

ALTERNATIVA PARA O DOSEAMENTO DE METILDOPA COMPRIMIDO: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

JOSÉ LAMARTINE SOARES SOBRINHO^{1,2}
LÍVIO CÉSAR CUNHA NUNES¹
SEVERINO GRANGEIRO JUNIOR²,
SELMA VERÔNICA VIEIRA RAMOS²
PEDRO JOSÉ ROLIM NETO^{1,2}

1. Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas-UFPE – Av. Prof. Arthur de Sá S/N, Cidade Universitária, 50.740-021 – Recife-PE
2. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco-LAFEPE, Largo de Dois Irmãos 1117, 52171-010 – Recife – PE

Autor responsável: P.J.Rolim Neto. E-mail: prolim@ufpe.br

INTRODUÇÃO

Dados analíticos não confiáveis, mal interpretados e/ou duvidosos, em se tratando de análise de fármacos, pode trazer prejuízos incalculáveis para a saúde pública. A necessidade de se comprovar a confiabilidade das medições, evitando-se possíveis erros, ou, melhor ainda, tê-los estimados, conduziu ao uso de ferramentas estatísticas para validar o método analítico. A Validação de metodologia analítica é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e se constitui numa das exigências das normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) vigentes. Os métodos de ensaio para avaliar a conformidade dos produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (BARROS, 2002).

Vários órgãos nacionais e internacionais elaboraram e divulgaram diretrizes que compõe documentos oficiais com a metodologia a ser empregada nos processos de validação (WHO, 1992; CODEX, 1995; ICH, 1995; ISO/IEC, 1999; EUROPEAN COMMISSION, 2000; US-FDA, 2001; INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; USP 28, 2005).

A validação de método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/ IEC 17025, 2001). O uso de ferramentas estatísticas adequadas tais como teste T Student e teste F, análise de variância, regressão linear entre outras, estão indicadas para demonstração dessa evidência objetiva da validade do método (BARROS, 2002).

A Farmacopéia Americana (USP 28, 2005), na seção ensaios gerais, apresenta recomendações para a validação de método analíticos, e afirma que a mesma é um processo que fornece uma evidência documentada, através de estudos de laboratório, de que as características de desempenho

ou parâmetros analíticos do método alcançam os requisitos para aplicações analíticas pretendidas. Dessa forma, a validação de metodologia pode ser definida como demonstração de que o método “é adequado ao uso” pretendido.

O desenvolvimento da metodologia analítica, aqui, executado, foi embasado em pesquisas bibliográficas realizadas nos Compêndios Oficiais.

De acordo com a Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de especificidade/seletividade, curva de calibração/ linearidade, intervalos da curva de calibração, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e robustez.

Tanto a USP (The United States Pharmacopeia) quanto ICH (International Conference of Harmonization) reconhecem que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados.

O processo de validação pode dividir os ensaios analíticos em 4 categorias, dependendo dos parâmetros analisados:

- Categoria – I Quantificação do componente em maior quantidade ou ingrediente ativo.
- Categoria – II Determinação de impurezas ou produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matéria-prima.
- Categoria – III Determinação das características de performance, como por exemplo: dissolução, liberação do ativo.
- Categoria – IV Testes de identificação.

OBJETIVO

Validar a metodologia analítica de doseamento do comprimido de Metildopa 500 mg produzido pelo Lafepe, garantindo assim, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, exigidas pela Anvisa, de acordo com a Resolução nº 899, assegurando a confiabilidade dos resultados.

METODOLOGIA

Utilizaram-se vidrarias calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Pyrex®, espectrofotômetro da Marca Shimadzu, com duplo feixe, modelo N-2401 PC, com detector de UV-Vis 190 a 800nm, possuindo lâmpada deutério e tungstênio. A calibração do equipamento espectrofotômetro foi realizada, através de padrões de referência, rastreado pelo NIST (*National Institute of Standards and Technology*), balança utilizada foi uma Sartorius CP 225 D, com capacidade máxima de 220g, ultra sonic cleaner, modelo: USC-1880 e um agitador magnético Fanem, modelo: 258.

Utilizou-se padrões de metildopa, USP, Lote I e metildopa matéria-prima, Lote 016589 (secundarizada frente ao padrão primário USP).

O método consta em uma preparação de concentração final de 50 µg/mL com ácido clorídrico a 0,1N, comprimento de onda 279 nm e ácido clorídrico a 0,1N como branco.

A preparação do placebo consistiu em pesar precisamente todos os constituintes inertes: EDTA titriplex, Metabissulfito de sódio, PVP-K30, Estearato de Magnésio, Glicolato de Amido Sódico, Ácido Cítrico, Celulose Microcristalina (MC-101).

Para a preparação das amostras da exatidão, pesou-se precisamente a metildopa matéria-prima, em quantidades equivalentes a 50%, 100% e 150% da concentração teórica do comprimido, bem como todos os constituintes inertes: EDTA titriplex, metabissulfito de sódio, PVP-K30, estearato de magnésio, glicolato de amido sódico, ácido cítrico, celulose microcristalina (MC-101).

Foram avaliados os parâmetros de especificidade/ Seletividade, curva de calibração/ Linearidade, intervalos da curva de calibração, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e robustez.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, foi realizado um espectro de varredura no UV-Vis no intervalo de 200 a 400 nm com o objetivo de evidenciar o melhor comprimento de onda para a análise. A região de máxima absorvância da metildopa acontece a 279 nm, comprovando experimentalmente o conhecimento teórico como mostra a figura 1.

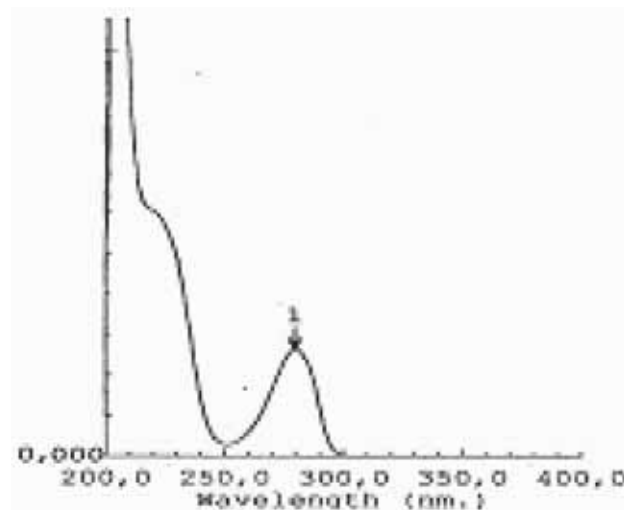


Figura 1. Varredura espectrofotométrica no intervalo de 200 a 400 nm.

A concentração, em µg/mL, de metildopa, nas amostras durante a validação, foi determinada, através da relação entre a média da absorvância do padrão USP, e a absorvância da amostra em análise, estando as soluções padrão e amostra nas mesmas concentrações de 50 µg/mL (concentração média de análise).

ROBUSTEZ

Foram analisadas amostras em triplicata para cada parâmetro de variação estudado: tipo de agitação, tempo de sonicação e concentração da solução de ácido clorídrico. Todas as amostras utilizadas nos estudos de robustez apresentavam concentração média de 50 µg/mL. Os resultados estão expostos nas Tabelas 02, 04 e 06.

Tabela 1. Robustez – tipo de agitação.

Tipos de Agitação	Amostras – µg/mL		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Agitador Magnético (25 min)	47,73	47,80	47,88
Sonicador (25 min)	48,11	47,58	47,50
DP	0,2687	0,1556	0,2687
CV(%)	0,5607	0,3262	0,5634

Tabela 2. Robustez – Tipo de agitação -Teste-t.

	Sonicação	Agitação magnética
Média	47,80	47,73
Variância	0,0056	0,1099
Stat t		0,3736
P(T<=t) bi-caudal		0,7276
t crítico bi-caudal		2,7764

Tabela 3. Robustez tempo de sonicação.

Tempos de Agitação	Amostras – µg/mL		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
25 min	46,97	46,89	46,89
30 min	46,97	46,97	47,04
DP	0,0000	0,0566	0,1061
CV(%)	0,0000	0,1205	0,2258

Tabela 4. Robustez – Tempo de agitação – Teste-t.

	25min	30min
Média	46,91	46,99
Variância	0,0021	0,0016
Stat t	2,1636	
P(T<=t) bi-caudal	0,0964	
t crítico bi-caudal	2,7764	

Tabela 5. Robustez concentração da solução de ácido clorídrico.

Conc. Ác. Clorídrico	Amostras – µg/mL		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
0,08 N	47,58	47,88	48,25
0,1 N	48,03	48,18	48,33
0,12 N	48,18	48,26	48,33
DP	0,3122	0,2003	0,0462
CV(%)	0,6515	0,4164	0,0956

Para os tipos de agitação e tempo de sonicação das soluções estudadas, verificou-se, através do Teste-t, que não há diferença estatisticamente significativa com um nível de 95% de confiança entre a média das concentrações. O método de doseamento do comprimido de metildopa é robusto, pois, de acordo com os resultados obtidos, não apresentou diferença relevante nos parâmetros avaliados.

Tabela 6. Robustez – concentração da solução de ácido clorídrico – ANOVA.

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,62E-05	2	1,81E-05	2,144737	0,198278	5,143249
Dentro dos grupos	5,07E-05	6	8,44E-06			
Total	8,69E-05	8				

Tabela 7. Curva média de calibração da linearidade.

CONCENTRAÇÃO µg/mL	ABSORVÂNCIAS			MÉDIA	CV %
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
30	0,398	0,397	0,401	0,399	0,5221
40	0,529	0,530	0,532	0,530	0,2880
50	0,660	0,659	0,661	0,660	0,1515
60	0,792	0,793	0,792	0,792	0,0728
70	0,922	0,920	0,929	0,924	0,5116

Adotou-se, porém como modo de agitação apenas a sonicação por 25 min, uma vez que a outra maneira testada não mostrou variação significativa como pode ser visto nas Tabelas 3 e 4. Para o terceiro parâmetro avaliado, durante o estudo – concentração da solução –, verificou-se estatisticamente, através do Anova-fator único, para duas amostras, resumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados, admitindo-se um nível de 95% de intervalo de confiança entre a média das absorvâncias. O método de doseamento do comprimido de metildopa é robusto à variação da concentração de ácido clorídrico, pois de acordo com os resultados obtidos, não apresentou diferença estatisticamente significativa no parâmetro avaliado como demonstra a Tabela 5 e 6.

LINEARIDADE

Os resultados do estudo da linearidade estão agrupados na Tabela 7, bem como a média dos pontos estudados.

Os resultados dos pontos das três curvas de linearidade foram plotados na Figura 2 (x, y), concentração de metildopa X, absorvância Y e pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação da reta $y = 0,0132x + 0,0014$.

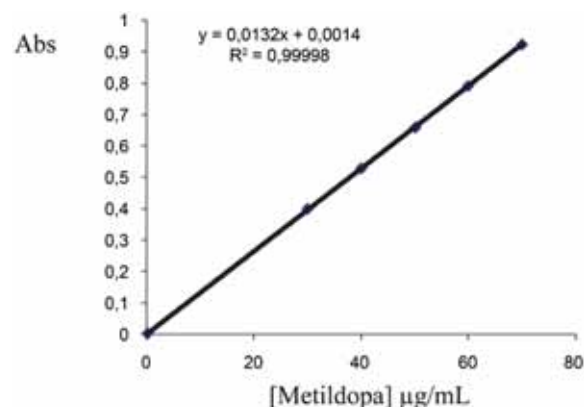
**Figura 2.** Linearidade do método.

Tabela 8. Linearidade do método – ANOVA.

Fonte	SQ	gl	MQ	F	F-crítico
Modelo SQ reg	0,513782533	1	0,513782533	1,2278	4,6672
Residual SQ res	5,44E-05	13	4,18462E-06	Curva Linear *	
Falta de ajuste SQ faj	6,4E-06	3	2,13333E-06	0,44444	3,7083
Erro puro SQ erp	4,8E-05	10	4,8E-06	Não há falta de ajuste**	
Total SQ tot	0,513836933	14	0,036702638		

*Regressão estatisticamente significativa. **Proporcionando uma curva linear.

A análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados demonstrou um coeficiente de correlação $R^2 = 0,99998$ valor que comprova a linearidade do método.

Através da análise de Variância (Tabela 8), podemos testar a validação do modelo linear e a significância estatística da curva ajustada. Podemos verificar se houve falta de ajuste, através da razão entre as médias quadráticas, devido à falta de ajuste e as médias quadráticas, devido aos erros puros. Esta relação apresentou um valor de $F = 0,44444$, abaixo do valor crítico tabelado (3,7083) com 3 e 10 graus de liberdade e 95% de confiança mostrando que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada (PIMENTEL & NETO, 1996).

O gráfico de regressão linear (Figura 2) apresentou uma reta com um $R^2_{\text{explicável}} = 0,99998$ calculado a partir da relação entre $R^2 / R^2_{\text{máximo}}$, onde o R^2 é calculado pela razão entre a $SQ_{\text{reg}} / SQ_{\text{tot}}$ e o $R^2_{\text{máximo}}$ é calculado pela equação $SQ_{\text{tot}} - SQ_{\text{erp}} / SQ_{\text{tot}}$.

A curva de regressão apresentou um $R^2 = 0,99998$, calculado a partir da relação entre a soma quadrática devido à regressão e a soma quadrática total.

$$R^2 = \frac{SQ_{\text{reg}}}{SQ_{\text{tot}}} = \frac{0,513782533}{0,513836933} = 0,99989$$

O valor máximo que R^2 poderia assumir pode ser dado pela expressão:

$$R^2_{\text{máximo}} = \frac{SQ_{\text{tot}} - SQ_{\text{erp}}}{SQ_{\text{tot}}} = \frac{0,513836933 - 0,00048}{0,513836933} = 0,99991$$

Como a capacidade explicativa de um modelo pode ir de zero até no máximo SQ_t , $0 \leq R^2 \leq 1$. Quanto mais próximo de 1 (um) estiver o R^2 , melhor o modelo consegue descrever a variação em Y. Assim, $0,99989 / 0,99991 = 0,99998$, o modelo pode explicar praticamente 100% da variância máxima, o que é considerado um valor excelente.

PRECISÃO

Repetitividade

Nos ensaios de repetibilidade foram realizadas 06 determinações a 50 $\mu\text{g/mL}$, referente a 100% da concentração. A precisão intermediária foi realizada em diferentes dias e com diferentes analistas, utilizando a mesma con-

centração citada acima e analisados em relação ao padrão secundário. Seus resultados estão agrupados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da Repetitividade.

Amostra	$\mu\text{g/mL}$
01	48,48
02	48,10
03	48,33
04	48,10
05	48,10
06	48,03
Média	48,19
DP	0,1755
CV%	0,3641

Observando-se os resultados, podemos concluir que o método tem uma boa repetibilidade, visto que o coeficiente de variação é inferior ao especificado pela Resolução RE nº 899 vigente que especifica o limite do coeficiente de variância de 5,0%.

PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão intermediária (Tabela 10 e 11) foi realizada, em dias diferentes, com dois analistas. O estudo da precisão do método entre ensaios demonstrou que não há grandes diferenças entre as amostras pesquisadas individualmente em pequeno intervalo de tempo. A precisão entre dias e entre analistas foi realizada e os resultados encontrados demonstram que mesmo havendo variações entre dias e entre analistas, estas se enquadram dentro dos limites especificados.

LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Uma vez observada a linearidade do método, podem ser calculados os valores de LD e LQ utilizando a média do desvio padrão (DP) do primeiro ponto da reta e coeficientes angulares (ic).

$$LQ = \frac{DP \times 10}{ic} \implies LQ = \frac{0,0021 \times 10}{0,0132} = 1,572 \mu\text{g/mL}$$

$$LD = \frac{DP \times 3,0}{ic} \implies LD = \frac{0,0021 \times 3,0}{0,0132} = 0,4731 \mu\text{g/mL}$$

Tabela 10. Precisão intermediária.

Dias/Analistas		Amostra-1 µg/mL	Amostra-2 µg/mL	Amostra-3 µg/mL
Dia-1	Analistas-1	48,48	48,56	48,33
Dia-2		48,10	48,33	48,8
Dia-1	Analista-2	48,18	48,03	47,87
Dia-2		48,10	47,95	47,8
CV%		0,3747	0,5825	0,9626

Tabela 11. Precisão intermediária – ANOVA.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado
Analistas	0,012717	2	0,006358	0,105324	5,143249
Dias	0,606158	3	0,202053	3,346938	4,757055
Erro	0,362217	6	0,060369		
Total	0,981092	11			

Tabela 12. Resultados de LD e LQ.

RESULTADOS	
LD (µg/mL)	0,4731
LQ (µg/mL)	1,1572

Os limites LD e LQ (Tabela 12) obtidos de acordo com o tratamento descrito, mostram que o método é bastante sensível ao princípio ativo e que, da ordem de grandeza que foi obtido, poderão servir como um excelente critério de aceitação, sendo desta forma resultados de grande expressão para uma posterior validação de limpeza.

ESPECIFICIDADE

Foi preparado um placebo de metildopa comprimido, o qual foi analisado em triplicata obedecendo à técnica em estudo. Os resultados obtidos estão agrupados na tabela 13.

Tabela 13. Dados da especificidade das áreas do metildopa.

Amostra	METILDOPA Absorvância
1	0,001
2	0,002
3	0,001

Tabela 14. Resultados da Exatidão.

Determinações	Concentração µg/mL / %					
	25 µg/mL	%	50µg/mL	%	75 µg/ mL	%
1	24,46	48,93	50,00	100,00	74,62	149,24
2	25,00	50,00	50,15	100,30	74,77	149,54
3	25,30	50,60	49,92	99,84	74,77	149,54
MEDIA	24,92	49,85	50,02	100,05	74,72	149,44
DP	0,0055	0,4218	0,1157	0,2314	0,0875	0,1749
CV (%)	1,6923	1,6923	0,2313	0,2313	0,1170	0,1170

EXATIDÃO

A determinação da exatidão (Tabela 14) foi realizada, no mesmo dia, com três concentrações diferentes (baixa, média e alta) 25,0 (50%); 50,0 (100%); 75,0µg/mL (150%). Os resultados são expressos como percentual de recuperação.

Tabela 15. Exatidão – teste t de Student.

Percentual	F	F crítico
50%	0,6225	4,3030
100%	0,3779	
150%	3,1125	

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações diferentes (50%, 100%, 150%) e o percentual de recuperação, nas três concentrações analisadas, encontrou-se dentro dos limites, como mostram os resultados na Tabela 15. O estudo estatístico aplicado foi o teste T de Student o qual demonstrou que o T calculado foi menor que o T tabelado comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das três concentrações analisadas.

CONCLUSÕES

O método apresentado é considerado um método alternativo, por não constar descrito em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela Anvisa. Foi validado segundo a Resolução RE Nº 899 em vigor. Os resultados obtidos mostram que o método atende aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório, pois apresenta a sensibilidade, a reprodutibilidade, a precisão, a robustez, a linearidade e finalmente a confiabilidade requerida para um método analítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003, "Diário Oficial da República Federativa do Brasil", Brasília. DOU de 02/06/2003.
- BARROS, C. B., Validação de métodos analíticos, *Biológico*, v.64, n.2, p.175-177, 2002.
- BRITTAIN, H. G., Validação de Métodos Analíticos Não Cromatográficos, *Pharmaceutical Technology*, v.2, Junho, p.4-9, Brasileira, 1998.
- Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling; Criteria for evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex purposes, CX/MAS 95/3, 1995.*
- European Commission; Guidance Document on Residue Analytical Methods, SANCO/825/00, 2000.*
- GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry News & Features*, p.305-309, 1996.
- ICH, *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A. "Text on Validation of Analytical Procedures" March 1995, Genebra.*
- Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- International Standart Organization; General Requeriments for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.*
- JEFFERY, G.H., BASSETT, J., MENDHAM, J., DENNEY, R.C. Análise Química Quantitativa 5 ed., Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, p. 213-214, 1992.
- LEITE, F., Validação em Análise Química, 3 ed., Átomo: São Paulo, p. 24-224, 1989.
- SWARTZ, M. R & KRULL, I. S., Validação de Métodos Cromatográficos, *Pharmaceutical Technology*, v.2, n.1, p.12-20, Brasileira: São Paulo, 1998.
- PIMENTEL, M.F.; BARROS NETO, B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*. v.19, n.3, p.268-77, 1996.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.*
- USP, United States Pharmacopoeia – USP/NF, Ed 28 (USA, 2005).*
- World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Thirty-second report, WHO Technical Report Series, No.823, Geneva, 1992.*