

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DOSEAMENTO DE FUROSEMIDA MATÉRIA-PRIMA

DUARTE, Livia Teixeira¹; **SILVA**, Ezequiane Machado¹; **SOUZA**, Andrezza Lopes¹;
LOPES, Emilia Ferreira²; **MORAIS**, Hanna Lopes²; **BARA**, Maria Teresa Freitas³

Palavras-chave: Validação, furosemida, doseamento, controle de qualidade.

1. INTRODUÇÃO

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004), que deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez adequados à análise, conforme a finalidade do teste (BRASIL, 2003).

Uma das atribuições de um laboratório de controle de qualidade de medicamentos consiste na validação de métodos analíticos para os diversos fármacos. Dentre eles, pode-se citar a furosemida, que é um fármaco pertencente à classe dos diuréticos de alça, que atua predominantemente no segmento espesso da alça de Henle. É utilizada no tratamento de edemas associados a distúrbios cardíacos, hepáticos ou renais. É também indicada para o tratamento de hipertensão arterial leve a moderada (SILVA, 2006).

A monografia da furosemida está presente na Farmacopéia Brasileira 4ª Edição (2001), sendo que a metodologia empregada para o doseamento de matérias-primas é a titulometria. Todo método desenvolvido e não descrito em farmacopéia ou formulários oficiais deve ser validado (BRASIL, 2003). Tendo em vista as maiores interferências do método titulométrico, bem como sua menor sensibilidade, se comparado com o método espectrofotométrico, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de uma metodologia espectrofotométrica para o doseamento de furosemida matéria-prima.

2. METODOLOGIA

2.1 – Material

Para as etapas que corresponderam ao desenvolvimento do método e sua validação, foram utilizados: substância de química de referência furosemida obtida junto à Farmacopéia Brasileira, apresentando teor de 100,0 % e matéria-prima de furosemida gentilmente cedida por fornecedor idôneo, a qual foi submetida anteriormente a reações de identificação, como espectrofotometria no infravermelho e ponto de fusão. Os reagentes utilizados no estudo foram: hidróxido de sódio (Biotec) e água destilada. A vidraria utilizada foi calibrada pela Rede Brasileira de Calibração (RBC).

2.2 – Equipamentos e condições analíticas

Como pré-requisito para validação de métodos analíticos, os equipamentos e instrumentos foram previamente qualificados e certificados. Dentre os equipamentos, foram empregados espectrofotômetros de 2 marcas distintas: Cary 50 Bio (Varian) e B582 (Micronal). O comprimento de onda utilizado nas leituras foi de 271 nm; o ajuste do zero foi feito com solução de hidróxido de sódio 0,1M.

2.3 – Estudo da validação

Os parâmetros avaliados foram a Especificidade, Linearidade, Intervalo, Precisão (repetibilidade e precisão intermediária), Limite de detecção, Limite de quantificação, Exatidão e Robustez.

2.3.1 – Especificidade: foi avaliada a partir da realização de varredura entre 200 e 800 nm do solvente, solução amostra e solução padrão, com a finalidade de garantir que o método analítico não sofre interferências de outros componentes que estarão presentes na amostra, tais como os solventes e impurezas.

2.3.2 – Linearidade: foi determinada pela realização da curva de calibração. A partir da solubilização da substância química de referência em solução de hidróxido de sódio 0,1M, foram preparadas cinco soluções subseqüentes, utilizando o mesmo solvente, nas concentrações de 0,004; 0,006; 0,008; 0,01 e 0,012 mg/mL, dentro da faixa de 50-150%. A curva de calibração foi preparada e analisada em duplicata. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) foi de 0,99 (BRASIL, 2003).

2.3.3 – Intervalo: foi determinado a partir do estudo de linearidade.

2.3.4 – Precisão: foi avaliada nos níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada pela análise de seis amostras individuais a 100%. Para a precisão intermediária, foram testadas réplicas da concentração a 100% em dias diferentes e com analistas diferentes. Ambos os parâmetros foram expressos através do coeficiente de variação (CV) entre as amostras.

2.3.5 - Limite de detecção e quantificação: foram obtidos a partir de curva de calibração determinada em triplicata nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0%.

2.3.6 – Exatidão: foi avaliada pelo teste de recuperação, analisando-se, em triplicata, amostras de concentração conhecida (0,004; 0,008 e 0,012 mg/mL) equivalentes a 50, 100 e 150%, respectivamente, da concentração teórica analisada.

2.3.7 – Robustez: a robustez do método avaliou as seguintes variáveis: comprimento de onda (± 2 nm) e marca do espectrofotômetro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da varredura do solvente e de soluções amostra e padrão, comprovou-se a especificidade do método, uma vez que o mesmo não sofreu interferência do solvente utilizado no comprimento de onda de detecção (271nm). Os espectros da varredura das soluções padrão e amostra foram idênticos, com pico em 271nm; já o espectro da varredura do solvente não apresentou nenhum pico de absorção.

Para o parâmetro de linearidade, os resultados estão ilustrados na Figura 1 e demonstraram que o método apresenta intervalo linear na faixa de 50 a 150%, com equação da reta $y = 57,835x + 0,0024$, correlacionando concentração da solução padrão de furosemida (x) e absorbância (y), onde $r = 1$.

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados. Tanto a repetibilidade quanto a precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação (CV) inferiores ao especificado pela resolução vigente, que é de 5,0% . Os valores encontrados foram de 0,79% e 0,96%, respectivamente, demonstrando que o método analítico possui precisão satisfatória dentro da faixa de concentração avaliada.

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações da amostra (50, 100, 150%). Para estas concentrações foram encontrados os respectivos percentuais de recuperação: 97,51%, 98,64% e 100,28%, que se encontram dentro da faixa estabelecida pelo laboratório (95-105%).

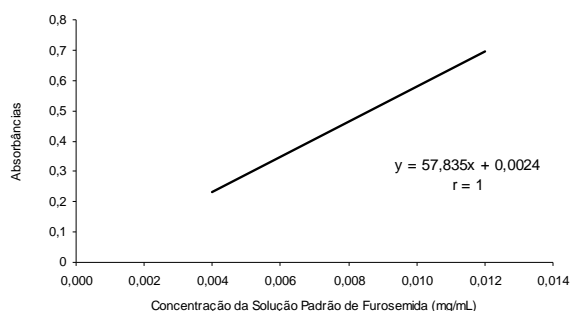


Figura 1 - Curva de regressão linear obtida da média de duas curvas de calibração.

Os limites de detecção ($2,77 \times 10^{-5}$ mg/mL) e de quantificação ($9,24 \times 10^{-5}$ mg/mL) obtidos demonstram que o método é bastante sensível. No entanto, é importante salientar que esses parâmetros foram avaliados, embora não sejam obrigatórios para testes enquadrados na Categoria I da Resolução 899/2003. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados relativos à robustez do método.

Tabela 1 – Robustez com relação ao equipamento e aos comprimentos de onda empregados.

Parâmetros		Abs1	Abs2	Abs3	Abs média	CV(%)
Espectrofotômetro	LCQM FF/UFG	0,4637	0,4654	0,4640	0,4644	0,33
	Lab. Enzimologia FF/UFG	0,4530	0,4520	0,4550	0,4533	
Comprimento de Onda	271 nm	0,4630	0,4642	0,4620	0,4631	0,10
	269 nm	0,4599	0,4599	0,4591	0,4596	
	273 nm	0,4457	0,4468	0,4460	0,4462	

Os resultados obtidos demonstram que o mesmo se apresentou robusto para variações de até 2 unidades no comprimento de onda e para variações da marca do espectrofotômetro. Os coeficientes de variação obtidos estão dentro dos limites preconizados.

4. CONCLUSÃO

Os resultados da validação do método para determinação do teor de furosemida matéria-prima comprovaram que este é preciso, exato, específico e linear, demonstrando a sua aplicabilidade na rotina de controle de qualidade. Representa, portanto, uma alternativa para a quantificação desta substância ativa no teste de determinação do teor, uma vez que apresenta a confiabilidade requerida para um método analítico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Parte II, 3º Fasc., 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

DUARTE, L. T.; SILVA, E. M.; SOUSA, A. L.; LOPES, E. F.; MORAIS, H. L.; BARA, M. T. F. Desenvolvimento e validação de metodologia espectrofotométrica para doseamento de furosemida matéria-prima. **Anais eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica**, Goiânia: UFG, 2007. n.p.

¹ Farmacêutica do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM). Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás, livinhatduarte@yahoo.com.br

² Bolsista do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM). FF – UFG.

³ Coordenadora do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM). FF – UFG, mtbara@gmail.com