



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DOSEAMENTO DE FUROSEMIDA MATÉRIA-PRIMA**

Developed and validation of spectrophotometrical analytical method for quantification of furosemide raw material

**Lívia Teixeira Duarte; Ezequiane Machado Silva; Cláudia Gomes Miranda;
Emília Ferreira Lopes; Hanna Lopes Moraes; Izabella Lobo;
Clévia Ferreira Duarte Garrote; Maria Teresa Freitas Bara***

Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM),
Faculdade de Farmácia; Universidade Federal de Goiás

*Autor para correspondência e-mail: mbara@farmacia.ufg.br

Recebido em 18/06/2008 - Aceito em 11/02/2009

RESUMO:

Furosemida é um fármaco que atua como diurético empregado no tratamento de hipertensão leve a moderada. Dentre as metodologias utilizadas para sua determinação, destaca-se a possibilidade de quantificação da furosemida por meio de métodos espectrofotométricos, por apresentarem boa sensibilidade e ter custos mais acessíveis. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação deste fármaco em matéria-prima, utilizando a espectrofotometria de ultravioleta. O método empregado demonstrou ser simples, rápido, específico, linear, exato, preciso e robusto para ser executado na rotina de um laboratório de controle de qualidade, sendo uma alternativa aos procedimentos utilizados. Ao aplicar o método desenvolvido neste estudo para a análise de uma solução oral de furosemida constatou-se necessidade e a importância de se validar o protocolo analítico de acordo com a formulação produzida.

PALAVRAS-CHAVE: furosemida, controle de qualidade, espectrofotometria, metodologia analítica, validação.

ABSTRACT:

The furosemide is a drug that acts as diuretic been used to treat arterial hypertension. Among the methods used for their determination, there is the possibility of quantification of furosemide by spectrophotometric methods, for presenting good sensitivity and have more affordable cost. This study aimed to develop and validate an analytical methodology for determination of this drug in raw material, using ultraviolet spectrophotometry. The method employed proved to be simple, rapid, specific, linear, accurate, precise and robust to run in a routine of a laboratory of quality control, being an alternative to procedures used. By applying the method developed in this study for the analysis of a oral solution of furosemide it was noted the need and importance of validating the analytical protocol in accordance with the formulation produced..

KEYWORDS: furosemide, quality control, spectrophotometry, analytical methodology, validation.

INTRODUÇÃO:

A furosemida (Figura 1) é um diurético de alça que atua predominantemente no segmento ascendente espesso da alça de Henle, induzindo a secreção de água e eletrólitos. É eliminado na urina tanto por filtração glomerular quanto por secreção tubular e uma pequena porção deste fármaco é metabolizada no fígado e eliminada nas

fezes. Além de sua utilização nos estados edematosos habituais associados à insuficiência cardíaca congestiva, à cirrose ou às doenças renais, a furosemida pode ser administrada em casos de emergência, como edema pulmonar agudo, quando o rápido início de ação é essencial (WESTFAL, 2005). É também indicada para o tratamento de hipertensão arterial leve a moderada (LOPES & MARTINELLI, 2006).

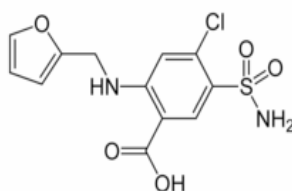


Figura 1 – Estrutura química da furosemida

O desenvolvimento de um novo método analítico deve garantir informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra e este deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.* 2004; LEITE, 1994). A validação de um novo método analítico 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).

A monografia da furosemida – matéria-prima – está presente na Farmacopéia Brasileira 4^a edição, 3^o

fascículo (2001), na qual o doseamento é feito por titulação em meio não aquoso. Entretanto, este mesmo compêndio traz a monografia de comprimido de furosemida por um método espectrofotométrico. Considerando-se que o método titulométrico possui menor sensibilidade e pode sofrer maior número de interferências quando comparado ao método espectrofotométrico, o presente trabalho tem como objetivo aplicar e validar o método descrito para comprimidos na quantificação de furosemida - matéria-prima. Além disso, visou-se investigar a interferência que um método analítico pode sofrer devido a alterações nos componentes da formulação da solução oral.

MÉTODO:**Material e equipamento:****Material:**

Foram utilizados: substância química de referência furosemida (Farmacopéia Brasileira) - teor de 100,0 % - e matéria-prima de furosemida 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).

Equipamentos e condições analíticas:

Como pré-requisito para validação de métodos analíticos, os equipamentos e instrumentos foram previamente qualificados e certificados.

Para as leituras das absorvâncias, foram utilizados espectrofotômetros das marcas Cary 50 Bio (Varian) e B582 (Micronal), no comprimento de onda de 271 nm. O ajuste do zero foi feito com solução de hidróxido de sódio 0,1M.

Doseamento de Furosemida (matéria-prima e solução oral):

- Preparo do padrão:

Pese o equivalente a 40 mg (0,040g) de furosemida padrão, transfira para balão

volumétrico de 100 mL, complete o volume com NaOH 0,1M, agite mecanicamente por 10 minutos. Pipete, volumetricamente, 1 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL, solubilize e complete o volume com NaOH 0,1 M.

Concentração final do padrão: $8,0 \times 10^{-6}$ g/mL.

- Preparo da amostra:

Transfira o equivalente a 100 mg de furosemida para balão volumétrico de 250 mL. Dissolva em 150 mL de NaOH 0,1M, agite mecanicamente por 10 minutos. Complete o volume com NaOH 0,1M, homogeneíze, filtre e dilua 5 mL do filtrado para 250mL de NaOH 0,1M, faça a leitura.

Meça as absorvâncias das soluções resultantes em 271 nm, utilizando o NaOH 0,1M como branco.

→ Cálculos:

$$T = \frac{C_p \times A_a \times 100}{C_{ta} \times A_p}$$

Onde:

T = teor da amostra em porcentagem;

C_p = concentração do padrão (mg/mL);

A_a = absorvância da amostra;

C_{ta} = concentração teórica da amostra;

A_p = absorvância do padrão.

Estudo da validação:

Os parâmetros avaliados na validação do método para furosemida (matéria-prima) foram especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

- 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.

- 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).

- Intervalo: foi determinado a partir do estudo de linearidade.

- 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.

- Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ): 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%. LQ foi estabelecido por meio da equação: $LQ = DP_a \times 10 / IC$; em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

LD, foi determinado pela equação: $LD = DP_a \times 3 / IC$; em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

- 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.

- Robustez: a robustez do método avaliou as seguintes variáveis: comprimento de onda ($\pm 2\text{nm}$) e marca do espectrofotômetro.

Estudo da possibilidade de análise de uma solução oral de furosemida pelo método usado para matéria-prima:

Na investigação da aplicabilidade do método validado para matéria-prima ser empregado na análise de soluções de furosemida foram manipuladas duas formulações distintas, descritas no Quadro 1.

Formulação 1:		Formulação 2:	
Furosemida	1,0g	Furosemida	1,0g
Etanol	10% v/v	Etanol	5% v/v
Glicerina	10% v/v	Glicerina	10% v/v
Hidróxido de sódio 20%	pH 8,0 a 9,5	Hidróxido de sódio 20%	pH 8,0 a 9,5
EDTA-Na ₂	0,1% p/v	EDTA-Na ₂	0,1% p/v
Sulfito de sódio	0,1% p/v	Metabissulfito de sódio	0,1% p/v
Metilparabeno	0,005% p/v	Metilparabeno	0,05% p/v
Propilparabeno	0,002% p/v	Propilparabeno	0,02% p/v
Sorbitol 70%	qsp (100mL)	Sorbitol 70%	qsp (100mL)

Quadro 1- Formulações de soluções orais de furosemida analisadas

Para ambas as formulações foram preparados, em paralelo, uma solução matriz (placebo) contendo apenas os excipientes. Os reagentes utilizados foram hidróxido de sódio (Biotec) e água destilada.

As soluções amostra, padrão e a matriz foram preparadas a partir da solubilização em hidróxido de sódio 0,1M, segundo metodologia adaptada da Farmacopéia Brasileira, 2001. As soluções resultantes foram submetidas à varredura em espectrofotômetro na faixa de 200 a 800nm. Construiu-se a partir da solução padrão uma curva de calibração na faixa de 50 a 150% da concentração de trabalho (0,008mg/mL), a partir da qual calculou-se a porcentagem de interferência da matriz.

RESULTADOS:

Dentre as atribuições de um laboratório de controle de qualidade destaca-se a garantia de que sejam feitas as validações necessárias, de procedimentos analíticos, calibração e qualificação dos equipamentos e vidrarias de precisão (LACHMAN et al., 2001; PINTO et al, 2003; CIRILO et al., 2007).

Neste estudo, comprovou-se a especificidade do método para análise da furosemida matéria-prima, 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.

Os resultados para o parâmetro de linearidade (Figura 2) demonstraram que o

método apresenta intervalo linear na faixa de 50 a 150%.

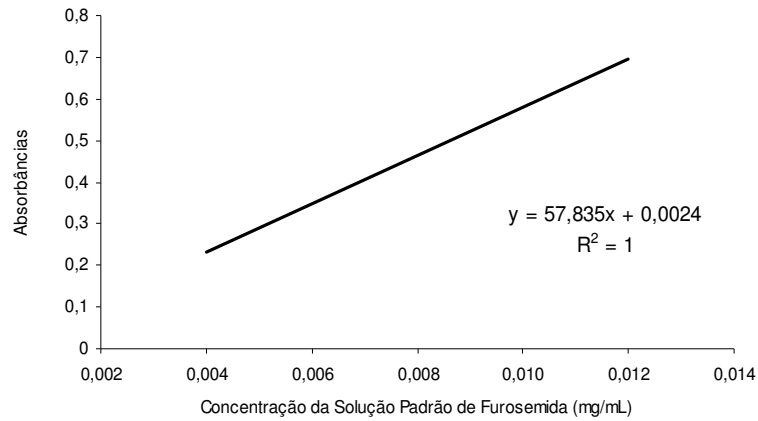


Figura 2 - Curva de calibração da Furosemida SQR.

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados (Tabelas 1 e 2), com coeficientes de variação (CV) inferiores ao especificado pela resolução vigente (5,0%), dentro da faixa de concentração avaliada.

Tabela 1 – Resultados da precisão (repetibilidade)

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias
D_1	40,4	0,00808	0,00809	100,13	0,4703
D_2	40,8	0,00816	0,00804	98,53	0,4674
D_3	40,7	0,00814	0,00796	97,84	0,463
D_4	40,5	0,00810	0,00805	99,37	0,4679
D_5	40,9	0,00818	0,00807	98,61	0,4689
D_6	40,4	0,00808	0,00800	99,04	0,4652
				Média	
				98,92	
				DP	
				0,786102175	
				DPR	
				0,794703552	

Tabela 2 – Resultados da precisão intermediária

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Teor (%)	Absorbâncias
D_1	40,2	0,00804	0,00804	100,02	0,4675
D_2	40,4	0,00808	0,00811	100,41	0,4716
D_3	40,0	0,00800	0,00809	101,11	0,4702
D_4	40,1	0,00802	0,00804	100,25	0,4674
D_5	40,6	0,00812	0,00815	100,36	0,4737
D_6	40,5	0,00810	0,00811	100,11	0,4714
				Média	
				100,38	
				DP	
				0,385658241	
				DPR	
				0,384212534	

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações da amostra e os valores encontrados encontraram dentro da faixa de 97,51 a 100, 28% (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados da exatidão

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias	Média Recuperação (%)	DP	DPR	Recuperação (mg/mL)
D_1	20,2	0,00404	0,00393	97,24	0,2296				0,003928417
D_2	20,1	0,00402	0,00399	99,36	0,2334	97,5147	1,7200	1,76	0,003994121
D_3	20,3	0,00406	0,00390	95,95	0,2277				0,003895565
D_4	40,8	0,00816	0,00803	98,36	0,4666				0,008026282
D_5	40,5	0,00810	0,00805	99,41	0,4681	98,6448	0,6701	0,68	0,008052218
D_6	40,9	0,00818	0,00803	98,16	0,4668				0,00802974
D_7	60,1	0,01202	0,01207	100,45	0,7007				0,012074004
D_8	60,2	0,01204	0,01206	100,17	0,6999	100,28	0,1478	0,15	0,012060171
D_9	60,3	0,01206	0,01209	100,23	0,7015				0,012087836

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 sensível. É importante salientar que esses parâmetros foram avaliados, embora não sejam obrigatórios para os testes

enquadrados na Categoria I da Resolução 899/2003 (BRASIL, 2003).

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 (Tabela 4). dentro dos limites preconizados. Os coeficientes de variação obtidos estão

Tabela 4 – Robustez com relação ao equipamento e aos comprimentos de onda empregados

Parâmetros		Abs1	Abs2	Abs3	Abs média	Concentração (mg/mL)	CV(%)
Espectrofotômetro	LCQM FF/UFG	0,4637	0,4654	0,4640	0,4644	0,0080	0,33
	Lab. Enzimologia FF/UFG	0,4530	0,4520	0,4550	0,4533	0,0078	
Comprimento de Onda	271 nm	0,4630	0,4642	0,4620	0,4631	0,0080	0,10
	269 nm	0,4599	0,4599	0,4591	0,4596	0,0079	
	273 nm	0,4457	0,4468	0,4460	0,4462	0,0077	

Abs = absorvância

Com a intenção de realizar uma investigação da aplicabilidade de uso do método validado para furosemida matéria-prima na análise de um produto acabado (solução oral), iniciou-se com o ensaio de especificidade, que é um dos parâmetros relacionados à validação de produtos acabados e demonstra a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A partir dos espectros de absorção das soluções amostra, padrão e matriz comprovou-se a interferência dos constituintes da formulação 2 na especificidade do método (Figuras 3 e 4). No espectro da Formulação 1 foram observados picos de absorvância no

comprimento de onda de 271 nm para o padrão e a amostra, não sendo observado pico significativo na varredura da solução matriz (Figura 3). O espectro da Formulação 2 apresentou picos de absorvância em 271 nm para a solução amostra e padrão, entretanto a solução matriz apresentou pico em 294 nm, demonstrando a interferência dos componentes da formulação na especificidade do método (Figura 4).

Pode-se verificar na formulação 2 uma menor concentração de etanol, maior concentração de parabenos e a substituição de sulfito por metabissulfito de sódio (Figura 4). Não foi investigado qual (s) destes adjuvantes farmacotécnicos ocasiona(m) a absorção em comprimento de onda próximo ao do princípio ativo (furosemida).

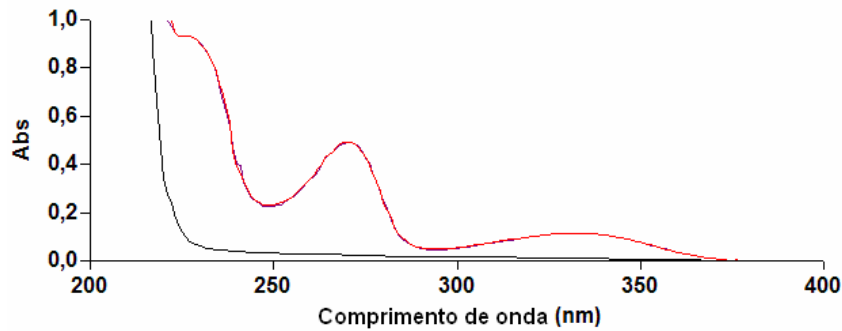


Figura 3 - Espectro de absorção da matriz (preto), amostra e padrão sobrepostos (vermelho).

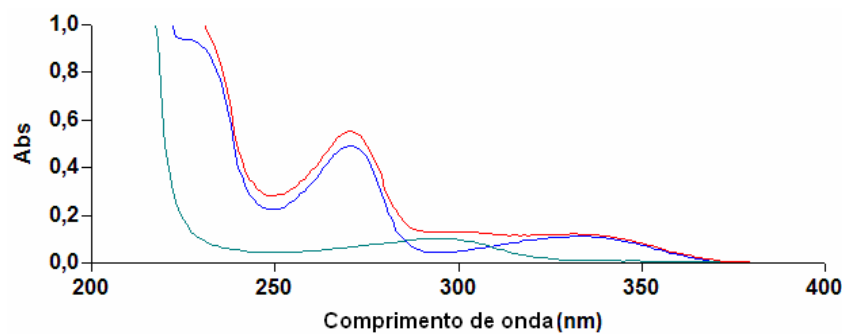


Figura 4 - Espectro de absorção da matriz (verde), amostra (vermelho) e padrão (azul).

A porcentagem de interferência da matriz da formulação 2 foi de 8,97%. Este valor foi calculado através da equação da reta $y = 57,835x + 0,0024$. Deste modo, demonstrou-se que a formulação 2 não pode ser analisada por este método espectrofotométrico. Pode-se empregar outro método, a ser desenvolvido, possivelmente por cromatografia líquida de alta eficiência para análise desta formulação ou alterar a formulação, por exemplo, usando a de número 1, que não

sofreu interferência conforme a matriz. Estes resultados reforçam a teoria de que um mesmo método analítico pode ser capaz de analisar a matéria-prima, porém não estar apto para a análise de formulações desta matéria-prima.

O método, quando aplicado na análise da formulação 1, mostrou ser preciso (Tabelas 5), entretanto não foi exato em relação ao DPR, ao se pesar uma massa de 50% (Tabela 6).

Tabela 5- Precisão intra-corrída/repetibilidade (solução oral de furosemida)

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias
D_1	100	0,00800	0,00912	114,01	0,5299
D_2	100	0,00800	0,00908	113,53	0,5277
D_3	100	0,00800	0,00898	112,28	0,5219
D_4	100	0,00800	0,00863	107,87	0,5015
D_5	100	0,00800	0,00869	108,65	0,5051
D_6	100	0,00800	0,00907	113,40	0,5271
				Média	
				111,63	
				DP	
				2,678422371	
				DPR	
				2,399481986	

Tabela 6 – Exatidão/recuperação (solução oral de furosemida)

Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias	Média Recuperação (%)	DP	DPR	Recuperação (mg/mL)
50	0,00400	0,00474	118,53	0,2766				0,004741074
50	0,00400	0,00366	91,38	0,2138	104,7376	13,5783	12,96	0,003655226
50	0,00400	0,00417	104,31	0,2437				0,004172214
100	0,00800	0,00911	113,86	0,5292				0,009108671
100	0,00800	0,00914	114,25	0,531	114,3483	0,5473	0,48	0,009139794
100	0,00800	0,00920	114,94	0,5342				0,009195124
150	0,01200	0,01288	107,37	0,7476				0,012884931
150	0,01200	0,01287	107,24	0,7467	107,51	0,3513	0,33	0,01286937
150	0,01200	0,01295	107,91	0,7513				0,012948906

A robustez do método foi comprovada, os resultados demonstram que as variações de até 2 unidades no comprimento de onda e variações da marca do espectrofotômetro não interferem no método analítico.

CONCLUSÃO:

Os resultados da validação do método para determinação do teor de furosemida matéria-prima comprovaram que este é preciso, exato, linear, robusto e demonstrou especificidade. Portanto, demonstrou-se sua aplicabilidade na rotina de um laboratório de controle de qualidade. O método proposto neste trabalho representa uma alternativa para a quantificação de furosemida, uma vez que apresenta a confiabilidade requerida para um método analítico.

Em relação à análise do produto acabado, o presente trabalho demonstrou a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos específicos para os diversos produtos acabados e assim, verifica-se a importância de se validar o método de acordo com a formulação desenvolvida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

WESTFALL, D.P. Drogas anti-hipertensivas. In CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, São Paulo: Atheneu Editora, 2001.

CIRILO, H.N.C.; BARA, M.T.F.; GIL, E.S. Implantação do controle de qualidade. In GIL, E.S. Controle de qualidade físico-químico de qualidade de medicamentos. São Paulo: Pharmabooks. 2007.

LACHMAN, L.; HANNA, S. A.; LIN, K. Controle e Garantia de Qualidade. In LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. v. II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LEITE, F. Validação em análise química. Campinas: Editora Átomo, 2002.

PINTO, T. J. A.; KANECO, T. M.; OHARA, M. T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova. v. 27, n. 5, p. 771- 780, 2004.

LOPES, A.A.; MARTINELLI, R. Farmacologia dos diuréticos. In SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.