

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

CLÁUDIA CRISTINA MACHADO

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE MATÉRIA-PRIMA
DE MELOXICAM POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2013

CLÁUDIA CRISTINA MACHADO

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE MATÉRIA-PRIMA
DE MELOXICAM POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-vis**

Trabalho de conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de TCC2 do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof^ª. Dr. Viviane da Silva Lobo

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

TOLEDO
2013

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO PROJETO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

CLÁUDIA CRISTINA MACHADO

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE MATÉRIA-PRIMA
DE MELOXICAM POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-vis**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Câmpus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof^a. Dr. Viviane da Silva Lobo
UTFPR

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara
UTFPR

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
UTFPR

Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa
UNIOESTE

Toledo, Setembro de 2013

Aos meus pais e esposo.

AGRADECIMENTOS

Grata a Deus pelo dom da vida e saúde;

À UTFPR , pelos equipamentos e materiais disponibilizados;

Agradeço à minha família, meu pai Claudinei e minha mãe Maria, pela disponibilidade incentivo, pelas orações e preocupações;

Ao meu esposo Rafael por sempre estar comigo, e me incentivar nos momentos mais difíceis e não desistir de cobrar que fizesse o meu melhor. Por sua compreensão de minha ausência em algumas ocasiões, pelo amor e carinho dedicado;

À minha querida orientadora Viviane pela atenção, paciência e auxílio.

Ao meu co-orientador Ricardo, que me instruiu com sugestões e correções;

A todos meus professores pela contribuição em minha vida acadêmica;

Aos meus colegas de trabalho Marciano e Andressa, por conseguir alguns materiais para meus estudos;

A todos os colegas de curso, com quem compartilhei alegrias e inquietações ao longo do curso.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram a conquistar um passo a mais de meus sonhos...

RESUMO

MACHADO, Cláudia C. Validação de metodologia analítica de matéria-prima de meloxicam por espectrofotometria UV-vis. TCC (Tecnologia em Processos Químicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2013.

O Meloxicam é um anti-inflamatório, que age no alívio da dor e diminuição da inflamação devido as doenças das articulações, tais como a artrite reumatóide e osteoartrite. Para que o efeito do medicamento seja satisfatório é necessário que os insumos utilizados na fabricação tenham a qualidade esperada. Para comprovação dessa qualidade, análises químicas e microbiológicas devem ser realizadas. Recentemente os compêndios oficiais, Farmacopeia Britânica e Farmacopeia dos Estados Unidos preconizam a análise potenciométrica e de cromatografia líquida, respectivamente, para análise do doseamento do composto ativo meloxicam. Para outras farmacopeias consultadas não existe método vigente. Visando obter um método alternativo, procurou-se desenvolver e validar um método por espectrofotometria UV-vis. O método desenvolvido utilizou como diluente hidróxido de sódio 0,1 mol/L, álcool etílico e água. Para leituras utilizou-se o comprimento de onda máximo encontrado na varredura da solução sendo esse 355 nm. O método avaliado apresentou especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, exatidão e robustez.

Palavras chave: meloxicam, validação, Uv-vis.

ABSTRACT

MACHADO, Cláudia C. Validation of analytical methodology of raw meloxicam by UV-vis. TCC (Technology in Chemical Processes) - Federal Technological University of Paraná. Toledo, 2013.

Meloxicam is an anti-inflammatory, which acts on pain relief and reduced inflammation due to diseases on joints such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In order to have the desired effect, the drug used in manufacturing needs to comply the necessary quality, thus, chemical and microbiological analyses must be performed for. Recently, British Pharmacopoeia and United States Pharmacopoeia official compendia advocate potentiometric analysis and liquid chromatography, respectively to analyze the assay of the drug meloxicam, other pharmacopoeias consultely ' have no existing method. In order to obtain an alternative method, it was pursued to develop and validate a method by spectrophotometry UV-vis. The method used sodium hydroxide 0.1 M, ethanol and water as diluents. The maximum wavelength found on was 355nm, which was used on readings for this solution. The validated method attained specificity, linearity, range, repeatability, accuracy and robustness.”

Keywords: meloxicam, validation, Uv-vis

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

UV-vis – Ultravioleta- visível

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

% - Porcentagem

N – Normalidade

mL - Mililitros

mg – Miligramas

°C - Graus Celsius

g – Grama

CV – Coeficiente de variação

DPR – Desvio Padrão Relativo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA DO MELOXICAM	14
FIGURA 2 – FÓRMULA DO PIROXICAM	15
FIGURA 3 – FÓRMULA DO TENOXICAM.....	15
FIGURA 4 – FÓRMULA DO DICLOFENACO DE SÓDIO	16
FIGURA 5– ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DO ESPETROFOTÔMETRO UV-Vis	18
FIGURA 6 – TIPOS DE VIBRAÇÕES DAS LIGAÇÕES	19
FIGURA 7 – VARREDURA MELOXICAM.....	27
FIGURA 8 – VARREDURA MELOXICAM E DICLOFENACO DE SÓDIO	28
FIGURA 9 – VARREDURA MELOXICAM, DICLOFENACO DE SÓDIO, TENOXICAM E PIROXICAM	28
FIGURA 10 – BANDAS SOBREPOSTAS DE MELOXICAM PURO E CONTAMINADO COM PIROXICAM, TENOXICAM E DICLOFENACO DE SÓDIO	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 OBJETIVO	11
1.1.1 Objetivo Geral	11
1.1.2 Objetivos Específicos	11
1.2 Justificativa.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CONTROLE DE QUALIDADE	13
2.2 MEDICAMENTO	13
2.2.1 Insumos de medicamentos.....	13
2.2.2 Meloxicam.....	14
2.2.3 Piroxicam.....	14
2.2.4 Tenoxicam	15
2.2.5 Diclofenaco de sódio	16
2.3 METODOS DE ANÁLISE DE MEDICAMENTO	16
2.3.1 Métodos titrimétricos.....	17
2.3.1.1 Titulação potenciométrica	17
2.3.2 Métodos Instrumentais	17
2.3.2.1 Espectrofotometria UV-vis.....	18
2.3.2.2 Espectrofotometria no Infravermelho.....	19
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE MEDICAMENTO	19
2.4.1 Especificidade.....	20
2.4.2 Linearidade	21
2.4.3 Intervalo.....	21
2.4.4 Repetibilidade	21
2.4.5 Exatidão	22
2.4.6 robustez	22
3 MATERIAIS E METODOLOGIA	23
3.1 Análise Potenciométrica.....	23
3.1.1 Padronização de ácido perclórico 0,1N	23
3.1.2 Doseamento da matéria- prima do meloxicam.....	23
3.2 Análise por Espectrofotometria UV-vis	24
3.2.1 Desenvolvimento do método analítico	24
3.3 Análise por Espectrofotometria de infravermelho.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Especificidade.....	27
4.2 Linearidade	29
4.3 Repetibilidade	30
4.4 Exatidão	31
4.5 robustez	31
5.1 CONCLUSÃO.....	32
6.1 REFERENCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O processo industrial farmacêutico é complexo, vinculando-se às políticas industriais, científica tecnológica e de saúde. É um processo que exige investimentos em pesquisa e desenvolvimento, na produção e no controle de qualidade dos produtos, na aquisição de substâncias, na armazenagem e distribuição de produtos entre outros. (PORTAL DA EDUCAÇÃO, 2008)

O processo de medicamentos está diretamente ligado à vida de seres humanos, sendo que a falha em algum fator pode causar várias consequências ou mesmo ser fatal. Para que os possíveis desvios na qualidade e confiabilidade dos produtos não ocorram, deve-se ter um constante monitoramento durante todos os estágios de fabricação.

Para que um produto tenha a sua qualidade garantida, a sua base deve ser de qualidade, ou seja, a matéria-prima dos ativos, entre outros parâmetros, deve ser confiável, onde começa o desenvolvimento de todos os processos.

Para saber se um insumo farmacêutico tem a qualidade exigida, deverão ser realizadas análises químicas. A escolha do método deve ser feita segundo à exatidão, precisão, tempo e custo de análise disponíveis (VOGEL, 2002).

As análises de insumos e produtos farmacêuticos são guiadas pelas chamadas farmacopeias e outros métodos aceitos pela ANVISA. Em muitos métodos por elas sugeridos têm-se a titrimetria, que é um método clássico, muito preciso, a sua precisão de 0,1% (VOGEL, 2002) que é melhor do que a maior parte dos métodos instrumentais, porém as análises titrimétricas não são tão seletivas e sensíveis como as análises instrumentais.

Para auxiliar na escolha de métodos é interessante ter vários métodos validados para que seja escolhido o que cabe melhor ao momento, e para que possamos ter comparativos entre métodos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia alternativa para análise de doseamento de matéria-prima de meloxicam, utilizando a espectrofotometria UV/Vis.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a análise de doseamento de um lote de matéria-prima de meloxicam através do método de titulação potenciométrica, metodologia vigente na farmacopeia britânica;
- Definir as condições necessárias para desenvolvimento e validação de uma metodologia por espectrofotometria UV-vis;
- Realizar a validação do método desenvolvido para o doseamento da matéria-prima de meloxicam.
- Avaliar estatisticamente, a diferenças entre os valores de teor encontrados no método desenvolvido, no método farmacopeico e o do laudo do fornecedor;

1.2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o nono maior mercado de fármacos e medicamentos do mundo e conta com importantes indústrias do setor em seu território. Existem cerca de 540 indústrias farmacêuticas cadastradas no Brasil, sendo que os medicamentos existentes são diversos (BRASIL, 2010).

Medicamentos são produtos farmacêuticos que podem salvar vidas, prevenir, diagnosticar e curar doenças ou aliviar seus sintomas (GOVERNO PORTO ALEGRE, 2012). Sendo assim a qualidade dos fármacos devem ser constantemente monitorada e comprovada. Por isso as indústrias farmacêuticas submetem seus produtos a rigorosas análises, bem como de matérias-primas quanto excipientes, início e término do processo e materiais de embalagem.

Para o doseamento dos ativos e outras análises dos medicamentos as metodologias utilizadas podem ser retiradas das farmacopeias vigentes, mas outras metodologias podem ser propostas desde que a mesma seja validada.

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ANVISA, 2003a).

Para ampliar as possibilidades de análise da matéria-prima de Meloxicam será desenvolvido um novo método que será validado por espectrofotometria UV/Vis, que é uma técnica não sugerida nas metodologias vigentes de algumas farmacopeias principais, sendo que a farmacopeia Britânica sugere a análise por Titulação potenciométrica, a farmacopeia Americana (USP) por Cromatografia líquida de alta Eficiência (CLAE), e para farmacopeia brasileira, portuguesa e europeia não existe um método vigente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade é o conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos abrangidos, para que satisfaça às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade e a inspeção de qualidade. É um conjunto de medidas destinadas a garantir a qualquer momento, durante o processo de fabricação, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos abrangidos por este regulamento, tendo em vista o atendimento dos mesmos parâmetros do controle de qualidade (ANVISA, 2012).

2.2 MEDICAMENTO

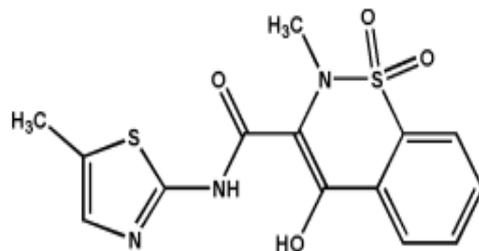
Medicamento é um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico que é composta de um Insumo Farmacêutico, droga ou matéria-prima aditiva ou complementar de qualquer natureza, destinada a emprego em medicamentos, quando for o caso, e seus recipientes (ANVISA, 2012).

2.2.1 Insumos de medicamentos

Os insumos farmacêuticos representam o início da cadeia produtiva da indústria farmacêutica. Por essa razão, o controle desses produtos é fundamental. A qualidade das matérias-primas usadas para fabricar medicamentos pode ser a diferença entre um produto eficiente ou não (ANVISA, 2005). Sendo interessante saber que 80% dos insumos utilizados pela indústria farmacêutica são importados (ANVISA, 2005).

2.2.2 Meloxicam

O Meloxicam (Figura 1) é um agente antiinflamatório não-esteroidal do grupo do ácido enólico, um dos derivados do oxicam.



Formula Molecular

C₁₄ H₁₃ N₃ O₄ S₂

Figura 1. Fórmula do Meloxicam
Fonte: USP, 2010

Em estudos farmacológicos o meloxicam apresentou propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas explicáveis pela sua capacidade de inibir a síntese de prostaglandinas, substâncias reconhecidamente mediadoras de inflamação. A potente atividade antiinflamatória foi evidenciada em todos os modelos clássicos de inflamação (MERCK, 2005).

2.2.3 Piroxicam

O Piroxicam (Figura 2) é indicado para uma variedade de condições que requeiram atividade anti-inflamatória e/ou analgésica, tais como: artrite reumatóide, osteoartrite (artrose, doença articular degenerativa), espondilite anquilosante, distúrbios músculo-esqueléticos agudos, gota aguda, dor pós-operatória e pós-traumática. É também indicado para o tratamento da dismenorréia primária em pacientes maiores de 12 anos (MEDICINANET, 2013a).

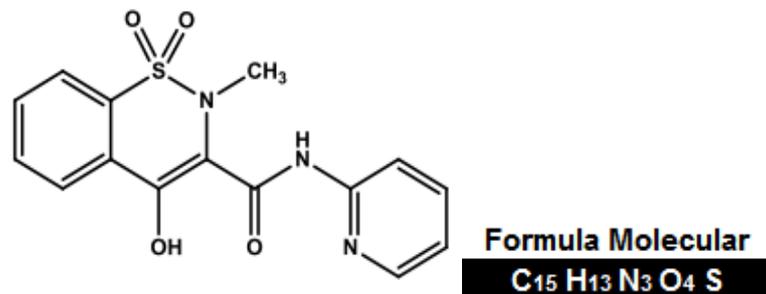


Figura 2. Fórmula do Piroxicam
Fonte: USP, 2010

2.2.4 Tenoxicam

O Tenoxicam (Figura 3) pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais e apresenta propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e também inibidoras da agregação plaquetária. Em animais, o Tenoxicam não revelou qualquer efeito mutagênico, carcinogênico ou teratogênico. Como ocorre com outros inibidores das prostaglandinas, estudos toxicológicos em animais revelaram efeitos renais e gastrintestinais, aumento da incidência de distócias e prolongamento da gestação (MEDICINANET, 2013b).

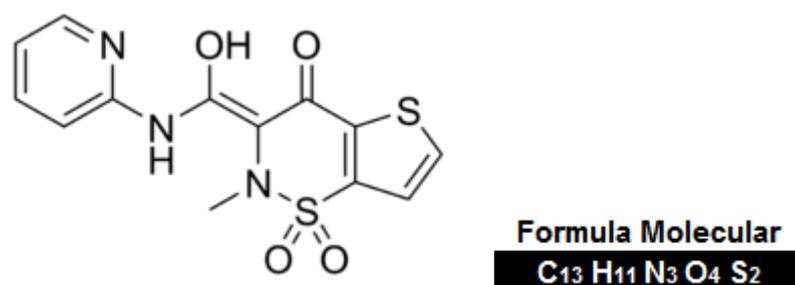


Figura 3. Fórmula do Tenoxicam
Fonte: Drugbank, 2013

2.2.5 Diclofenaco de Sódio

O Diclofenaco Sódico (Figura 4) é um composto não-esteroidal com pronunciadas propriedades anti-inflamatórias indicada para o tratamento de artrite reumatóide, espondilite anquilosante, osteoartrose, reumatismo não articular; condições inflamatórias e/ou dolorosas, pós-traumáticas e pós-operatórias em ginecologia, ortopedia e odontologia; crises agudas de gota; síndromes dolorosas da coluna vertebral; cólica renal e biliar, faringoamigdalites, otites, anexite, dismenorréia primária e outros processos infecciosos acompanhados de dor.

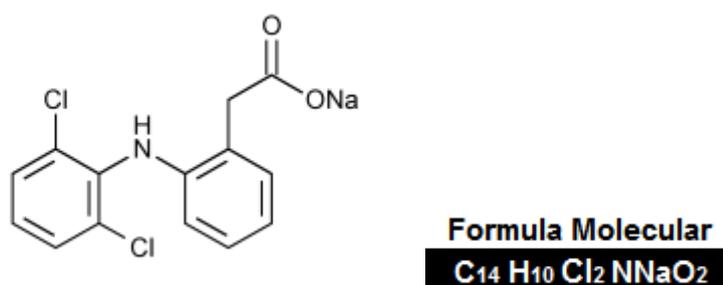


Figura 4. Fórmula do Diclofenaco de sódio
Fonte: USP, 2010

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

Existem muitas definições para “análise química”. Talvez seja mais razoável defini-la como a aplicação de um processo ou uma série de processos para identificar ou quantificar uma substância, ou os componentes de uma solução ou mistura ou, ainda, para a estrutura de um componente químico (VOGEL, 2002).

Para escolha de um método de análise alguns fatores importantes que deve ser levados em conta, tais como saber se a análise inclui a natureza da informação procurada, a quantidade de amostra disponível, a percentagem do constituinte a ser determinado e a utilização dos resultados da análise (VOGEL, 2002), além de fazer a escolha pela precisão que se deseja do método, custos envolvido na análise e tempo disponível.

2.3.1 Métodos Titrímetricos

Em uma análise titrimétrica, a quantidade de um constituinte de interesse (amostra) é determinada através da reação desta espécie química com outra substância em solução, chamada solução padrão, cuja concentração é exatamente conhecida. Sabendo qual a quantidade da solução-padrão necessária para reagir totalmente com a amostra e a reação química que ocorre entre as duas espécies, tem-se condições para se calcular a concentração da substância analisada (BACCAN, 2001).

Os métodos titrimétricos são normalmente superiores às técnicas instrumentais na análise dos principais componentes (VOGEL, 2002). A análise volumétrica deve ser cuidadosamente preparada, caso contrário a determinação resultará errada (BACCAN, 2001). Contudo, esses métodos são menos sensíveis e seletivos que os métodos instrumentais (VOGEL, 2002).

2.3.1.1 Titulação Potenciométrica

A titulação potenciométrica é feita pela medida da diferença de um potencial entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência (VOGEL, 2002).

Em uma titulação potenciométrica, o potencial do eletrodo indicador é medido em função do volume do titulante adicionado. O ponto final da reação é reconhecido pela mudança súbita do potencial (VOGEL, 2002).

2.3.2 Métodos Instrumentais

No início do Século XX os cientistas iniciaram a exploração de fenômenos alternativos aqueles aplicados aos métodos clássicos. Começaram a ser usadas técnicas altamente eficientes como a cromatografia líquida e a eletroforese que começaram a substituir

a destilação, extração, precipitação, etc. Sendo a coletividade desses novos métodos chamados métodos instrumentais. (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

Muitos dos fenômenos relacionados aos métodos instrumentais são conhecidos há um século ou mais. Sua aplicação por meio dos cientistas, contudo, foi adiada pela falta de instrumentação simples e confiável. De fato, o crescimento dos métodos instrumentais de análise modernos tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento das indústrias eletrônicas e de computadores (HOLLER, SKOOG, CROUCH, 2009).

2.3.2.1 Espectrofotometria UV-vis

O espectrofotômetro UV-Vis é um equipamento que faz passar um feixe de luz através de uma solução, e mede a intensidade de luz que foi absorvida por essa solução. Usando uma rede de difração, o aparelho separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda. Pode-se, assim, fazer passar através da amostra um feixe de luz monocromática, permitindo saber que quantidade de luz é absorvida a cada comprimento de onda. A Figura 5 mostra o esquema de funcionamento do equipamento (VOGEL, 2002).

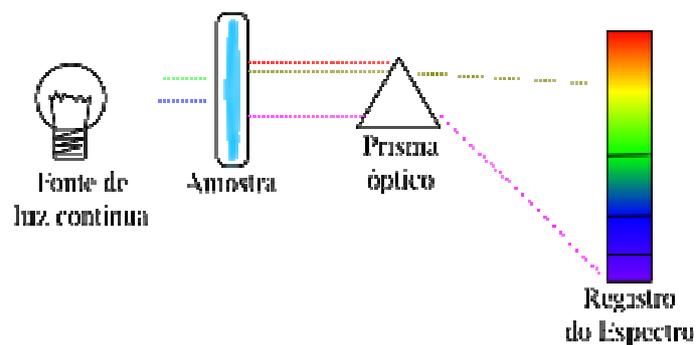


Figura 5. Esquema de funcionamento do espectrofotômetro UV-Vis

Fonte: VOGEL, 1981

2.3.2.2 Espectrofotometria no Infravermelho

Espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, níveis vibracionais.

Se a molécula receber luz com 'exatamente' a mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida desde que sejam atendidas a determinadas condições. Para que uma vibração apareça no espectro IV, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração.

As ligações podem vibrar de seis modos: estiramento simétrico, estiramento assimétrico, tesoura, rotação, wag e twist, que se encontram representados na figura 6:

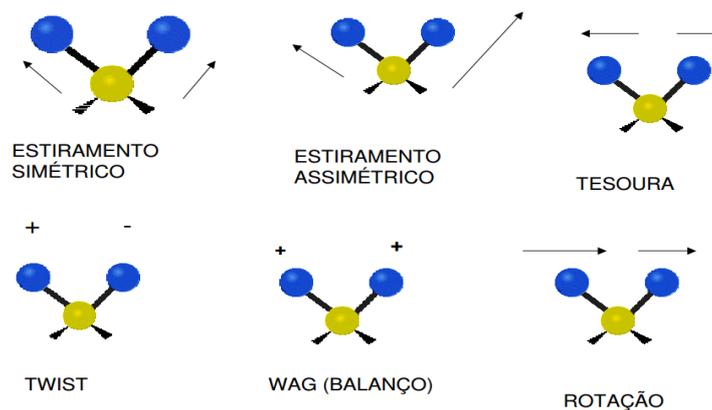


Figura 6 – Tipos de vibrações das ligações

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE MEDICAMENTO

A validação 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, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão, adequadas à análise (ANVISA, 2003b).

No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada,

desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado nos Quadros 1 e 2 (ANVISA, 2003b).

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Quadro 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Quadro 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Sendo assim, segundo a tabela fornecida pela resolução N°899 de 2003, da ANVISA a análise de matéria-prima de produtos farmacêuticos que não estão descritas na farmacopeia ou formulários oficiais, assim como a metodologia que iremos validar será enquadrada na categoria I, sendo necessário atender os parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, exatidão e robustez.

2.4.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da

matriz. Para análise quantitativa (teor), a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (ANVISA, 2003a).

2.4.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $\geq 0,990$ (ANVISA, 2003a).

2.4.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003a).

2.4.4 Repetibilidade

Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada pelo mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003a).

2.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida (ANVISA, 2003a).

2.4.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Na espectrofotometria a robustez pode ser verificada pela variação do pH da solução, temperatura e diferentes fabricantes de solventes.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 ANÁLISE POTENCIOMÉTRICA

3.1.1 Padronização de ácido perclórico 0,1M:

Misturou-se 11 mL de ácido perclórico (Vetec, 305434) a 60% com 500 mL de ácido acético glacial (Alphatec, 20324-i) e 30 mL de anidrido acético (Isofar, 072024) , resfriou-se e completou-se para balão de 1000 mL com ácido acético. Deixou-se a solução em repouso por um dia para a combinação do excesso do anidrido acético (ANVISA, 2010).

Padronizou-se a solução como se segue: pesou-se cerca de 700 mg de biftalato de potássio (Proquimios, 070297) dessecado a 120°C por 2 horas e dissolveu-se em 50 mL de ácido acético em erlenmeyer, adicionou-se cerca de 2 gotas de violeta cristal, titulou-se o ácido perclórico até o ponto de viragem e calculou-se a molaridade (ANVISA, 2010).

3.1.2 Doseamento da matéria- prima do meloxicam

Dissolve-se 0,250 g da amostra em uma mistura de 5 mL de ácido fórmico (Vetec, 0804789) e 50mL de ácido acético em um erlenmeyer . Titula-se com ácido perclórico 0,1 M em titulador potenciometrico (Metrohm, Titrinoplus 848), determinando potenciometricamente o ponto final. 1,0 mL de ácido perclórico é equivalente a 35,14mg de $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ (Meloxicam) (FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2012).

3.2 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

3.2.1 Desenvolvimento do método analítico

No processo de validação desta metodologia analítica foram avaliados os seguintes parâmetros, especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, exatidão e robustez de acordo com a RE nº 899/03 (ANVISA,2003a).

A confiabilidade dos parâmetros avaliados pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo de uma série de medidas. Para cada parâmetro avaliado, foi determinado um CV% menor que 5% e os dados foram tratados estatisticamente.

Para iniciar as análises primeiramente fez o teste de solubilidade, com os solventes escolhidos pela relação com a propriedade molecular do meloxicam sendo esses água, hidróxido de sódio 0,1 Mol/L (Nuclear,11050470), hidróxido de sódio 1,0 Mol/L e o etanol (Proquimios, 6258455 / Dinâmica, 30065). Resultados na tabela 1.

Tabela 1- Resultados encontrados no teste de solubilidade

Água	Pouco solúvel
Hidróxido de sódio 0,1 Mol/L	Pouco solúvel
Hidróxido de sódio 1,0 Mol/L	Muito pouco solúvel
Etanol	Solúvel

Para o padrão (Farmacopeia USP, H0J100): Pesou-se aproximadamente 10 mg de padrão em balão volumétrico de 10 mL então para dissolver o ativo utilizou-se 2 mL de Hidróxido de sódio 0,1 mol/L e completou-se o volume com etanol, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico e dilui-se com água, chegando a uma concentração de 10 ppm e analisou-se em espectrofotômetro de Uv-vis (ThermoFisher Scientific, modeloGenesys).

Para a amostra: Pesou-se aproximadamente 50 mg de padrão em balão volumétrico de 50 mL então para dissolver o ativo utilizou-se 10 mL de Hidróxido de sódio 0,1 mol/L e completou-se o volume com etanol, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico e dilui-se com água, chegando a uma concentração de 10 ppm e analisou-se em espectrofotômetro de Uv-vis (ThermoFisher Scientific, modeloGenesys).

Para as amostras em diferentes concentrações utilizou-se quantidade de amostras suficientes para chegar a concentração desejada sem alteração do volume dos balões e pipetas.

O parâmetro especificidade foi verificado através da contaminação da solução de meloxicam com diclofenaco de potássio com o objetivo de observar a especificidade do método frente a uma possível contaminação, sendo os dois anti-inflamatórios. Essa contaminação deu-se (10:1) p/p. Foi também preparada uma solução não contaminada de meloxicam e outra de diclofenaco de sódio.

Sendo a contaminação um parâmetro muito crítico e sendo essa metodologia quantitativa e não qualitativa recomenda-se que antes de cada análise seja feita a varredura por Espectrofotômetro de infravermelho, comparando matéria prima em questão a uma molécula pura de meloxicam (Item 3.2.1), para então realizar o doseamento validado pelo método de UV-vis.

Para linearidade foram preparadas amostras com cinco concentrações diferentes, sendo 5,1; 7,7; 10,1; 13,2 e 16,1 ppm, após calculado o coeficiente de correlação (r).

O Intervalo é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003a).

A repetibilidade (precisão intracorrída) foi avaliada pelo preparo de seis amostras a 100% da concentração do teste.

A exatidão foi definida pela comparação dos resultados da análise seguindo a metodologia vigente da farmacopeia Britânica por titulação potenciométrica e o teor dado pelo laudo do fornecedor.

O ensaio para a determinação da robustez foi realizado a partir da variação do fabricante do álcool etílico absoluto (Proquimios® e Dinâmica®) e pela análise feita por mais de um analista.

3.3 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRAVERMELHO

Pesou-se em quatro pipuleiros cerca de 100 mg de Meloxicam, três deles foram contaminados com cerca de 10 mg de piroxicam, tenoxicam e diclofenaco de sódio respectivamente.

Então fez-se a análise por Espectrofotômetro no infravermelho próximo (PerkinElmer, Spectrum 400) utilizando um alcance de 10000 a 4000 cm^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo as amostras sido preparadas com os diluentes, Hidróxido de sódio 0,1Mol/L, Álcool etílico absoluto e água, fez-se a varredura espectrofotométrica para a verificação de qual absorção seria mais adequada numa faixa de 190 a 450nm, sendo o comprimento de onda mais indicado o de 355nm, pois é o comprimento de onda máximo, ou seja, a absorção da amostra é maior nesse comprimento, minimizando as fontes de erros. Varredura apresentada na figura 7.

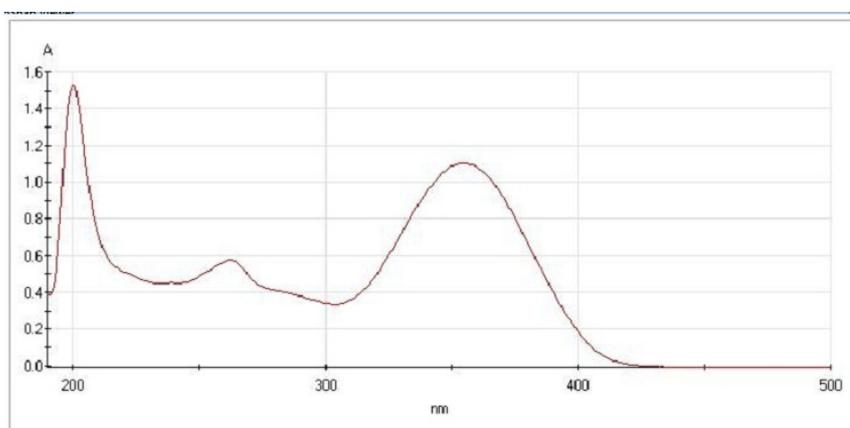


Figura 7 – Varredura meloxicam

4.1 ESPECIFICIDADE

Para o método proposto, a solução amostra de meloxicam foi contaminada com uma impureza, o diclofenaco de sódio, que não apresentou absorção máxima no comprimento de 355 nm e não houve interferência na absorção do meloxicam neste comprimento de onda. As varreduras das amostras de meloxicam, diclofenaco de sódio e o meloxicam contaminado estão expostos na figura 8.

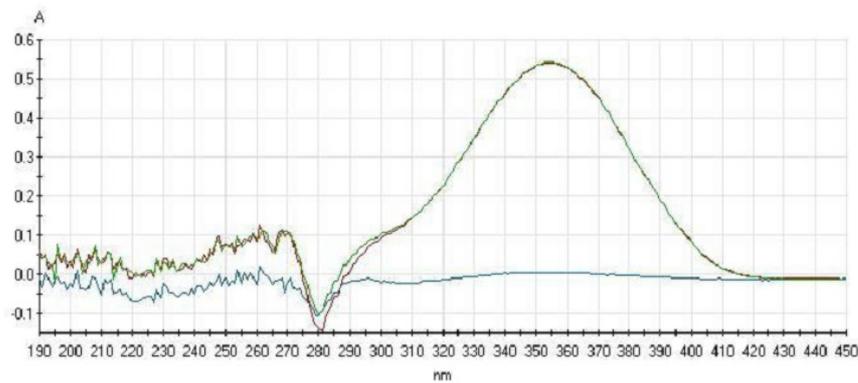


Figura 8 – Varredura Meloxicam e Diclofenaco de Sódio

Tendo as amostras sido contaminadas com diclofenaco de sódio para avaliar a eficiência do método com contaminação cruzada de dois anti-inflamatórios, Também contaminou-se a amostra com tenoxicam e piroxicam pelo fato de ser da mesma família e com estrutura molecular próxima (Figura 9).

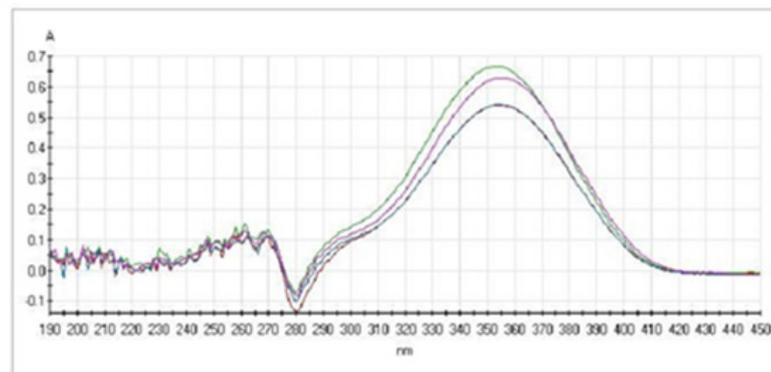


Figura 9 – Varredura Meloxicam, Diclofenaco de sódio, Tenoxicam e Piroxicam

Sendo o método robusto com a contaminação do diclofenaco de sódio e não para o tenoxicam e o piroxicam é interessante que e antes das análises de doseamento por espectrofotômetro, seja feita uma análise de identificação, para comprovar a pureza do ativo, sendo um método proposto a espectrofotometria por infravermelho para então prosseguir com a análise do doseamento por espectrofotometria de Uv-vis, a figura 10, nos traz as amostras contaminadas com Piroxicam, Tenoxicam e diclofenaco de sódio, que devem ser analisado

pelo software do equipamento que irá analisar a matéria prima como falsa ou verdadeira para o meloxicam sendo capaz de detectar contaminações em níveis residuais muito baixos.

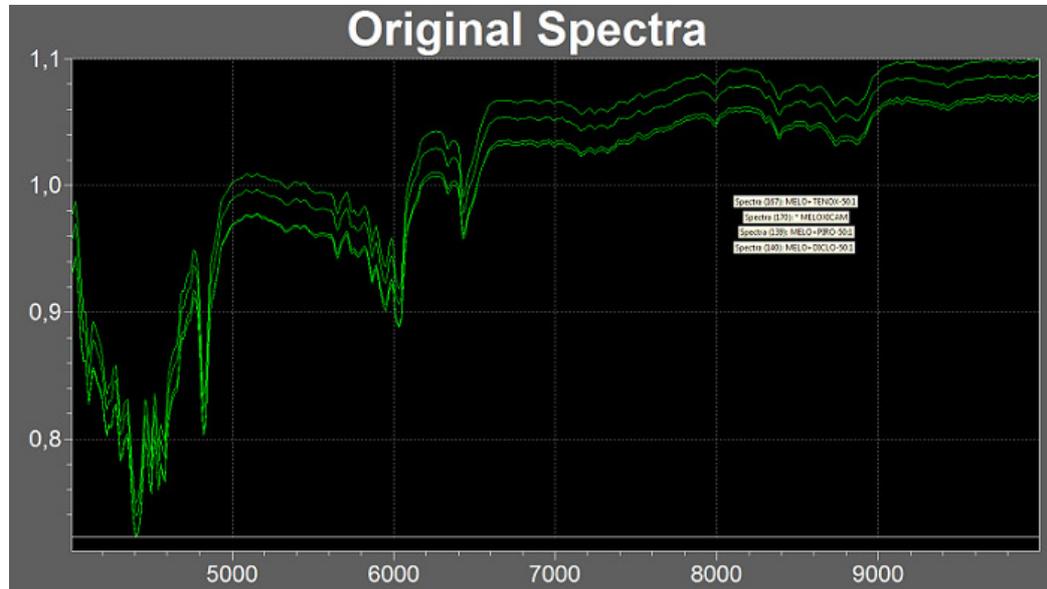


Figura 10 – Bandas sobreposta de meloxicam puro e contaminado com Piroxicam, Tenoxicam e diclofenaco de sódio.

4.2 Linearidade

A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação de 0,999, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta $y = 50,60x + 0,0038$, como podemos ver através do gráfico 1.

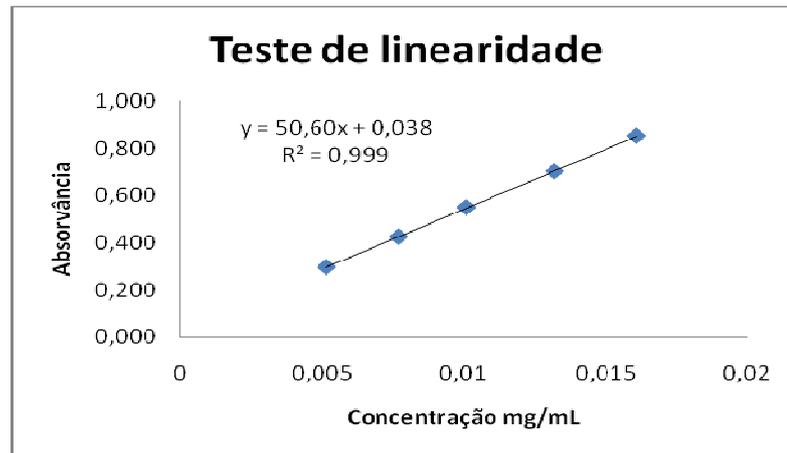


Gráfico 1- Curva de calibração

4.3 Repetibilidade

Para o parâmetro repetibilidade os resultados obtidos apresentaram uma média de 100,99% e um CV de 0,56%, abaixo do valor máximo especificado pela resolução N°899 de 2003 da ANVISA que permite um CV de até 5%. Conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Repetibilidade comparando seis amostra distintas.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Absorvância	% Amostra	DPR entre as amostras	% CV
A1	0,0108	0,566	101,07		
A1	0,0108	0,565	100,89		
A2	0,0107	0,563	101,85		
A2	0,0107	0,563	101,85		
A3	0,0100	0,520	100,28		
A3	0,0100	0,520	100,28	0,57	0,56
A4	0,0117	0,612	100,88		
A4	0,0117	0,612	100,88		
A5	0,0108	0,566	101,07		
A5	0,0108	0,565	100,89		
A6	0,0102	0,528	100,22		
A6	0,0102	0,528	100,22		
Média			100,99		

4.4 Exatidão

Para exatidão comparou-se a média das análises por espectrofotômetro UV-vis, potenciômetro e laudo do fornecedor obtendo valores de DPR menores que 1,00% comparando as três médias de análises (Tabela 3).

Tabela 3 – Exatidão comparando média de três análises distintas.

	Método Potenciométrico (1)	Método Espectro UV-vis (2)	Laudo do Fabricante (3)
%	100,32	100,99	99,85
DPR 1-2		0,47	
DPR 2-3		0,81	
DPR 1-2-3		0,57	

4.5 Robustez

A robustez foi dada através da análise de diferentes analistas com diferentes fabricantes de álcool etílico absoluto, obtendo resultados satisfatórios e CV de 0,56 e 0,50% (Tabela 4).

Tabela 4 – Robustez comparando diferentes analistas e marca de solventes.

Analista	1	2	3	4	5	DPR indiv.	DPR	% CV
1	101,07	101,85	100,28	100,88	101,07	0,56	0,34	0,56
2	100,35	99,86	101,2	100,55	100,78	0,50		0,50

5. CONCLUSÃO

O método apresentado foi desenvolvido e validado segundo a resolução da ANVISA nº899 de 2003, e apresentou a confiabilidade requerida para um método analítico. Além de se mostrar um método alternativo e acessível.

Seguindo a resolução foram obedecidos todos os parâmetros requerido para validação da metodologia que se enquadra na categoria I para os testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, sendo os parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, exatidão e robustez.

Sendo a especificidade aplicável somente na presença da análise da pureza por espectrofotometria no infravermelho.

As análises por espectrofotometria de UV-vis demonstrou valores de doseamento muito próximo a metodologia analítica farmacopeica por titulação potenciométrica comprovando exatidão. A viabilidade do método é muito grande, tendo em vista, o menor custo da análise e a rapidez.

6. REFERÊNCIAS

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo da Resolução - RE nº. 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, 2003a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> acesso: 21 abr.2012.

ANVISA. **Resolução** N°899, 2003b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> acesso: 05 mai. 2012.

ANVISA. **Matéria-prima de medicamentos terá maior controle.** Notícias da Anvisa, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/220905_2.htm> acesso: 05 mai. 2012.

ANVISA. **Soluções volumétricas.** Ácido perclórico 0,1M, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/publicacoes/3_edicao/sol_volumetricas.pdf> acesso: 05 mai. 2012.

ANVISA. **Medicamentos.** Conceitos técnicos, 2012. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#1.2>> acesso: 21 abr.2012.

BRASIL. **Indústria Farmacêutica.** Tecnologia em saúde, ciência e tecnologia, 2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/ciencia-e-tecnologia/tecnologia-em-saude>> acesso: 20 abr.2012.

BACCAN, Nivaldo. **Química analítica quantitativa elementar.** 3.ed,São Paulo: editora Edgard Blücher LTDA, 2001 46p.

DRUGBANK. **Tenoxicam,** 2013. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00469>> acesso: 08 jul. 2013.

FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2012. Disponível em: <<http://www.pharmacopoeia.co.uk/>> acesso: 06 mai. 2012.

GOVERNO Porto Alegre. **Medicamentos,** 2012. Disponível em: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/sms/default.php?p_secao=701> acesso: 20 abr.2012.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2009, 15 p.

MERCK. **Bula meloxicam conjunta**, 2005. Disponível em: <<http://www2.merck.com.br/pdf/bulas/genericos/meloxicam.pdf>> acesso: 02 mai. 2012.

MEDICINANET. **Piroxicam – Bula completa**, 2013a. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/4112/piroxicam.htm>> acesso em: 08 jul. 2013.

MEDICINANET. **Tenoxicam – Bula completa**, 2013b. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/4981/tenoxicam.htm>> acesso em: 08 jul. 2013.

PORTAL DA EDUCAÇÃO. **A indústria farmacêutica e as políticas de saúde e de medicamentos**. Artigos de farmácia, 2008. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/638/a-industria-farmaceutica-e-as-politicas-de-saude-e-de-medicamentosacesso>> acesso em 04 jun.2012.

VOGEL, Arthur I. **Análise química quantitativa**. 6ªEd, Rio de Janeiro: LTC editora, 2002. p 2-176.