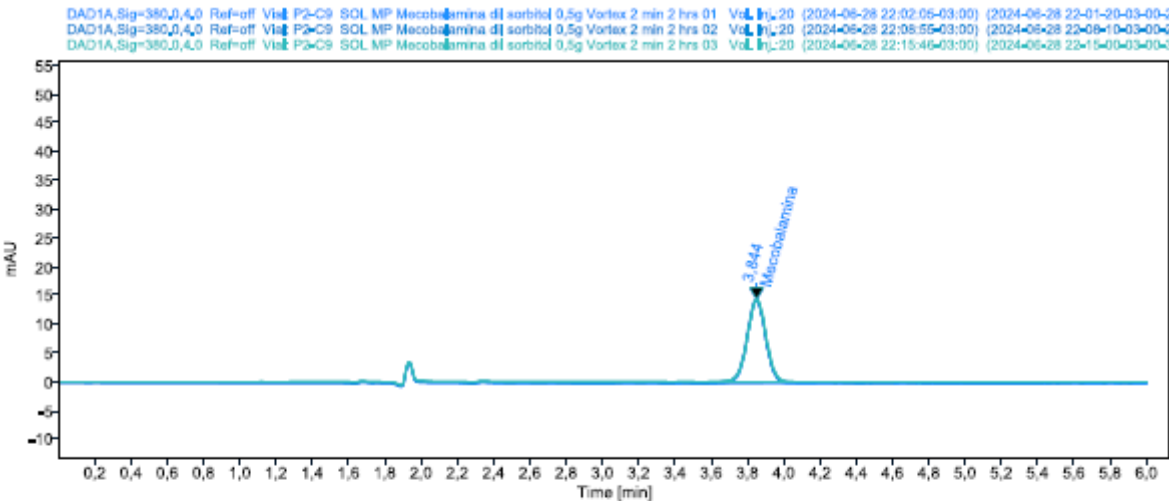
Mecobalamina MP Diluente 0,5 g/L – 0 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,86	107,5764	6509	0,98	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,86	107,0286	6500	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	107,4627	6519	1,02	
Min	3,85	107,0286	6500	0,98	
Max	3,86	107,5764	6519	1,02	
Average	3,86	107,3559	6509	1,00	
RSD	0,15	0,27	0,14	2,01	

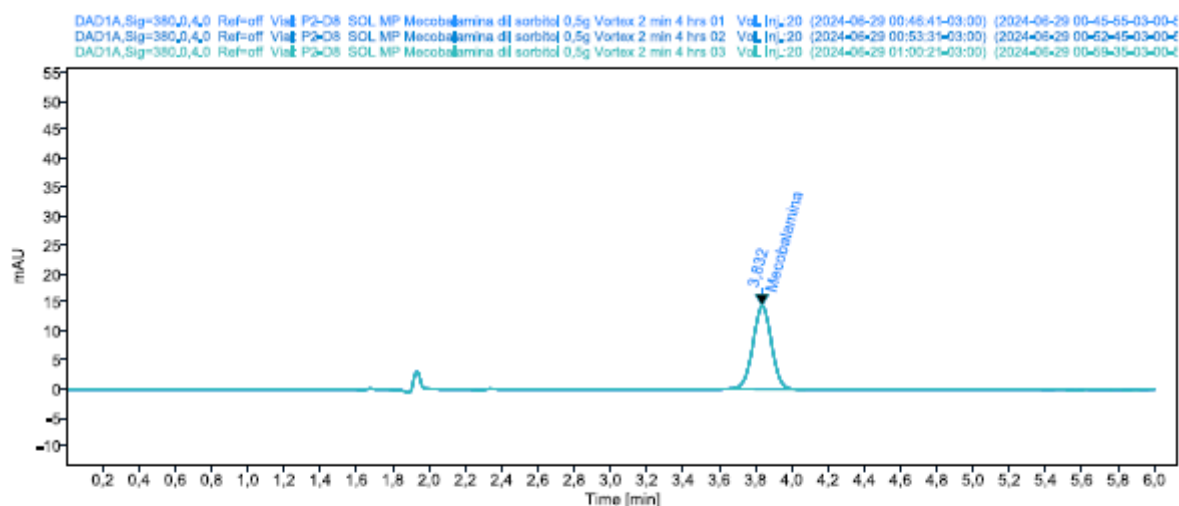
Mecobalamina MP Diluente 0,5 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina di[sorbitol] 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	104,3664	6590	1,01	
SOL MP Mecobalamina di[sorbitol] 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,84	104,1989	6608	0,99	
SOL MP Mecobalamina di[sorbitol] 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,84	104,4676	6578	1,02	
Min	3,84	104,1989	6578	0,99	
Max	3,84	104,4676	6608	1,02	
Average	3,84	104,3443	6592	1,01	
RSD	0,00	0,13	0,23	1,58	

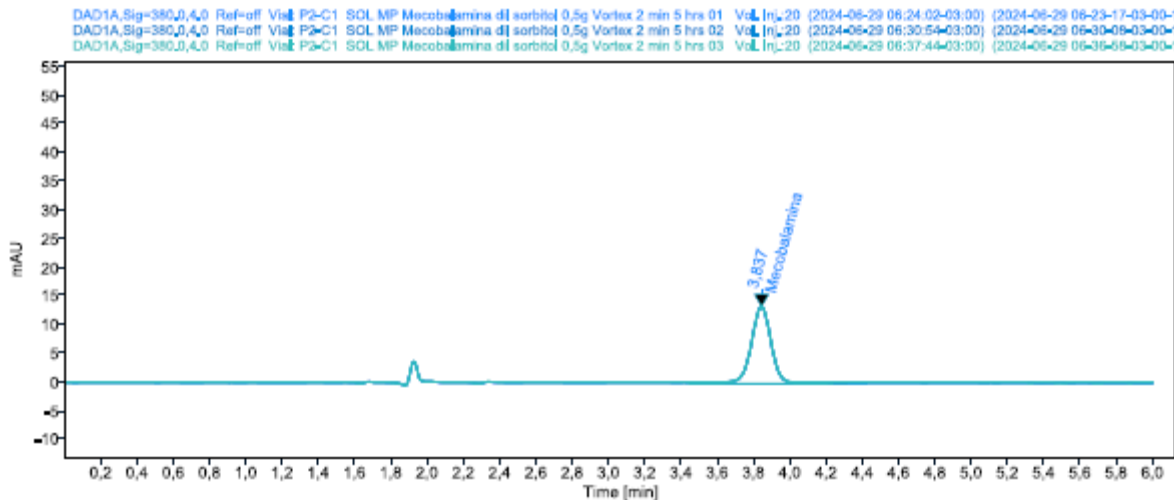
Mecobalamina MP Diluente 0,5 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,83	104,3235	6600	1,02	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,83	104,0126	6604	1,00	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	103,7891	6599	1,02	
Min	3,83	103,7891	6599	1,00	
Max	3,83	104,3235	6604	1,02	
Average	3,83	104,0417	6601	1,01	
RSD	0,02	0,26	0,04	0,77	

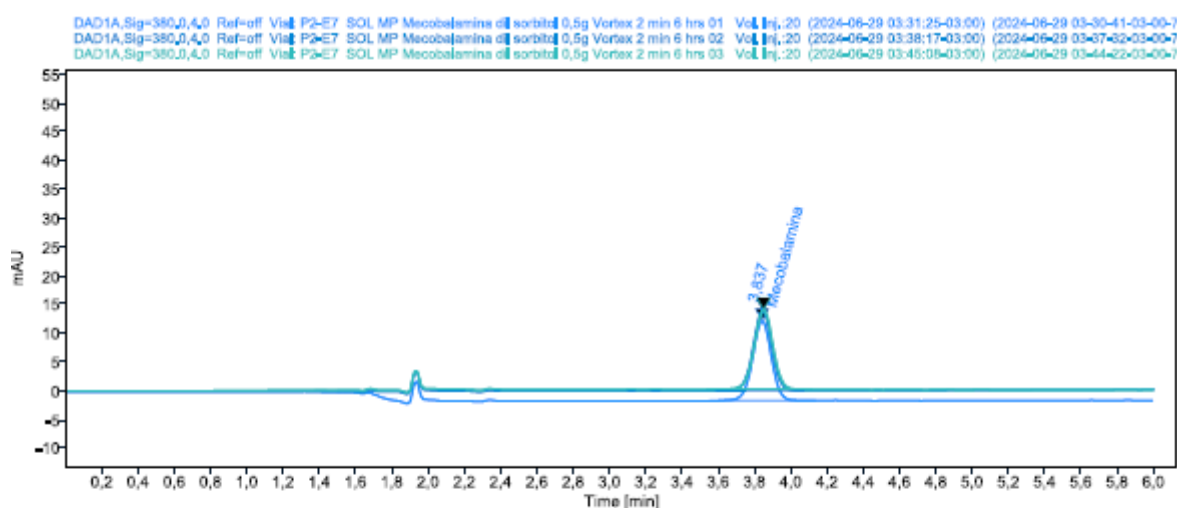
Mecobalamina MP Diluente 0,5 g/L – 5 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	103,0845	6289	0,99	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,84	103,0020	6290	0,99	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	103,6041	6235	1,00	
Min	3,84	103,0020	6235	0,99	
Max	3,84	103,6041	6290	1,00	
Average	3,84	103,2302	6272	0,99	
RSD	0,01	0,32	0,50	0,60	

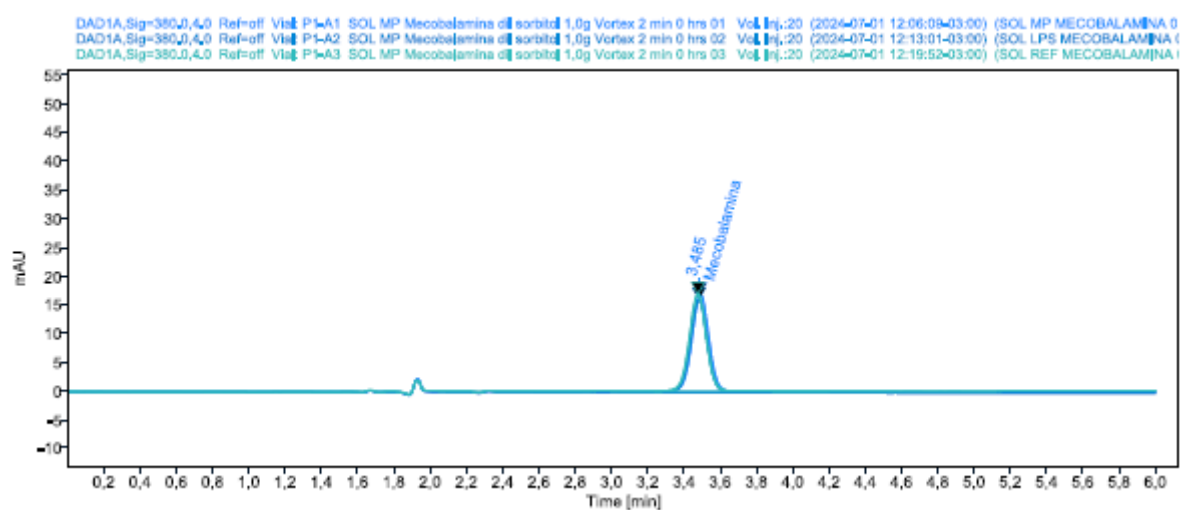
Mecobalamina MP Diluente 0,5 g/L – 6 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	100,5937	6531	1,01	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	101,0992	6531	0,98	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,85	100,9085	6544	1,00	
Min	3,84	100,5937	6531	0,98	
Max	3,85	101,0992	6544	1,01	
Average	3,84	100,8671	6535	1,00	
RSD	0,11	0,25	0,12	1,22	

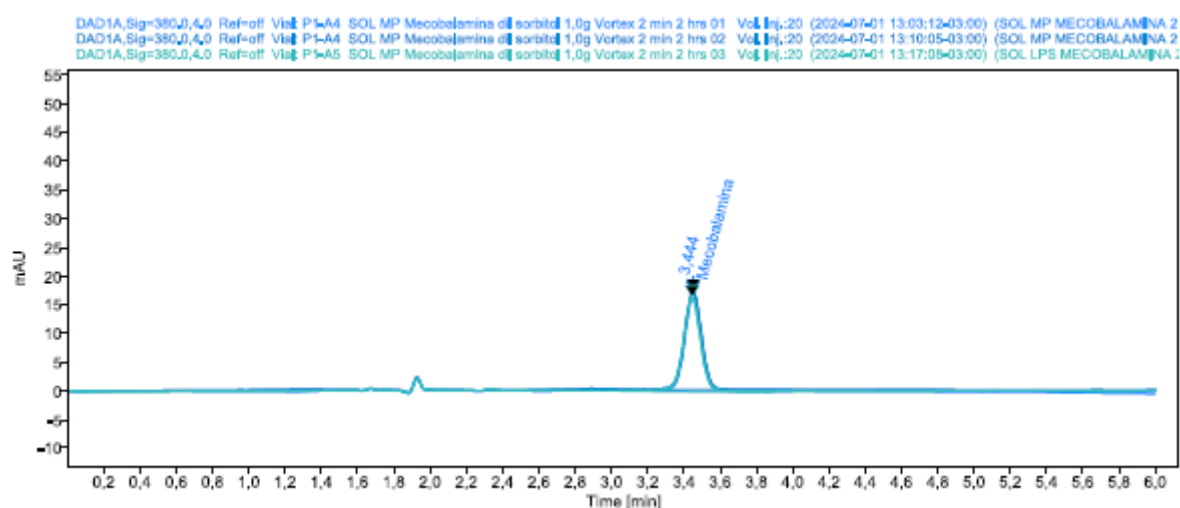
Mecobalamina MP Diluente 1,0 g/L – 0 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,48	112,4625	6447	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,47	112,5479	6528	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,49	112,7921	6492	1,02	
Min	3,47	112,4625	6447	1,00	
Max	3,49	112,7921	6528	1,02	
Average	3,48	112,6008	6489	1,01	
RSD	0,18	0,15	0,63	1,44	

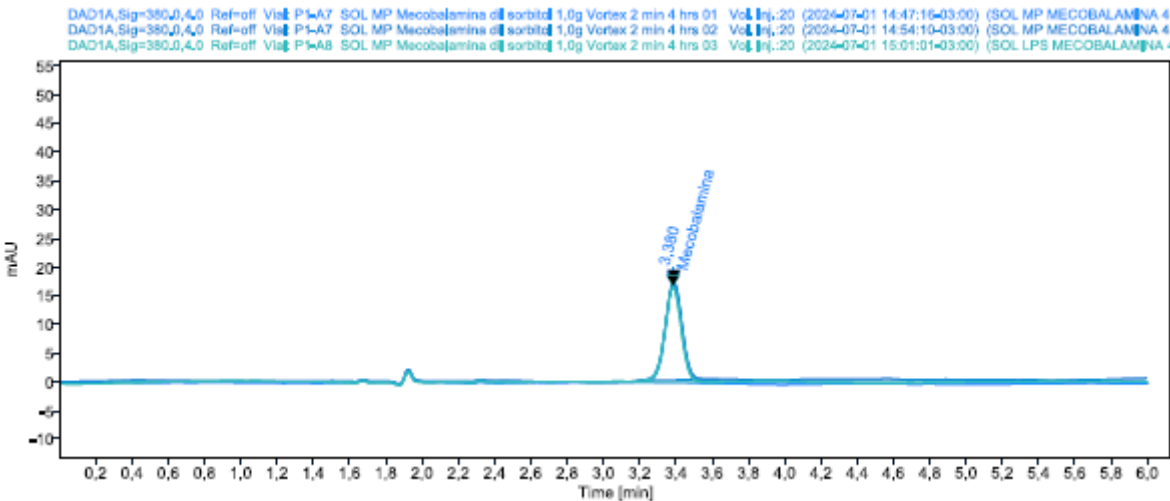
Mecobalamina MP Diluente 1,0 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,44	112,5739	6438	0,98	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,45	112,2605	6469	0,98	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,44	112,0077	6333	0,99	
Min	3,44	112,0077	6333	0,98	
Max	3,45	112,5739	6469	0,99	
Average	3,44	112,2807	6413	0,98	
RSD	0,10	0,25	1,11	0,80	

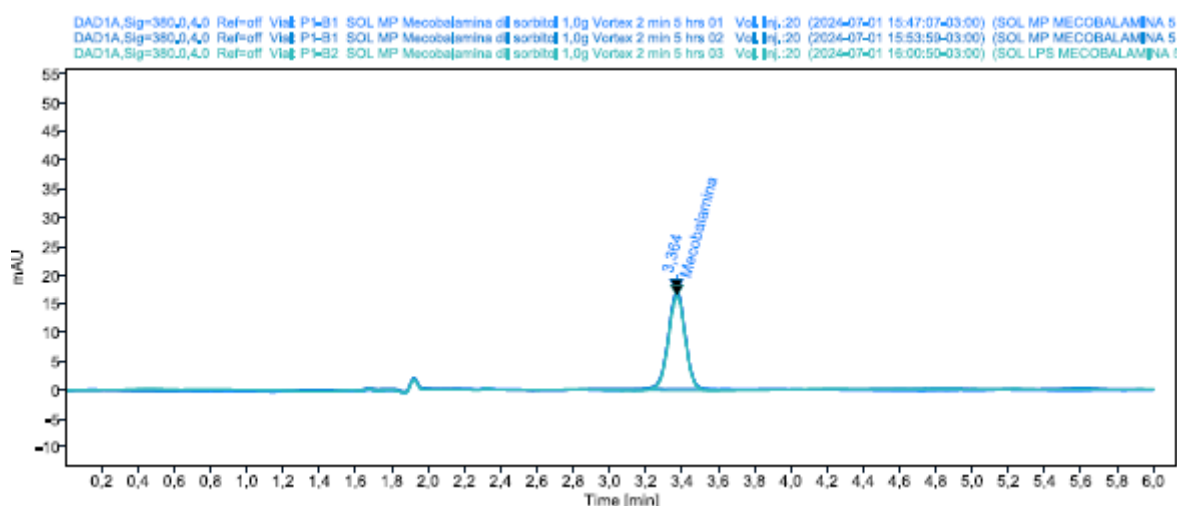
Mecobalamina MP Diluente 1,0 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina di sorbito 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,38	111,7906	6338	1,02	
SOL MP Mecobalamina di sorbito 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,38	110,7652	6351	1,00	
SOL MP Mecobalamina di sorbito 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,38	109,2648	6336	1,00	
Min	3,38	109,2648	6336	1,00	
Max	3,38	111,7906	6351	1,02	
Average	3,38	110,6069	6342	1,01	
RSD	0,07	1,15	0,13	1,19	

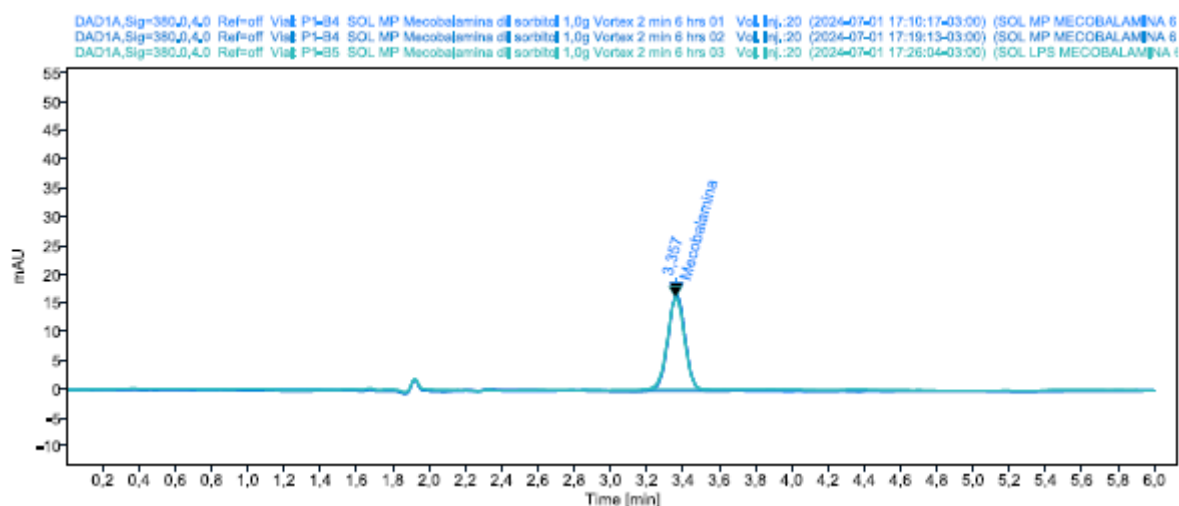
Mecobalamina MP Diluente 1,0 g/L – 5 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbito 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,36	109,3252	6221	0,96	
SOL MP Mecobalamina dil sorbito 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,36	109,9180	6237	0,97	
SOL MP Mecobalamina dil sorbito 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,37	105,9148	6152	1,00	
Min	3,36	105,9148	6152	0,96	
Max	3,37	109,9180	6237	1,00	
Average	3,36	108,3860	6203	0,98	
RSD	0,03	1,99	0,73	2,34	

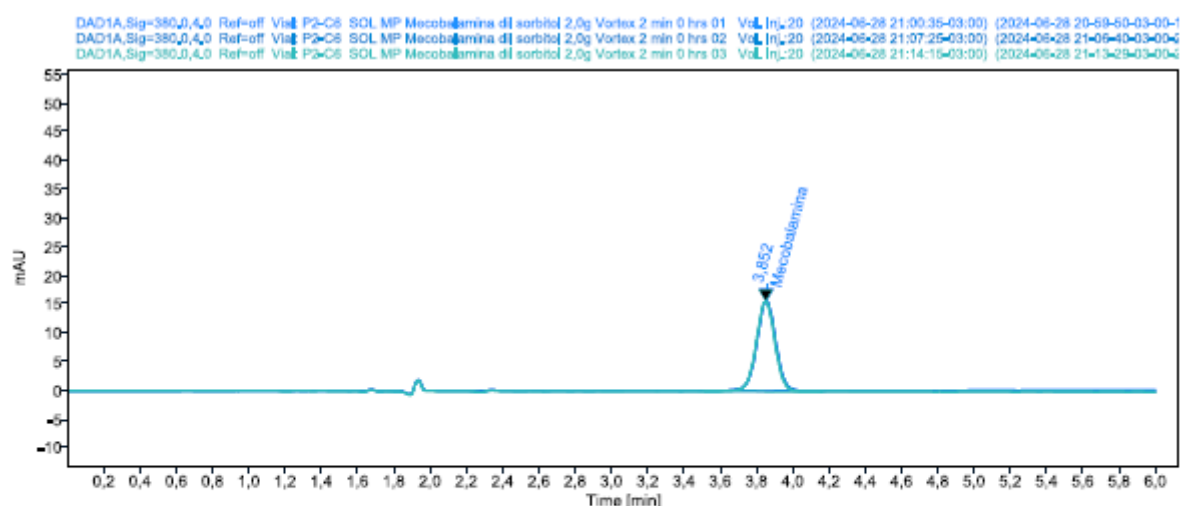
Mecobalamina MP Diluente 1,0 g/L – 6 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,36	109,0422	6009	1,02	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,36	109,7393	5974	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,35	104,2669	5926	0,98	
Min	3,35	104,2669	5926	0,98	
Max	3,36	109,7393	6009	1,02	
Average	3,36	107,6828	5970	1,00	
RSD	0,11	2,77	0,71	2,31	

Mecobalamina MP Diluente 2,0 g/L – 0 horas.

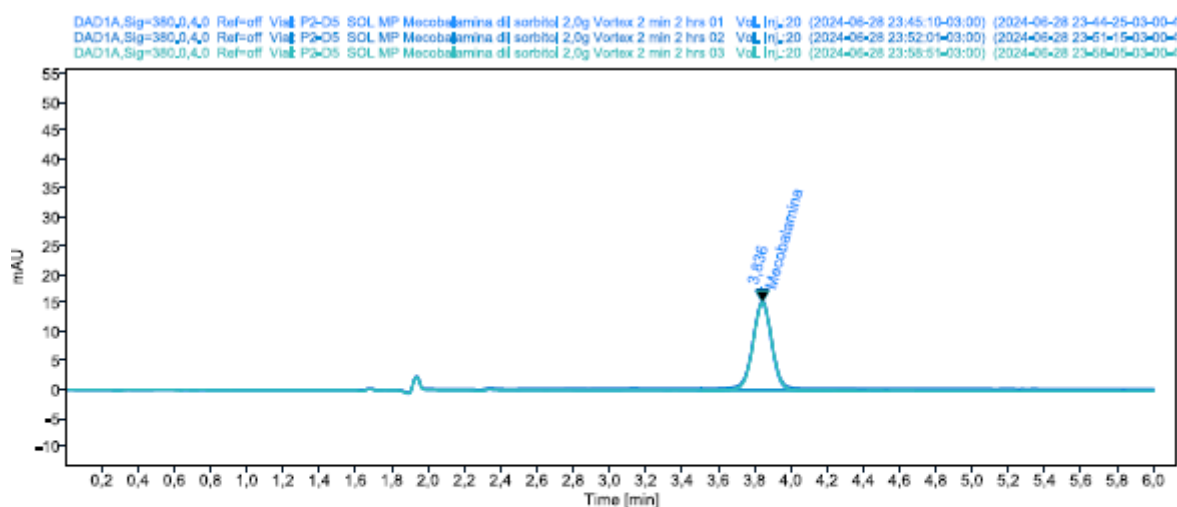


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	113,5064	6609	0,99	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,84	113,6324	6609	0,98	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,84	114,5568	6584	1,00	
Min	3,84	113,5064	6584	0,98	
Max	3,85	114,5568	6609	1,00	
Average	3,85	113,8985	6601	0,99	
RSD	0,10	0,50	0,22	1,23	

Mecobalamina MP Diluente 2,0 g/L – 2 horas.

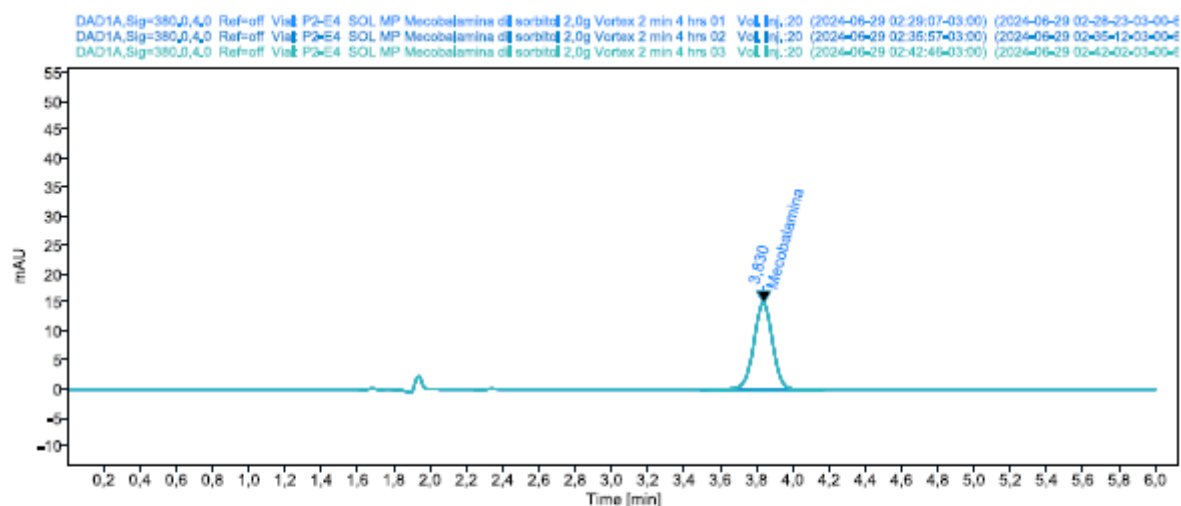


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380.0,4.0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	114,1750	6573	0,97	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,84	114,4247	6538	0,99	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,84	114,3307	6543	1,00	
Min	3,84	114,1750	6538	0,97	
Max	3,84	114,4247	6573	1,00	
Average	3,84	114,3101	6551	0,99	
RSD	0,06	0,11	0,29	1,80	

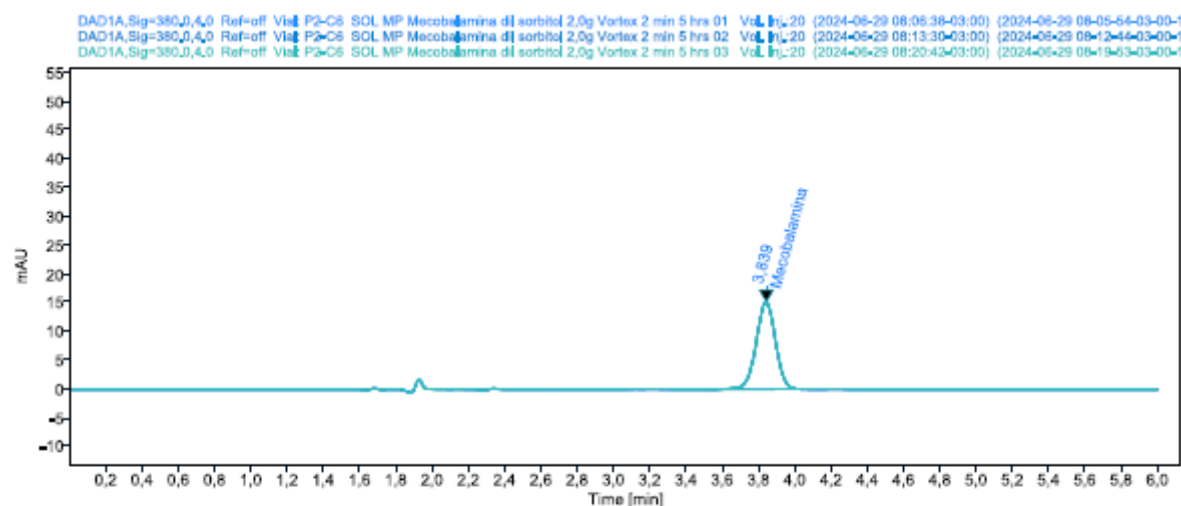
Mecobalamina MP Diluente 2,0 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,83	114,1345	6519	0,96	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,84	113,9199	6493	0,99	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,84	114,0592	6468	0,99	
Min	3,83	113,9199	6468	0,96	
Max	3,84	114,1345	6519	0,99	
Average	3,83	114,0379	6493	0,98	
RSD	0,08	0,10	0,39	1,33	

Mecobalamina MP Diluente 2,0 g/L – 5 horas.

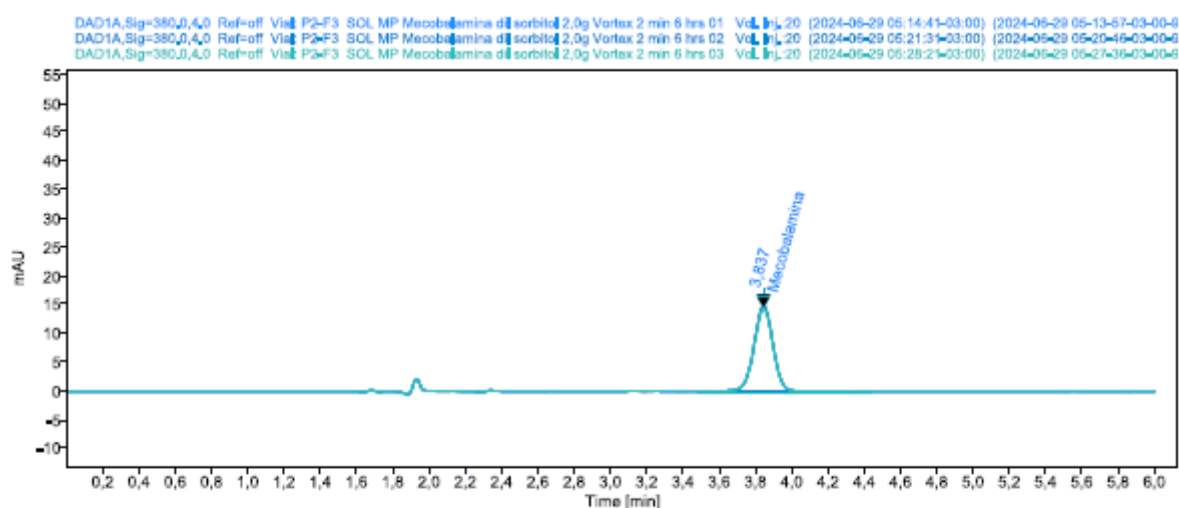


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	113,0833	6223	0,97	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,84	112,8413	6202	0,98	
SOL MP Mecobalamina di sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	113,2699	6181	0,98	
Min	3,84	112,8413	6181	0,97	
Max	3,84	113,2699	6223	0,98	
Average	3,84	113,0649	6202	0,98	
RSD	0,02	0,19	0,34	0,79	

Mecobalamina MP Diluente 2,0 g/L – 6 horas.



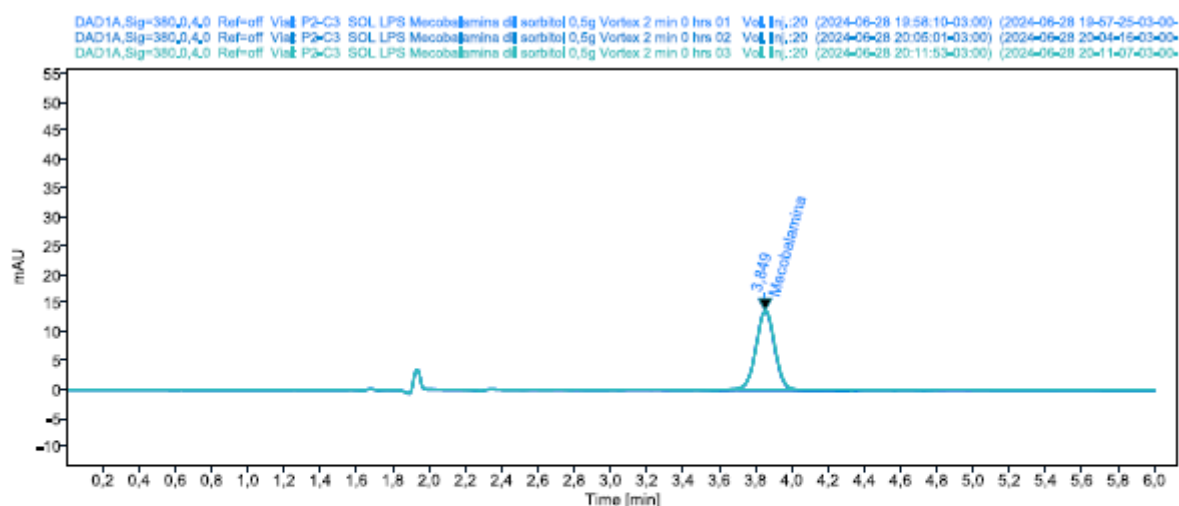
Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	114,0882	6393	1,00	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	113,9393	6342	1,01	
SOL MP Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	114,0682	6290	0,96	
Min	3,84	113,9393	6290	0,96	
Max	3,84	114,0882	6393	1,01	
Average	3,84	114,0319	6342	0,99	
RSD	0,02	0,07	0,81	2,99	

9.2. Anexo II – Relatório de mecobalamina em produto acabado nas diferentes concentrações do diluente.

Mecobalamina PA Diluente 0,5 g/L – 0 horas.

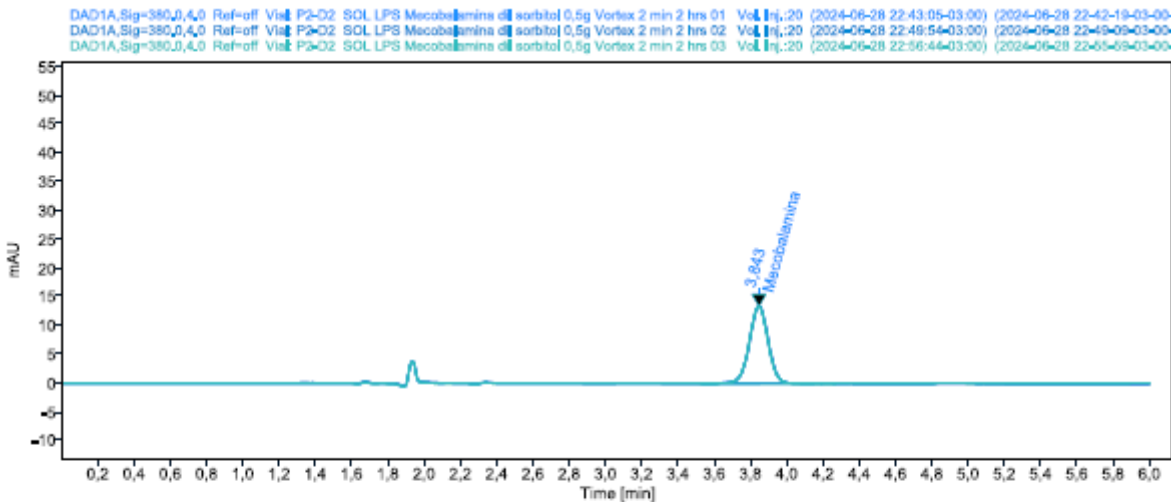


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	103,8802	6569	1,03	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	103,9697	6535	1,02	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	103,1626	6564	0,98	
Min	3,85	103,1626	6535	0,98	
Max	3,85	103,9697	6569	1,03	
Average	3,85	103,6709	6556	1,01	
RSD	0,04	0,43	0,28	2,72	

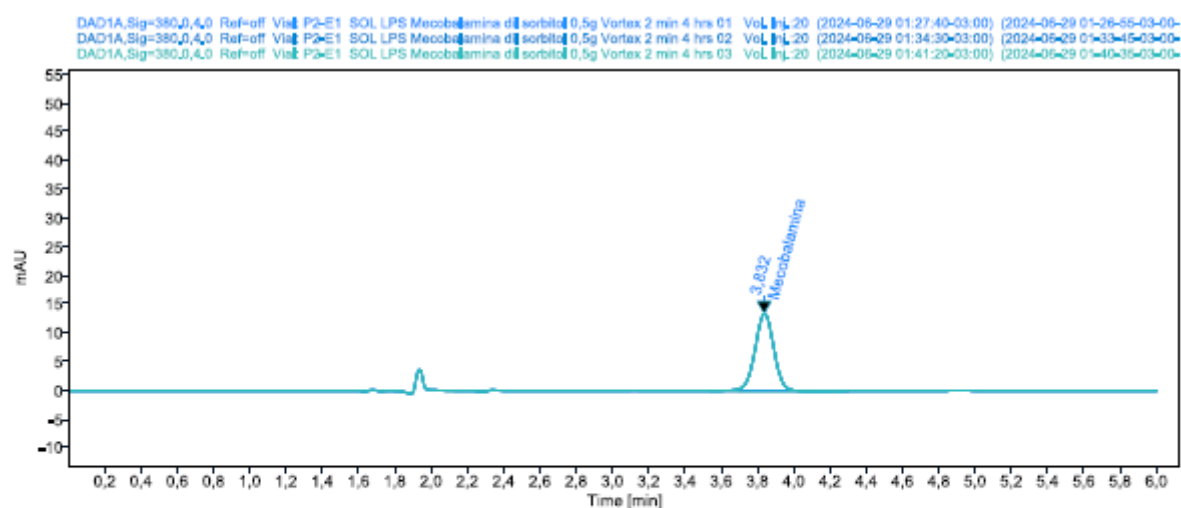
Mecobalamina PA Diluente 0,5 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	100,2481	6554	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,84	100,0697	6590	1,03	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,84	100,1960	6559	1,00	
Min	3,84	100,0697	6554	1,00	
Max	3,84	100,2481	6590	1,03	
Average	3,84	100,1713	6568	1,01	
RSD	0,05	0,09	0,29	1,73	

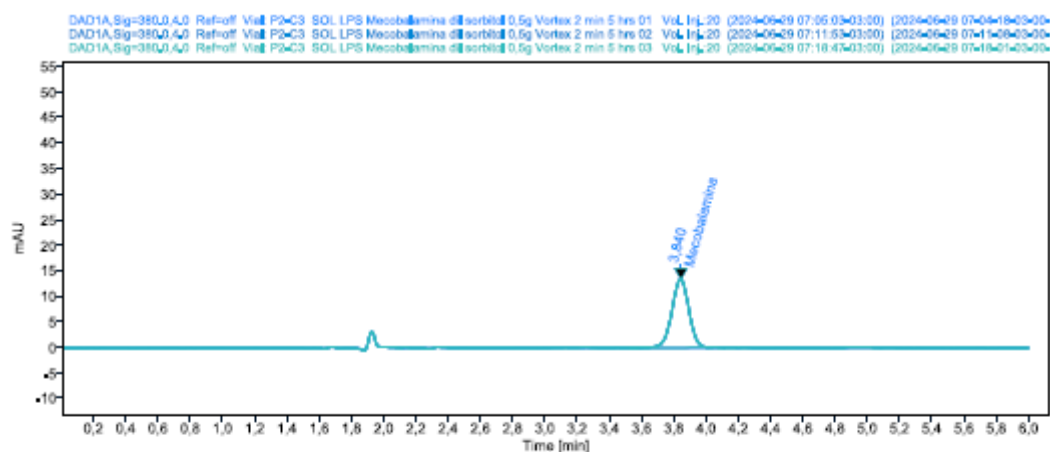
Mecobalamina PA Diluente 0,5 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,83	99,7072	6556	1,01	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,83	99,8703	6579	1,02	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	99,3521	6568	0,98	
Min	3,83	99,3521	6556	0,98	
Max	3,83	99,8703	6579	1,02	
Average	3,83	99,6432	6568	1,00	
RSD	0,02	0,27	0,18	2,46	

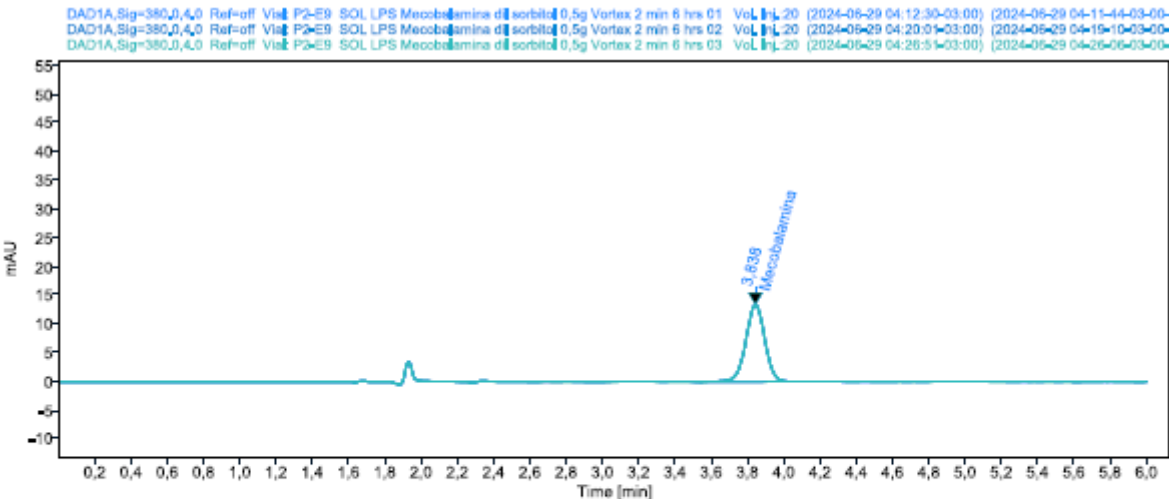
Mecobalamina PA Diluente 0,5 g/L – 5 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	98,8351	6344	0,96	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,84	98,8944	6311	0,99	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	98,8969	6302	0,96	
Min	3,84	98,8351	6302	0,96	
Max	3,84	98,8969	6344	0,99	
Average	3,84	98,8755	6319	0,97	
RSD	0,04	0,04	0,35	2,11	

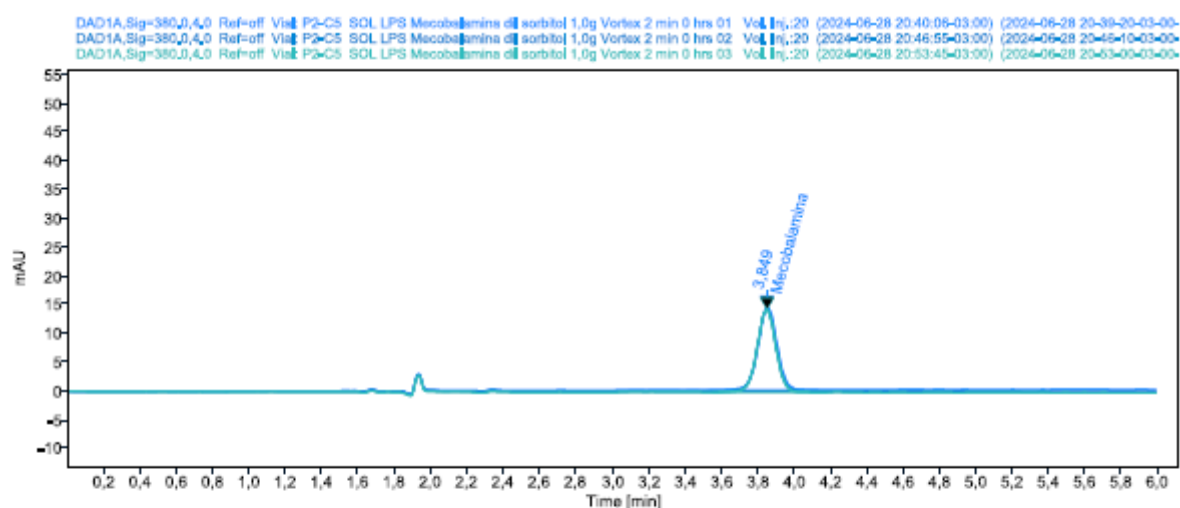
Mecobalamina PA Diluente 0,5 g/L – 6 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	97,7397	6490	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	97,7918	6490	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	97,2914	6492	1,01	
Min	3,84	97,2914	6490	1,00	
Max	3,84	97,7918	6492	1,01	
Average	3,84	97,6076	6491	1,00	
RSD	0,02	0,28	0,02	0,80	

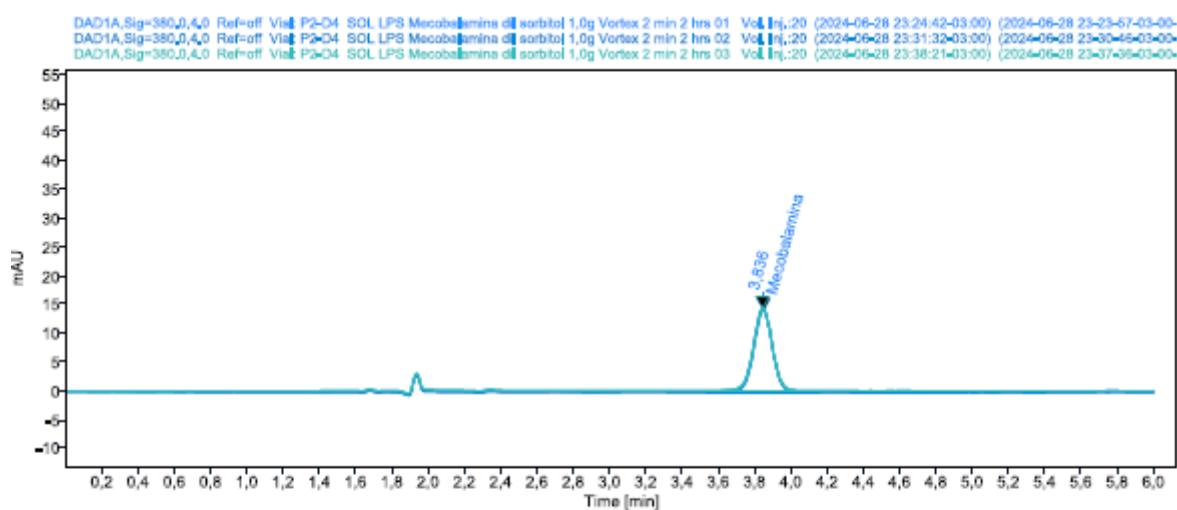
Mecobalamina PA Diluente 1,0 g/L – 0 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	105,7532	6560	0,99	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	105,7032	6562	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	105,0340	6592	0,99	
Min	3,85	105,0340	6560	0,99	
Max	3,85	105,7532	6592	1,00	
Average	3,85	105,4968	6572	0,99	
RSD	0,00	0,38	0,27	0,62	

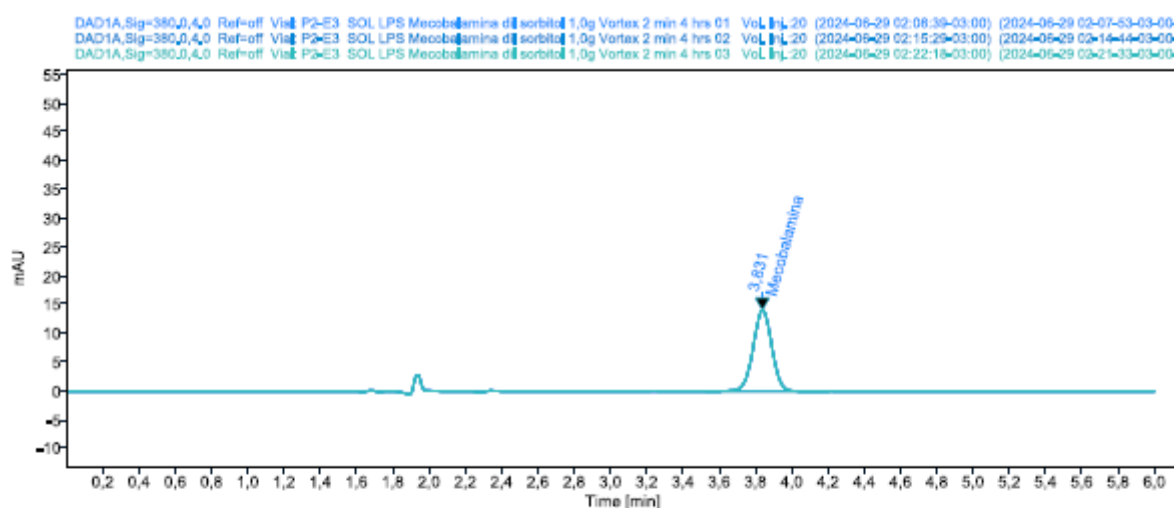
Mecobalamina PA Diluente 1,0 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	104,4455	6583	0,97	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,84	103,2678	6608	0,99	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,84	103,2565	6628	0,97	
Min	3,84	103,2565	6583	0,97	
Max	3,84	104,4455	6628	0,99	
Average	3,84	103,6566	6606	0,98	
RSD	0,10	0,66	0,34	0,93	

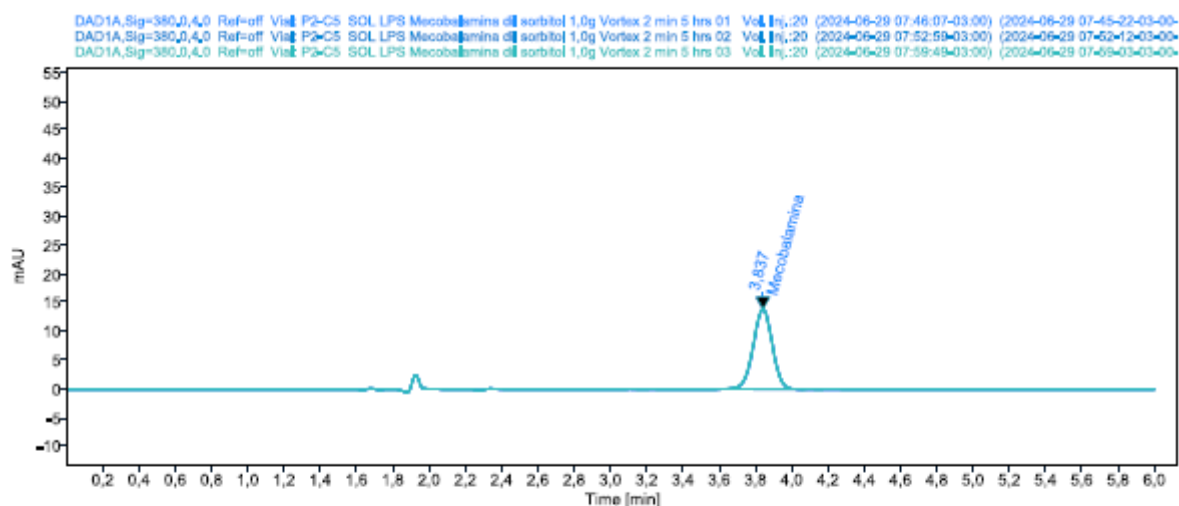
Mecobalamina PA Diluente 1,0 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,83	102,1492	6595	1,02	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,83	102,3255	6577	0,97	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	102,3490	6569	1,01	
Min	3,83	102,1492	6569	0,97	
Max	3,83	102,3490	6595	1,02	
Average	3,83	102,2746	6580	1,00	
RSD	0,02	0,11	0,20	2,60	

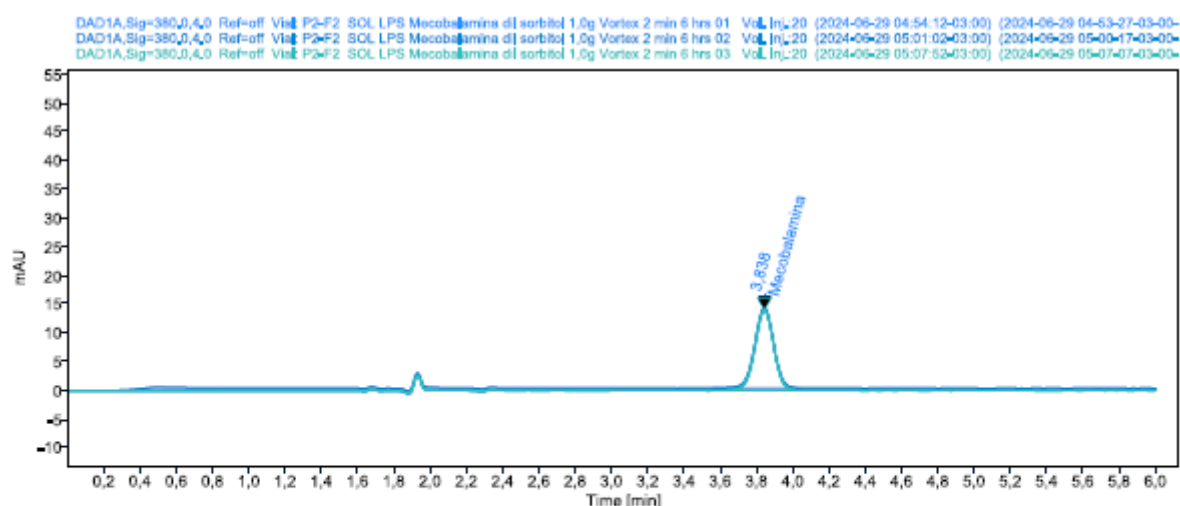
Mecobalamina PA Diluente 1,0 g/L – 5 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	102,4992	6283	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,83	102,4984	6259	0,95	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	102,4644	6249	0,98	
Min	3,83	102,4644	6249	0,95	
Max	3,84	102,4992	6283	1,00	
Average	3,84	102,4873	6264	0,98	
RSD	0,07	0,02	0,27	2,21	

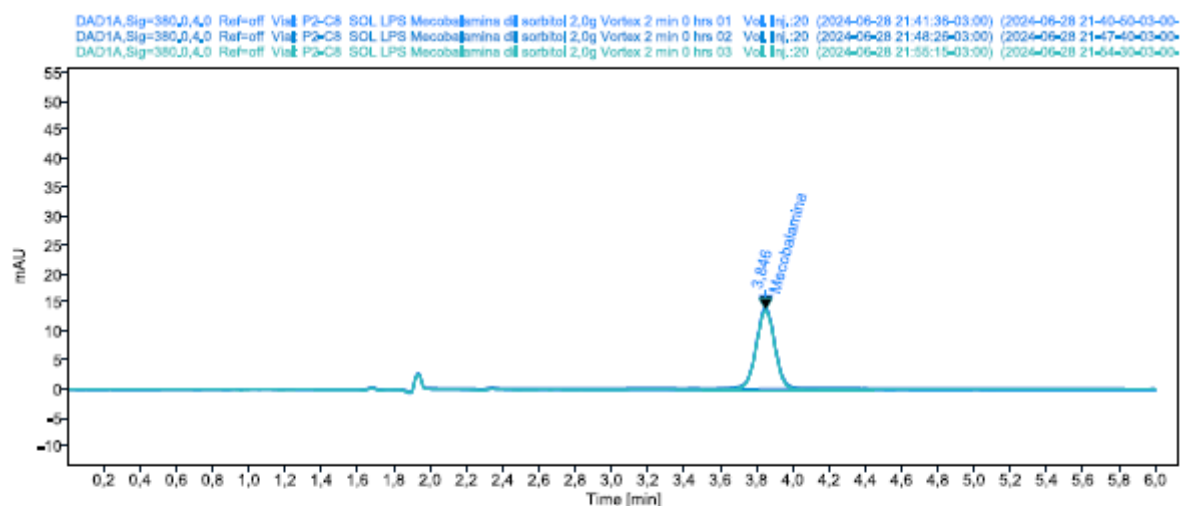
Mecobalamina PA Diluente 1,0 g/L – 6 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	101,6647	6505	0,99	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	101,6568	6495	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	101,6990	6437	1,02	
Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
Min	3,84	101,6568	6437	0,98	
Max	3,84	101,6990	6505	1,02	
Average	3,84	101,6735	6479	1,00	
RSD	0,03	0,02	0,57	1,99	

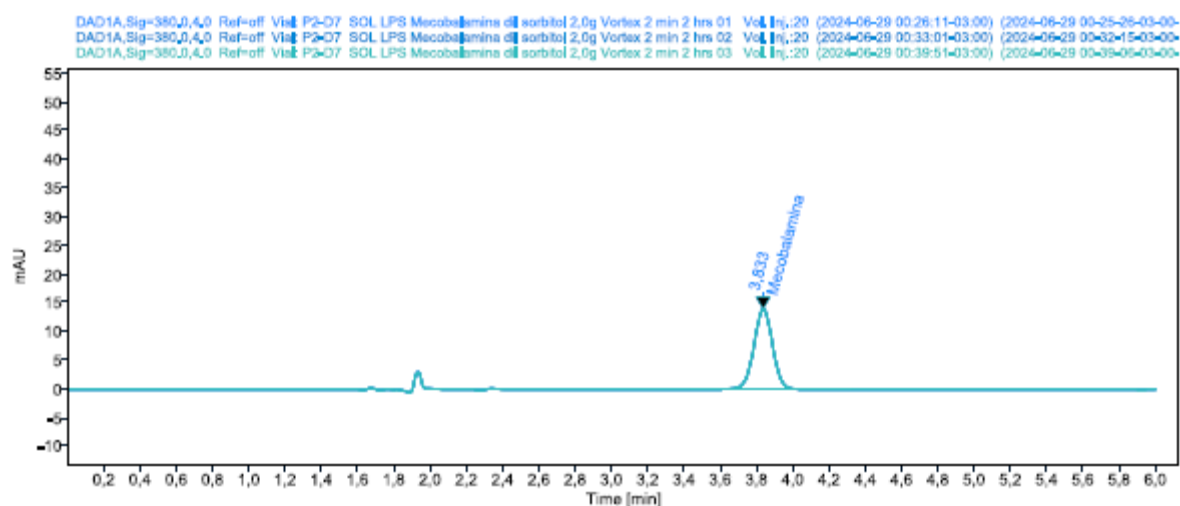
Mecobalamina PA Diluente 2,0 g/L – 0 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	105,0448	6630	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,84	105,1460	6548	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	105,3524	6559	1,00	
Min	3,84	105,0448	6548	0,98	
Max	3,85	105,3524	6630	1,00	
Average	3,84	105,1811	6579	0,99	
RSD	0,04	0,15	0,68	1,13	

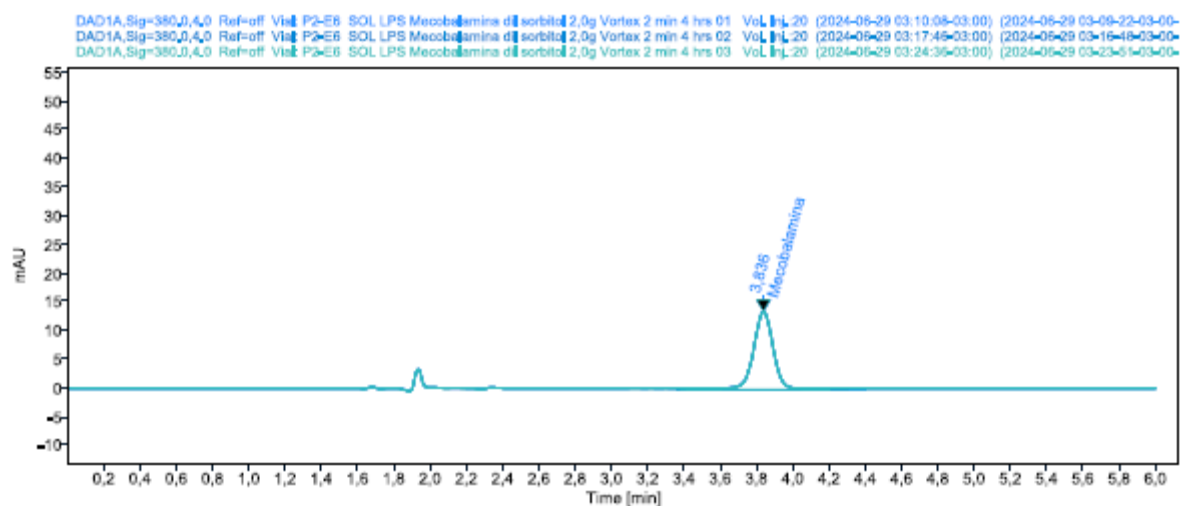
Mecobalamina PA Diluente 2,0 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,83	104,8573	6543	1,00	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,83	105,4469	6552	1,03	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,83	104,7138	6542	1,00	
Min	3,83	104,7138	6542	1,00	
Max	3,83	105,4469	6552	1,03	
Average	3,83	105,0060	6546	1,01	
RSD	0,02	0,37	0,08	1,57	

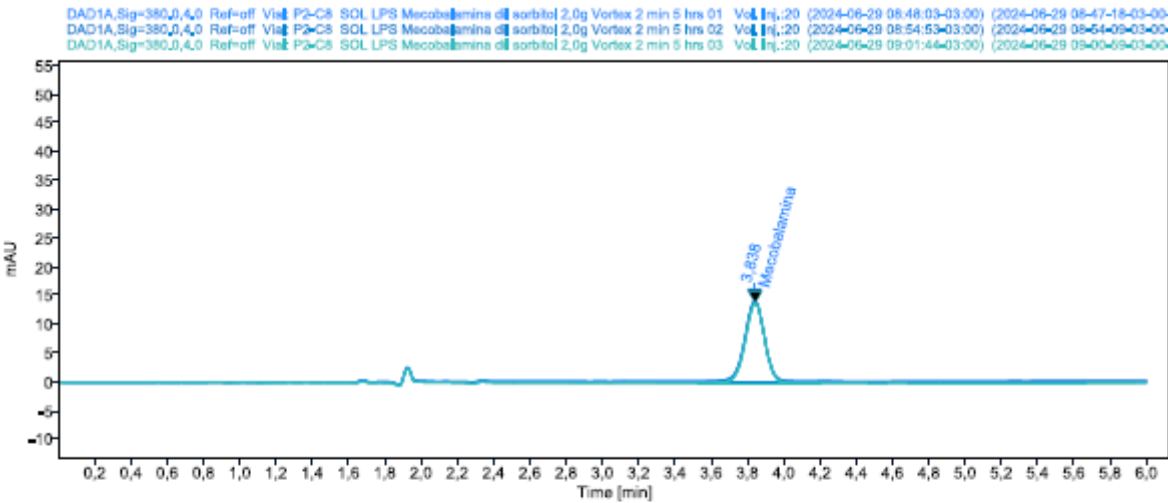
Mecobalamina PA Diluente 2,0 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,84	104,8641	6457	0,99	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,83	104,8638	6468	0,96	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	104,8001	6401	1,01	
Min	3,83	104,8001	6401	0,96	
Max	3,84	104,8641	6468	1,01	
Average	3,83	104,8427	6442	0,99	
RSD	0,06	0,04	0,56	2,32	

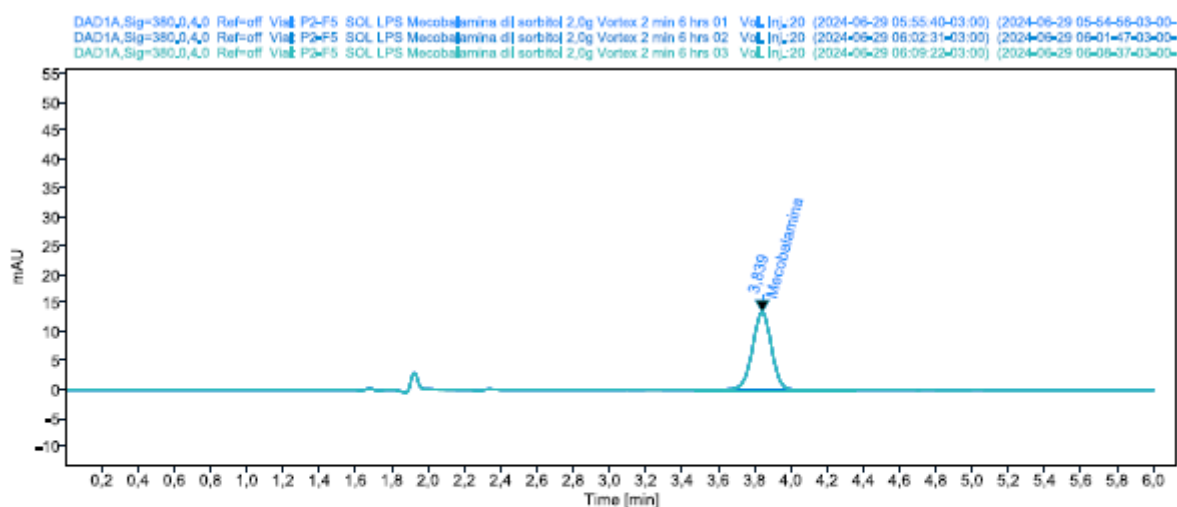
Mecobalamina PA Diluente 2,0 g/L – 5 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380.0,4.0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	103,8672	6164	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,83	104,5889	6105	1,01	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	103,6820	6145	0,98	
Min	3,83	103,6820	6105	0,98	
Max	3,84	104,5889	6164	1,01	
Average	3,84	104,0460	6138	0,99	
RSD	0,08	0,46	0,49	1,78	

Mecobalamina PA Diluente 2,0 g/L – 6 horas.

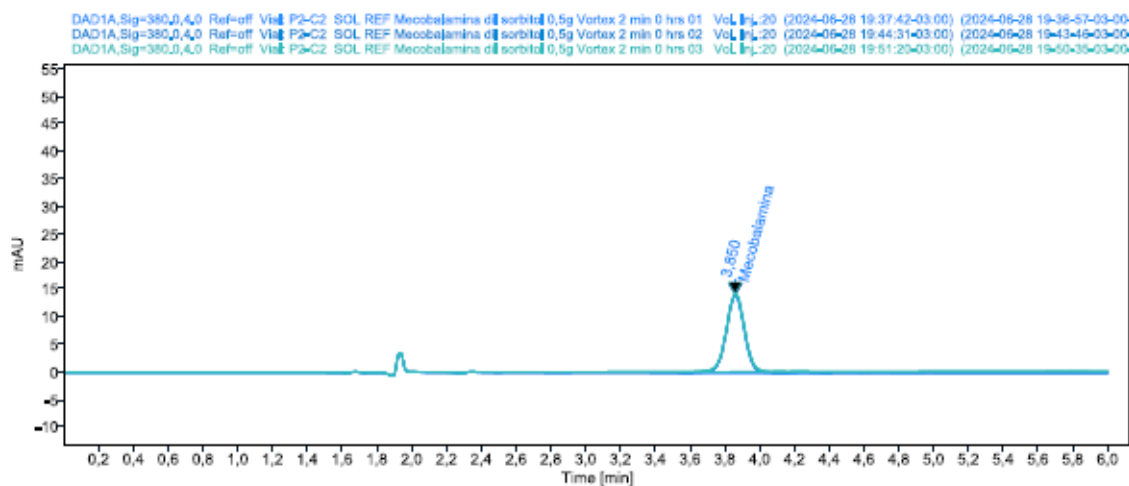


Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	104,1262	6346	0,98	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	104,1799	6330	0,97	
SOL LPS Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	104,7570	6303	0,98	
Min	3,84	104,1262	6303	0,97	
Max	3,84	104,7570	6346	0,98	
Average	3,84	104,3544	6326	0,98	
RSD	0,00	0,34	0,34	0,54	

9.3. Anexo III – Relatório de mecobalamina em medicamento comercializado nas diferentes concentrações do diluente.

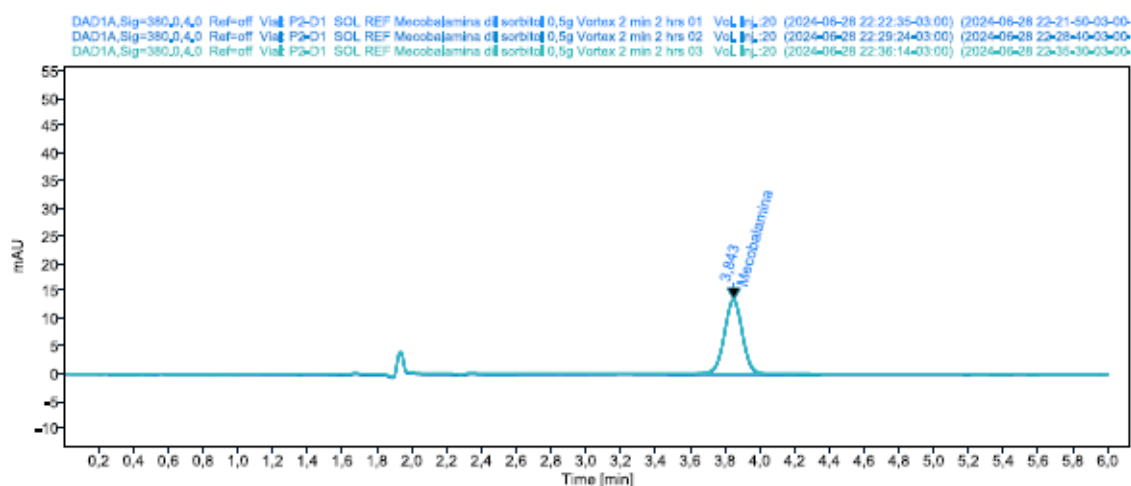
Mecobalamina MC Diluente 0,5 g/L – 0 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	106,5603	6542	0,98	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,86	106,2004	6536	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	105,9520	6550	0,98	
Min	3,85	105,9520	6536	0,98	
Max	3,86	106,5603	6550	0,99	
Average	3,85	106,2375	6543	0,98	
RSD	0,11	0,29	0,11	0,50	

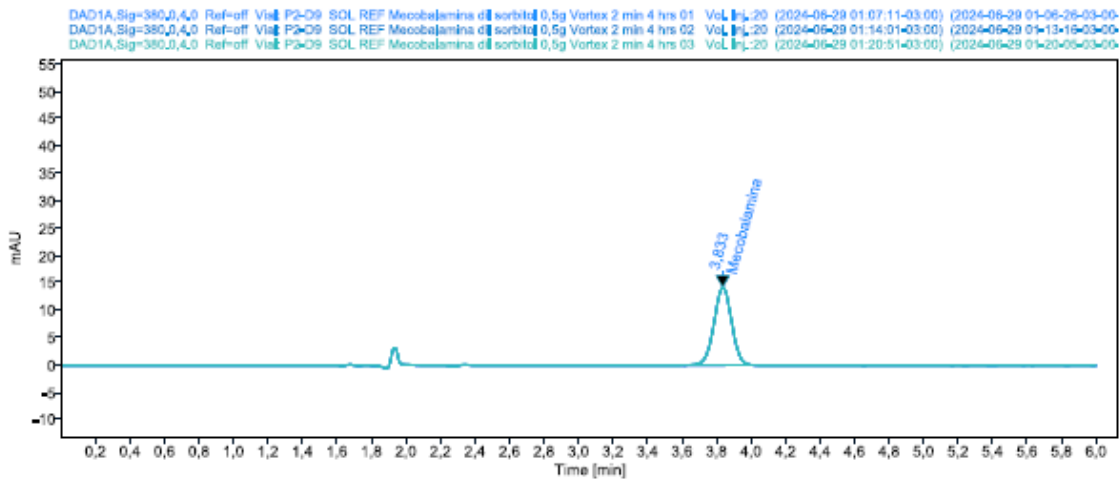
Mecobalamina MC Diluente 0,5 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	102,2826	6526	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,85	101,9962	6565	0,98	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,84	102,4676	6534	1,00	
Min	3,84	101,9962	6526	0,98	
Max	3,85	102,4676	6565	1,02	
Average	3,84	102,2488	6541	1,00	
RSD	0,03	0,23	0,32	2,07	

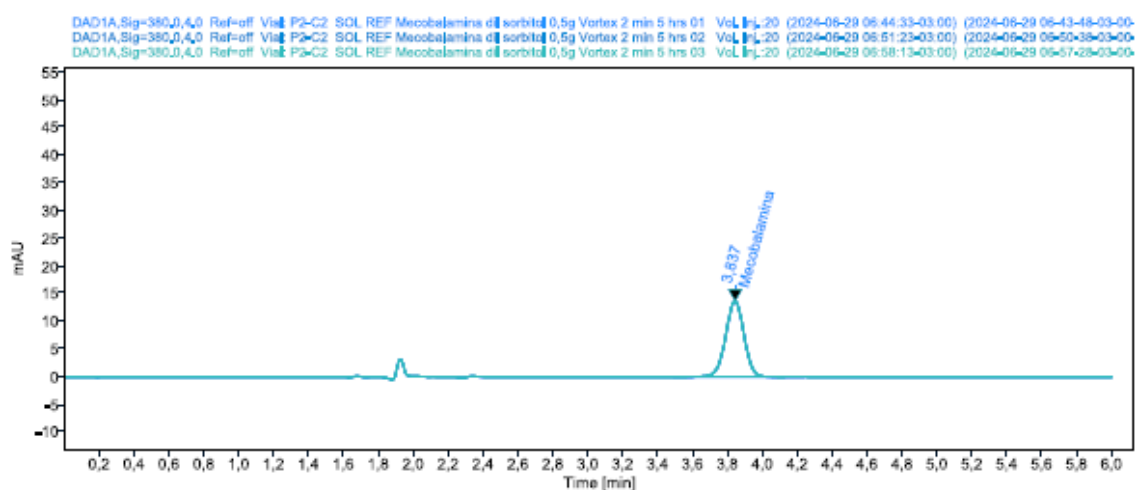
Mecobalamina MC Diluente 0,5 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,83	101,4404	6651	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,83	101,4450	6645	1,01	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	101,6582	6643	0,97	
Min	3,83	101,4404	6643	0,97	
Max	3,83	101,6582	6651	1,01	
Average	3,83	101,5145	6646	0,99	
RSD	0,03	0,12	0,06	2,17	

Mecobalamina MC Diluente 0,5 g/L – 5 horas.

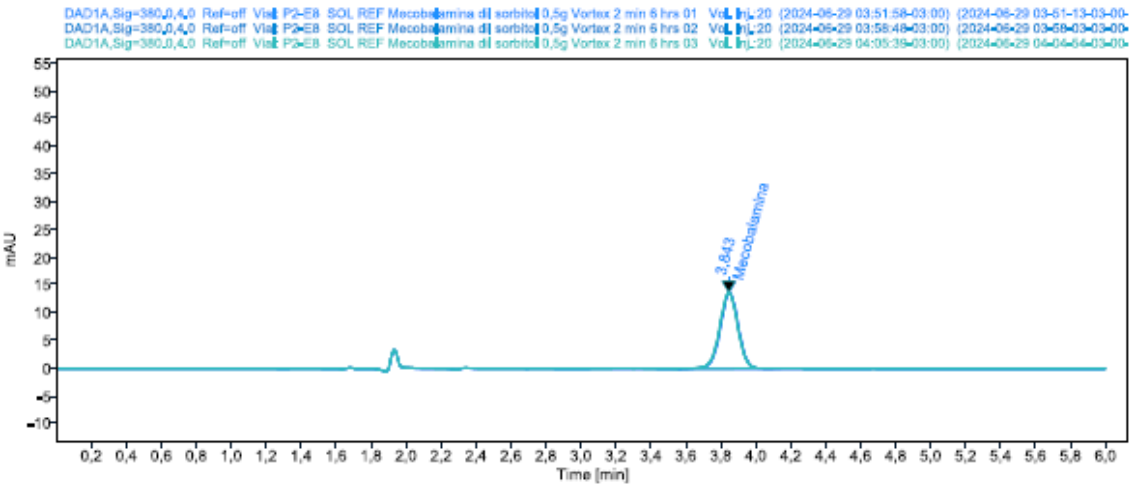


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	101,4298	6328	1,00	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,84	102,5914	6299	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	100,8982	6329	0,99	
Min	3,84	100,8982	6299	0,99	
Max	3,84	102,5914	6329	1,00	
Average	3,84	101,6398	6319	0,99	
RSD	0,01	0,85	0,27	0,70	

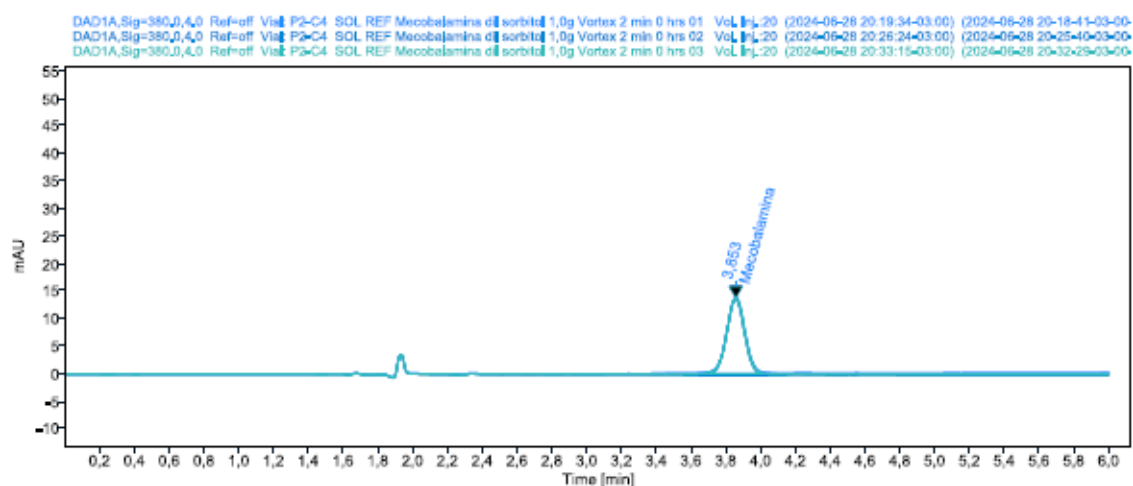
Mecobalamina MC Diluente 0,5 g/L – 6 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	99,7082	6518	0,96	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	99,5479	6503	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 0,5g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	99,5352	6524	0,99	
Min	3,84	99,5352	6503	0,96	
Max	3,84	99,7082	6524	1,02	
Average	3,84	99,5971	6515	0,99	
RSD	0,05	0,10	0,17	2,66	

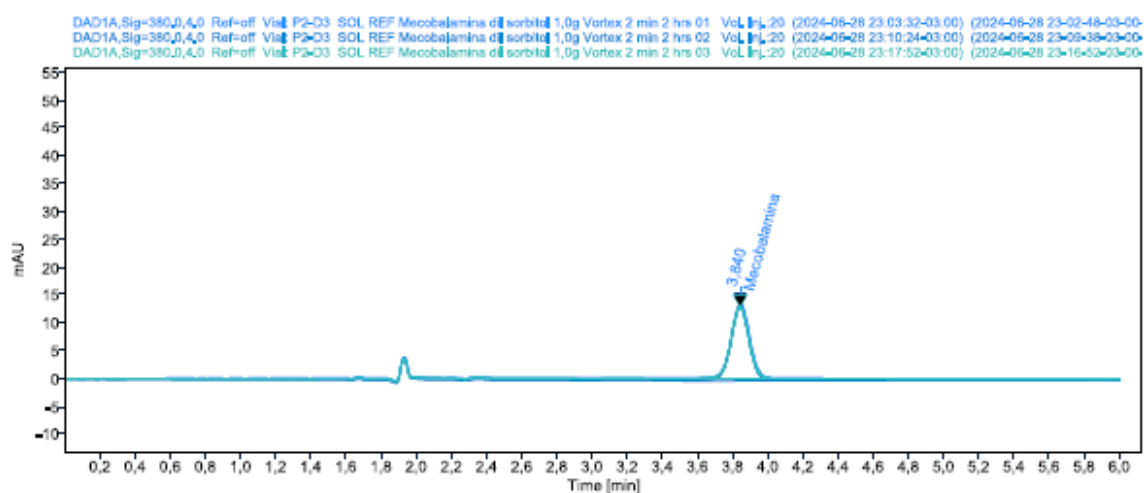
Mecobalamina MC Diluente 1,0 g/L – 0 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,85	100,7595	6593	1,01	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	100,5974	6599	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	100,5658	6593	1,00	
Min	3,85	100,5658	6593	1,00	
Max	3,85	100,7595	6599	1,02	
Average	3,85	100,6409	6595	1,01	
RSD	0,02	0,10	0,05	0,75	

Mecobalamina MC Diluente 1,0 g/L – 2 horas.

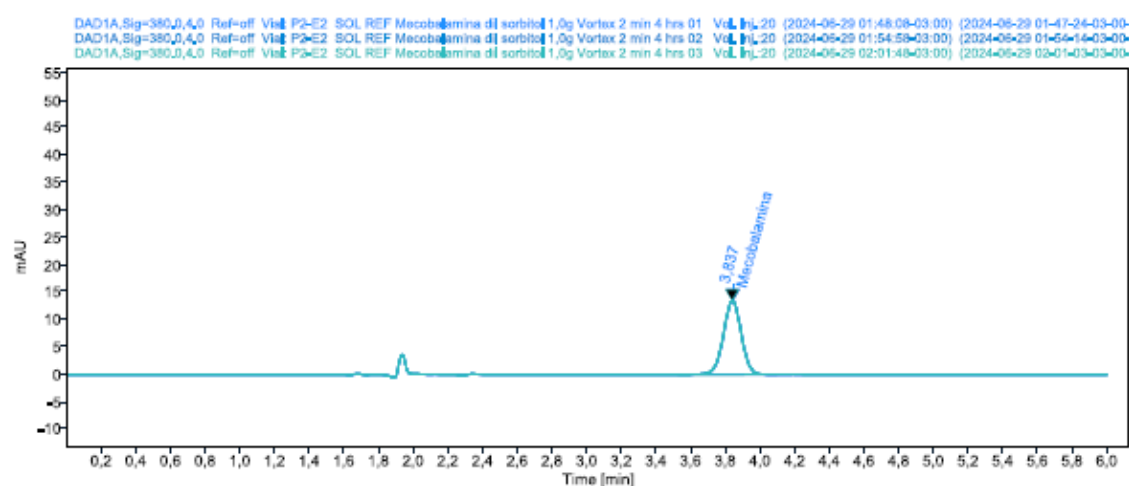


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	99,0204	6572	1,03	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,84	99,2027	6565	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,84	99,7332	6524	0,99	
Min	3,84	99,0204	6524	0,99	
Max	3,84	99,7332	6572	1,03	
Average	3,84	99,3188	6554	1,00	
RSD	0,00	0,37	0,39	2,19	

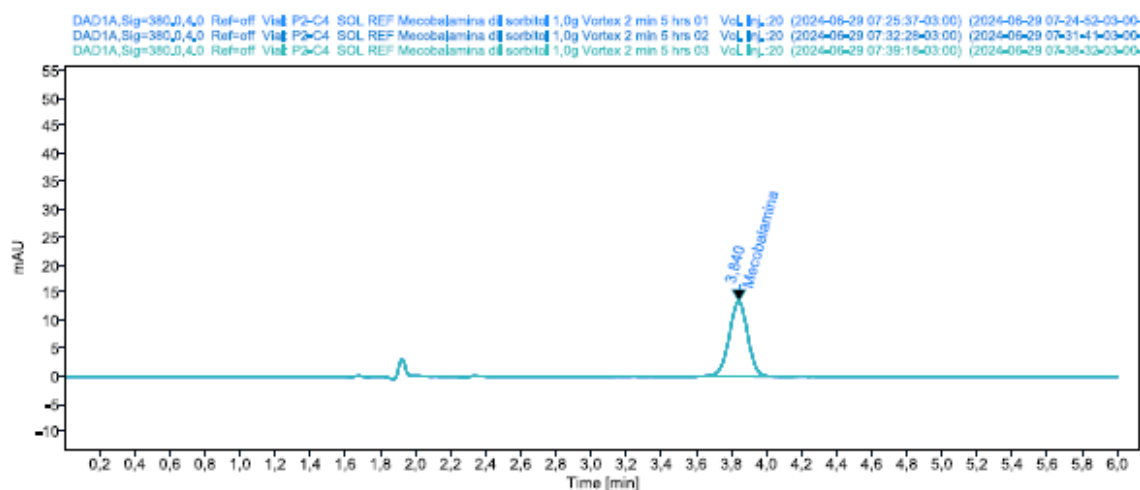
Mecobalamina MC Diluente 1,0 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,84	98,7541	6569	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,84	97,7989	6584	0,98	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	97,4151	6592	0,98	
Min	3,83	97,4151	6569	0,98	
Max	3,84	98,7541	6592	0,99	
Average	3,83	97,9894	6582	0,98	
RSD	0,10	0,70	0,17	0,56	

Mecobalamina MC Diluente 1,0 g/L – 5 horas.

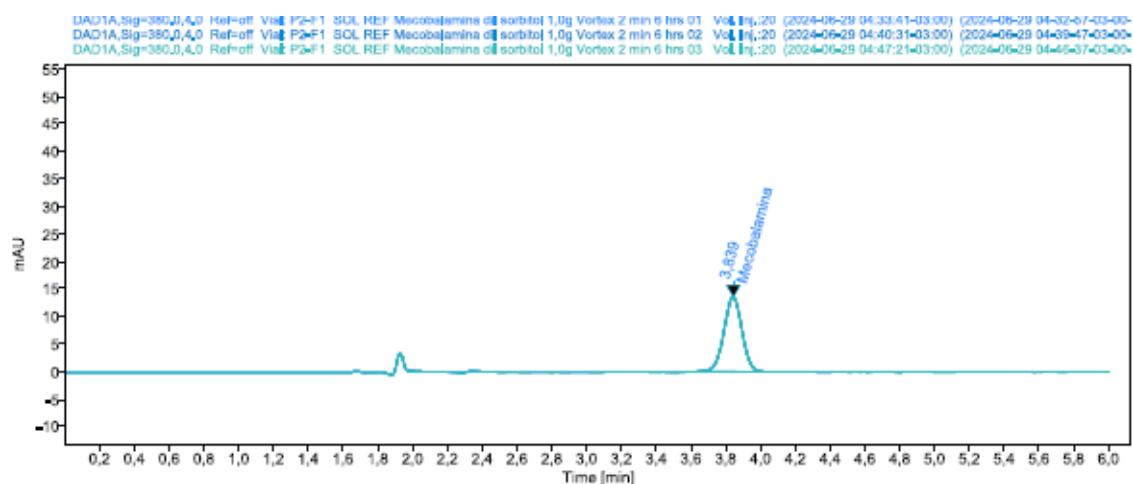


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	98,2727	6355	0,97	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,84	98,8474	6309	0,97	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	98,6675	6327	0,97	
Min	3,84	98,2727	6309	0,97	
Max	3,84	98,8474	6355	0,97	
Average	3,84	98,5959	6330	0,97	
RSD	0,00	0,30	0,36	0,17	

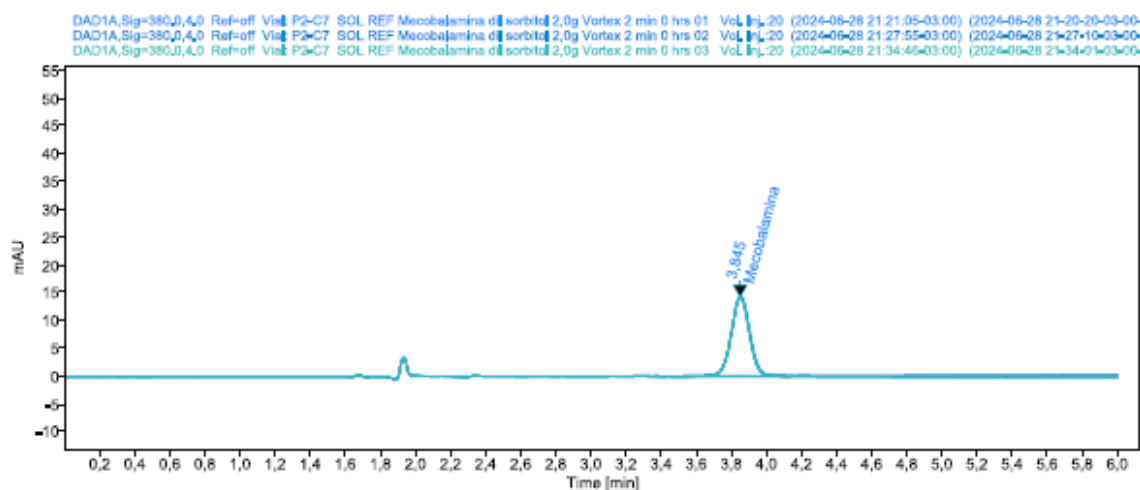
Mecobalamina MC Diluente 1,0 g/L – 6 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	97,7231	6541	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	96,8003	6566	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 1,0g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	97,6252	6554	0,98	
Min	3,84	96,8003	6541	0,98	
Max	3,84	97,7231	6566	0,99	
Average	3,84	97,3829	6554	0,99	
RSD	0,01	0,52	0,19	0,71	

Mecobalamina MC Diluente 2,0 g/L – 0 horas.

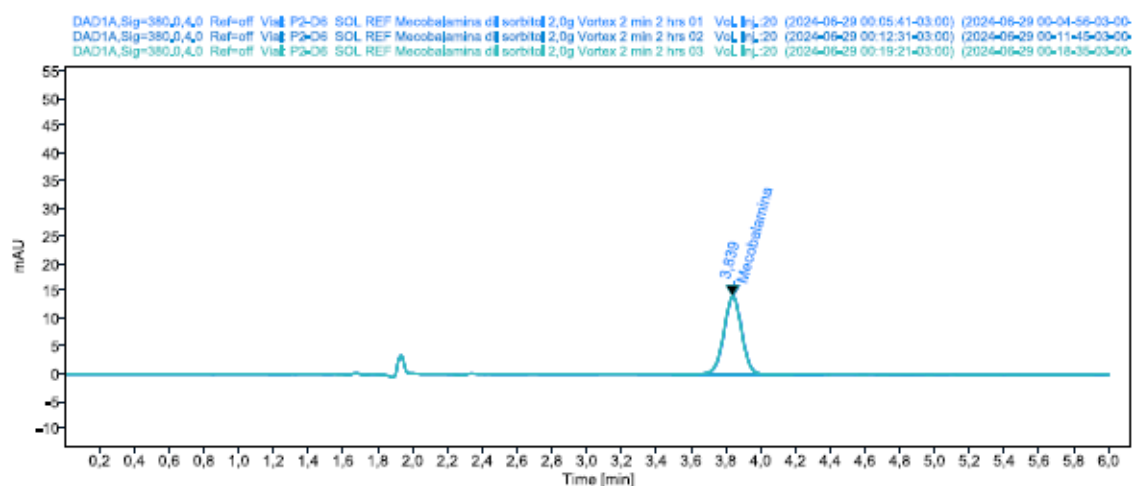


Nome:

Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 01	3,84	105,0864	6548	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 02	3,85	103,8999	6631	1,03	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 0 hrs 03	3,85	103,5890	6616	1,01	
Min	3,84	103,5890	6548	1,01	
Max	3,85	105,0864	6631	1,03	
Average	3,85	104,1917	6598	1,02	
RSD	0,02	0,76	0,67	1,14	

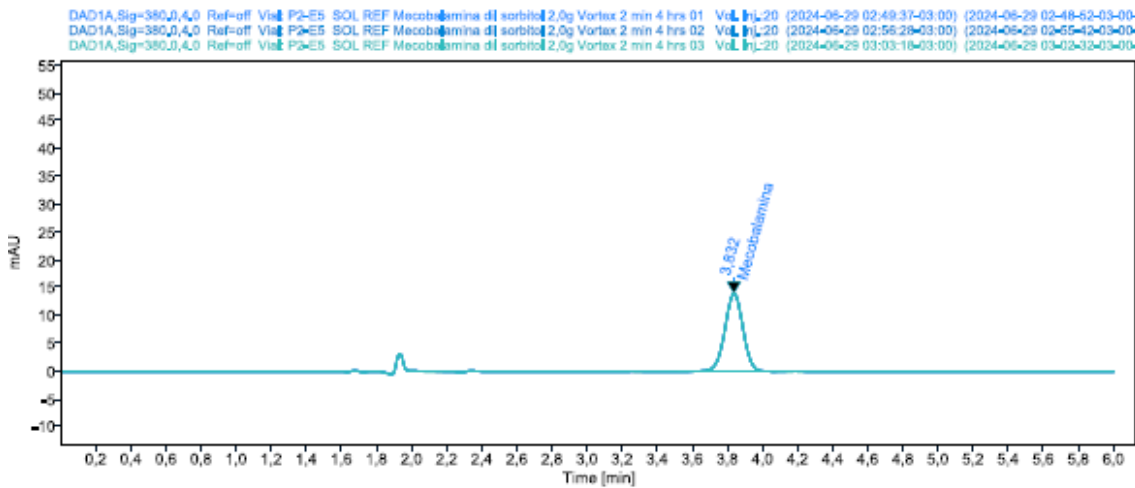
Mecobalamina MC Diluente 2,0 g/L – 2 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 01	3,84	105,0722	6568	0,99	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 02	3,84	105,1968	6568	0,98	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 2 hrs 03	3,83	105,0925	6547	1,03	
Min	3,83	105,0722	6547	0,98	
Max	3,84	105,1968	6568	1,03	
Average	3,84	105,1205	6561	1,00	
RSD	0,10	0,06	0,18	2,51	

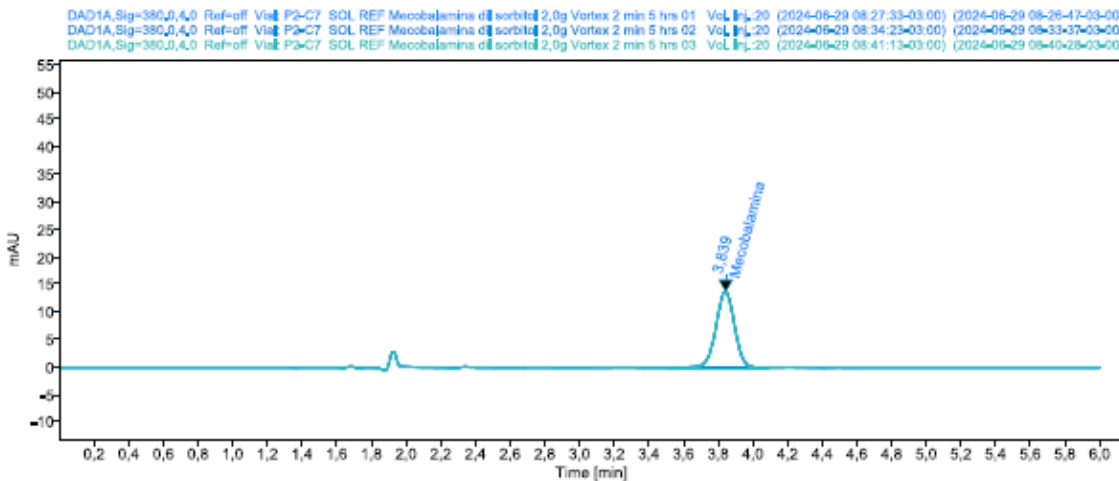
Mecobalamina MC Diluente 2,0 g/L – 4 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teóricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 01	3,83	105,0586	6485	1,01	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 02	3,83	105,1984	6492	1,01	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 4 hrs 03	3,83	105,0007	6482	1,01	
Min	3,83	105,0007	6482	1,01	
Max	3,83	105,1984	6492	1,01	
Average	3,83	105,0859	6486	1,01	
RSD	0,01	0,10	0,08	0,36	

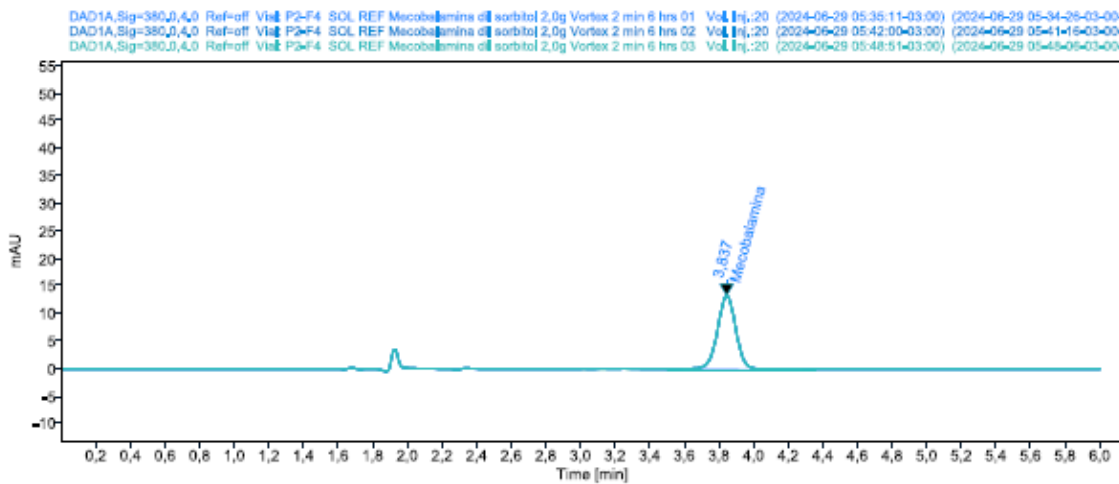
Mecobalamina MC Diluente 2,0 g/L – 5 horas.



Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 01	3,84	104,9726	6159	0,97	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 02	3,84	104,9265	6157	0,98	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 5 hrs 03	3,84	105,0604	6156	0,97	
Min	3,84	104,9265	6156	0,97	
Max	3,84	105,0604	6159	0,98	
Average	3,84	104,9865	6157	0,97	
RSD	0,02	0,06	0,03	0,50	

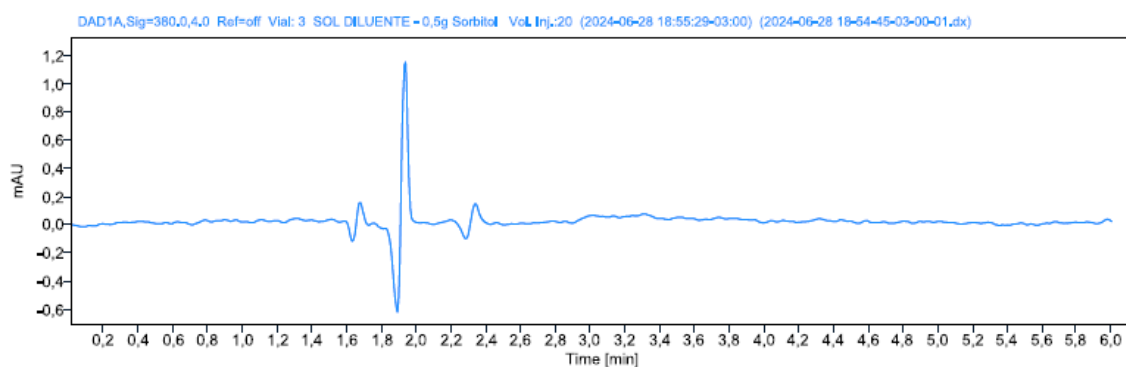
Mecobalamina MC Diluente 2,0 g/L – 6 horas.



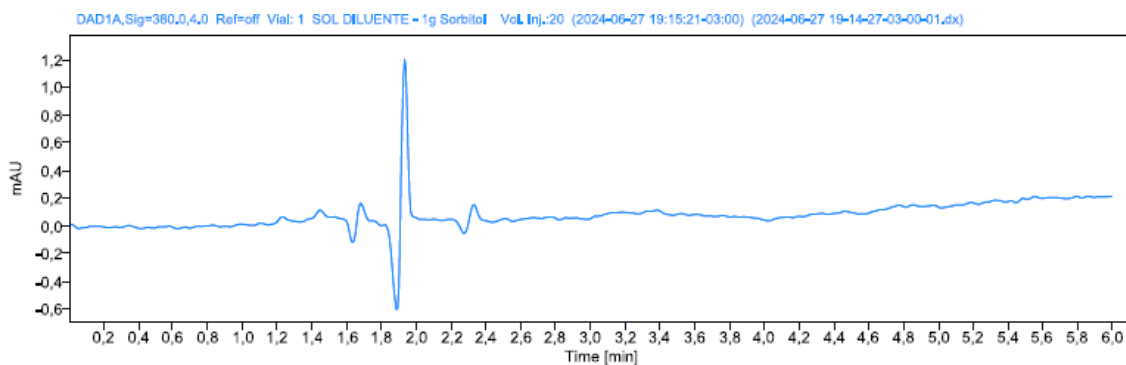
Nome: Mecobalamina (DAD1A,Sig=380,0,4,0 Ref=off)

Nome	Tempo de Retenção	Area	Pratos Teoricos	Assimetria	Resolução
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 01	3,84	104,9969	6303	1,01	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 02	3,84	104,8113	6269	1,02	
SOL REF Mecobalamina dil sorbitol 2,0g Vortex 2 min 6 hrs 03	3,84	104,9717	6293	1,01	
Min	3,84	104,8113	6269	1,01	
Max	3,84	104,9969	6303	1,02	
Average	3,84	104,9266	6289	1,01	
RSD	0,00	0,10	0,28	0,44	

Diluyente 0,5 g/L.



Diluyente 1,0 g/L.



Diluyente 2,0 g/L.

