

CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA - IV REGIÃO (SP)



Minicursos 2012

Análise instrumental: da amostragem à validação

Ministrante: Thais Vitória da Silva Reis
Doutora em Química Analítica
Contatos: thais.vitoria@oswaldocruz.br

Apoio



São Paulo, 21 de julho de 2012

Observação: A versão original desta apresentação, com slides coloridos, no formato PDF, está disponível na seção downloads do site do CRQ-IV (www.crq4.org.br)



M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2

Análise Instrumental Da Amostragem à Validação

Dra. Thais Vitória da Silva Reis

contatos:
www.rumosconsult.com.br
thaisvitoria@rumosconsult.com.br
thais.vitoria@oswaldocruz.br

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



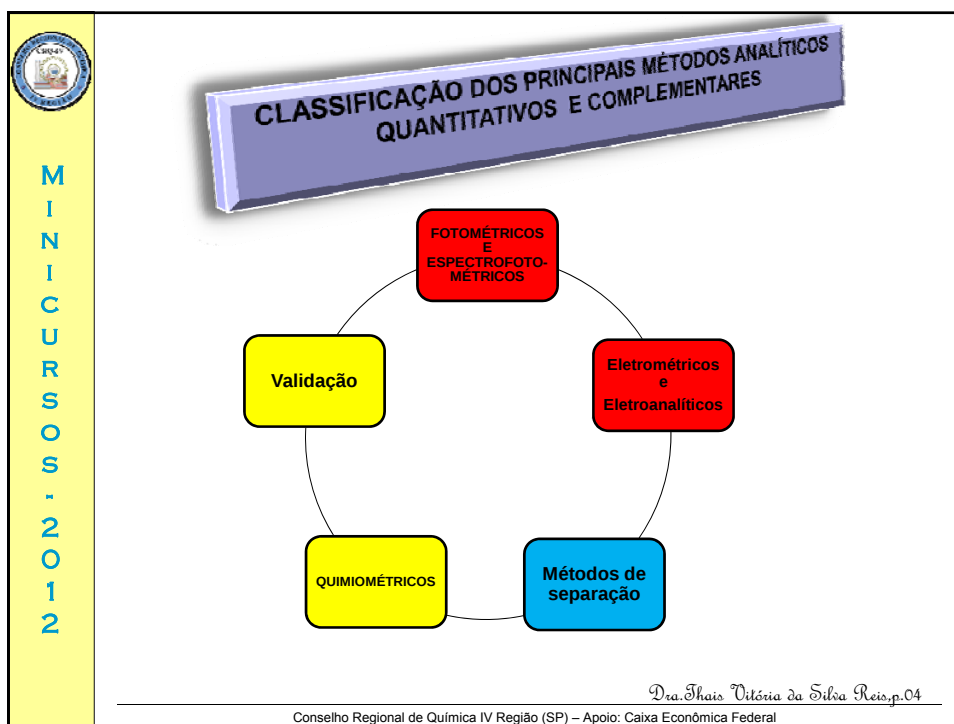
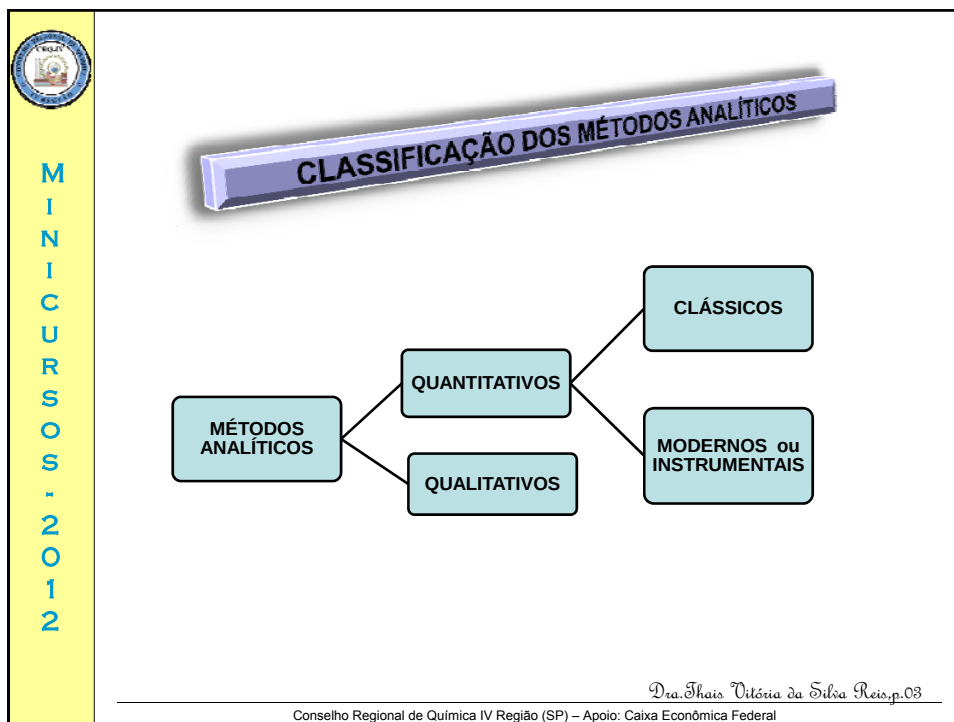
M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2

Conteúdos a serem desenvolvidos

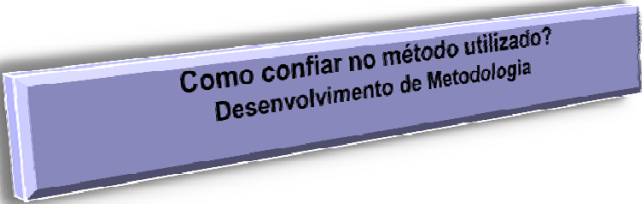
- 1-Utilização de Métodos Instrumentais;
- 2-Classificação dos Principais Métodos analíticos Quantitativos;
- 3-Desenvolvimento de Metodologia;
- 4-Fototransdução e Processamento de Informações na retina;
- 5-Fundamentos da espectroscopia Molecular nas Regiões de Visível e Ultra Violeta;
- 6-Aplicações da Espectrofotometria de Visível e ultra Violeta/Estudo de Casos.

Dra. Thais Vitória da Silva Reis, p.02

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal




**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2**



Definir os objetivos da Qualidade dos Dados

- ✓ Que graus de precisão e exatidão são necessários?
- ✓ Qual a qualidade das Informações Desejadas?

Pode-se selecionar o método analíticos para satisfazer os critérios:

- ✓ Qualidade dos resultados
- ✓ Limites de custo e disponibilidade de equipamentos

Escolhido o Método, em geral otimizam-se os parâmetros de Operação:
Planejamento Fatorial(Quimiometria)

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.05
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal


**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2**





The pyramid is divided into five horizontal layers, from top to bottom:

- LNMI** (pink)
- Padrões Nacionais** (pink)
- Laboratórios de Calibração Acreditados** (light blue)
- Padrões de Referência** (light blue)
- Laboratório de Calibração das Empresas/Instituições (in-house)** (orange)
- Padrões de Transferência e de Trabalho** (orange)
- Todas as seções das Empresas/Instituições** (yellow)
- Equipamento de Medição e Ensaio** (yellow)
- Produtos** (yellow)

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.06
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012




Validação do Método:

Processo que prova que um método analítico é aceitável para os propósitos a que se destina.

Figuras de Mérito da Validação:

1-Especificidade :capacidade do método de distinguir o anaito de todo o resto que se encontra na amostra;adiciona-se deliberadamente impurezas para testar a especificidade;

2-Linearidade :mede o quanto o gráfico da resposta analítica contra a concentração(ou quantidade do analito segue uma linha reta(quadrado do coeficiente de correlação acima de 0,995);

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.07

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012

3-Exatidão: É a proximidade do valor verdadeiro.pode ser verificada por análise de um material de referência padrão;por análise de dois ou mais métodos analíticos diferentes que são comparados dentro da precisão de cada um;por análise de um “branco” que é propositadamente contaminado com quantidade de analito conhecida;por adições de padrão de analito à amostra.

4-Precisão:É a reprodutibilidade de um resultado.

Precisão Intrínseca do Ensaio:uma pessoa analisa várias alíquotas de um material homogêneo no mesmo dia de trabalho.cada análise é independente e assim a precisão intrínseca do ensaio expressa o quão reprodutível pode ser o método.

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.08

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



Precisão Intermediária ou Robustez; diferentes pessoas, em dias diferentes, em instrumentos diferentes analisam a mesma amostra, no mesmo laboratório (cada análise pode usar reativos diferentes, preparados independentemente);

Precisão Interlaboratorial: alíquotas da mesma amostra são analisadas em diferentes dias, com equipamentos diferentes, com reagentes de cada laboratório, por diferentes pessoas. (medida mais geral da reprodutibilidade);

Coefficiente de variação (CV): É o desvio padrão de um conjunto de medidas dividido por sua média, $CV(\%) = 100 \times s/\bar{x}$

5-Faixa: Intervalo de Concentrações onde Linearidade, precisão e Exatidão são aceitáveis.

Testes Utilizados:

1-Determinação do Limite de Confiança da Média (teste t-Student)

$$\mu = \bar{x} \pm t. s / \sqrt{N}$$

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.09

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



Valores do Parâmetro t-Student em função do Número de Determinações para 95% e 99% de probabilidade

Graus de Liberdade(N-1)	95% de Probabilidade	99% de Probabilidade
1	12,71	63,66
2	4,30	9,93
3	3,18	5,84
4	2,78	4,60
5	2,57	4,03
6	2,45	3,71
7	2,37	3,50
8	2,31	3,36
9	2,26	3,25
10	2,23	3,17
11	2,20	3,11
12	2,18	3,06
13	2,16	3,01
infinito	1,96	2,58

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.10

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2**



Rejeição de Resultados (teste Q)
Caso $Q_{calc} > Q_{tab}$ o valor é rejeitado

Valores Críticos do quociente Q para diferentes Limites de Confiança

Número de Observações(N)	Q 95%	Q 99%
2	-	-
3	0,970	0,994
4	0,829	0,926
5	0,710	0,821
6	0,625	0,740
7	0,568	0,680
8	0,526	0,634
9	0,493	0,598
10	0,466	0,568

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.11
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2**



Teste F (para Comparar conjunto de dados)
Por convenção o maior valor de variância é colocado no numerador.

$$F = s^2_x / s^2_y$$

Quando $F_{exp} > F_{tab}$, a diferença em variância(ou precisão) é tida como significativa

Valores Críticos de F para o Nível de 95%

↓

Graus de Liberdade (denominador)	3	4	5	6	12	20	infinito
3	9,28	9,12	9,01	8,94	8,74	8,64	8,53
4	6,56	6,39	6,26	6,16	5,91	5,80	5,63
5	5,41	5,19	5,05	4,95	4,68	4,56	4,36
6	4,76	4,53	4,39	4,28	4,00	3,87	3,67
12	3,49	3,26	3,11	3,00	2,69	2,54	2,30
20	3,10	2,87	2,71	2,60	2,28	2,12	1,84
infinito	2,60	2,37	2,21	2,10	1,75	1,57	1,00

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.12
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2**



CRITÉRIOS PARA UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS INSTRUMENTAIS COM CONFIANÇA

Rastreabilidade

Propriedade de um resultado de medição ou valor de padrão estar relacionado à grandezas estabelecidas (padrões internacionais) através de cadeia contínua de comparações tendo todas as incertezas estabelecidas

1-Calibração do Equipamento rastreada com padrões apropriados (material de referência=subst. Pura /SI);

2-Método Primário de Medição (rastreado diretamente ao SI ...menor incerteza com respeito à referência;

3-Utilizando Materiais de Referência (MR) da subst. Pura (adição de padrão);

4-Medição de Material de Referência Certificado (MRC) ..compara-se os resultados vs. uma matriz certificada (reduz incerteza);

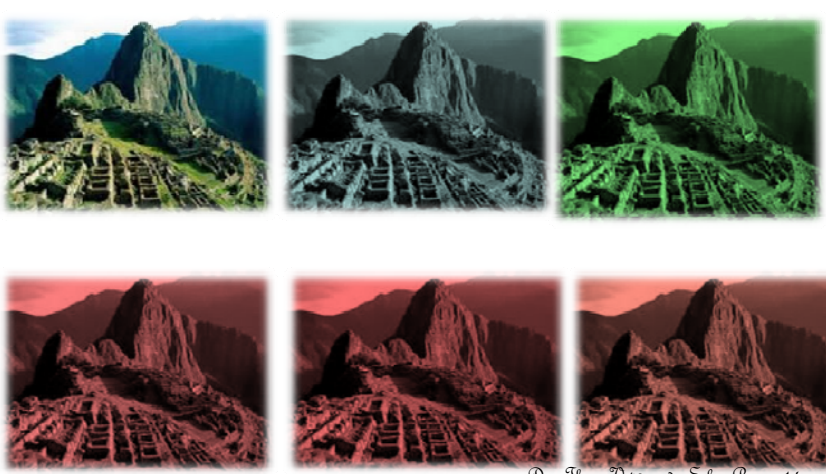
5-Medição usando procedimento aceito (baseado em norma nacional ou Internacional).

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.13
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

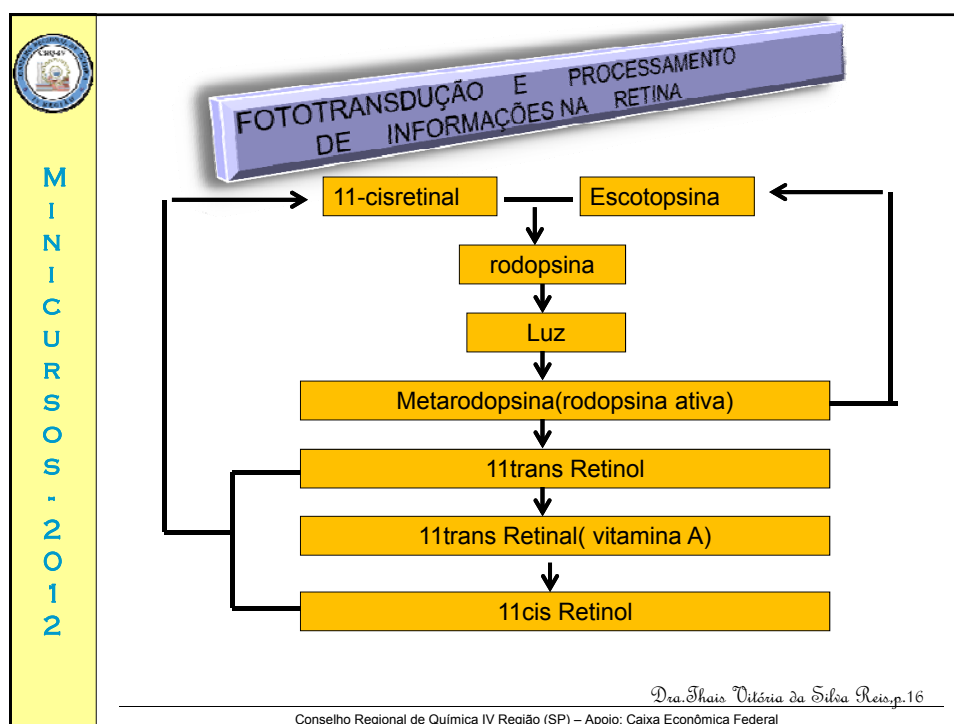
**M
I
N
I
C
U
R
S
O
S
-
2
0
1
2**



FOTOTRANSDUÇÃO E PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES NA RETINA



Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.14
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



MINICURSOS - 2012

FOTOTRANSDUÇÃO E PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES NA RETINA

11-cis-retinal

Opnina
Uma Proteína

Rhodopsina

$-H_2O$

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.17

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012

FOTOTRANSDUÇÃO E PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES NA RETINA

Segmento externo do Bastone que contém composto químicos sensíveis à luz

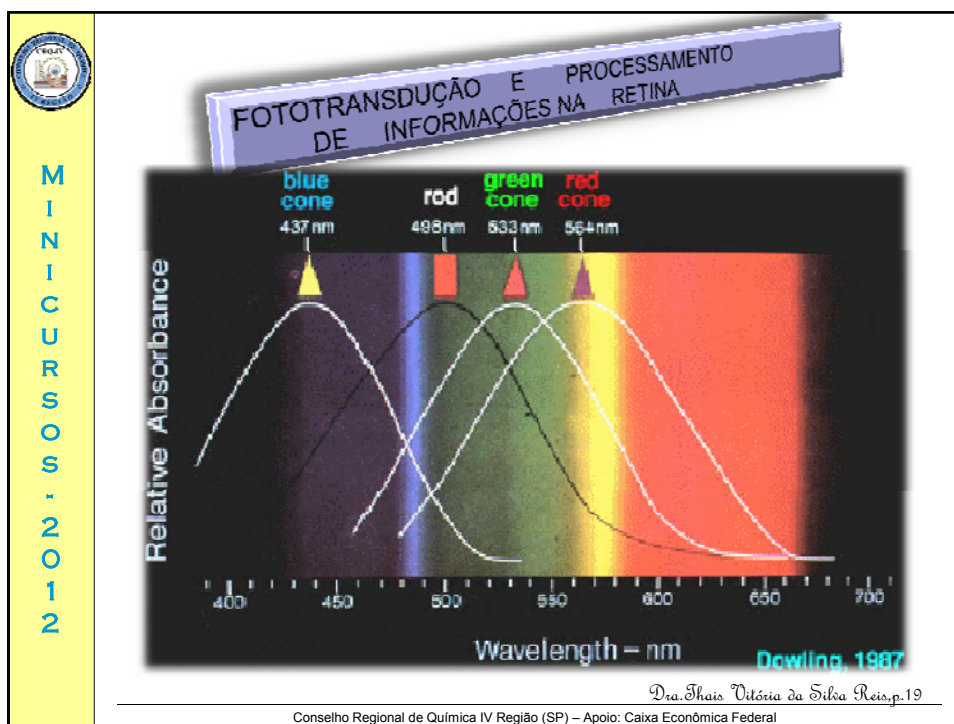
Segmento externo da célula do cone que contém compostos químicos sensíveis à luz

Núcleos

Bastone Cone

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.18

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



Colorimetria e Espectrofotometria de Absorção Molecular nas Regiões de Visível e Ultra Violeta

- ✓ Fenômenos Ondulatórios: natureza da luz;
- ✓ Comparadores de Cor: detecção visual e fotoelétrica;
- ✓ Radiação Eletromagnética : relação entre cor e Comprimentos de Onda;
- ✓ Interação entre REM e matéria;
- ✓ Eleito fotoelétrico - teoria do quantum;
- ✓ Tratamento de dados espectrofotométricos
Lei de Lambert-Beer - desvios aparentes e verdadeiros

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.20

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



MINICURSOS - 2012

- ✓ Sistemas de múltiplos componentes: resolução matricial
- ✓ Instrumentação
- ✓ Aplicações: titulações espectrofotométricas; determinação de pK de indicadores; análises industriais; método da adição de padrão.

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.21

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



MINICURSOS - 2012

Espectro Eletromagnético nas Regiões de Visível e Ultra Violeta

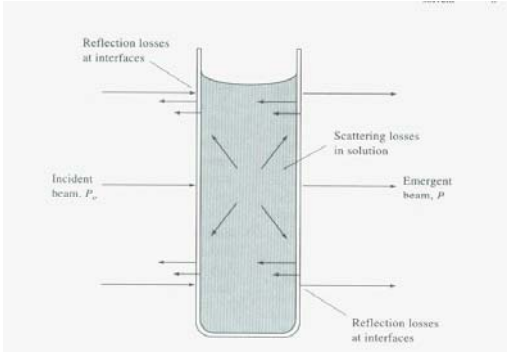
Wavelength [nm]	Absorbed color	Complementary color
650-780	red	blue-green
595-650	orange	greenish blue
560-595	yellow-green	purple
500-560	green	red-purple
490-500	bluish green	red
480-490	greenish blue	orange
435-480	blue	yellow
380-435	violet	yellow-green

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.22

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

Atenuação do Feixe

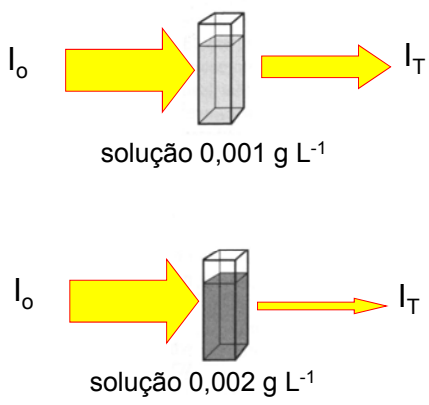
Nas interfaces: ar/parede;parede /solução;
Como resultado de espalhamento por moléculas grandes;por absorção das paredes da célula



Reflection losses at interfaces
Incident beam, P_o
Scattering losses in solution
Emergent beam, P
Reflection losses at interfaces

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.23
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO
 $A = \epsilon \times b \times c$



I_o → I_T
solução 0,001 g L⁻¹

I_o → I_T
solução 0,002 g L⁻¹

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.24
Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012

INFLUÊNCIA DA ESPESSURA DA CÉLULA
 $A = \varepsilon \times b \times c$

I_0 → 1 cm → I_T

I_0 → 5 cm → I_T

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.25
 Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012

Wavelength (nm)

0 0.1 M 0.2 M 0.3 M 0.4 M 0.5 M

Absorbance

Concentration (M)

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.26
 Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



MINICURSOS - 2012



Dinâmicas em sala:

Aplicações do Método

- 1-determinação de uma espécie absorvente
- 2-determinação Simultânea de íons

Exercícios

Estudo de caso: Otimização e validação de Princípio Ativo em Antinflamatório por Espectrofotometria de Ultra Violeta

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.27

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



MINICURSOS - 2012

Exercícios

Aplicações dos testes T, Q e F

1- Na determinação de cobalto em uma amostra, por método espectrofotométrico, obtiveram-se as seguintes porcentagens do elemento : 21,44; 21,42; 21,36; 21,39; 21,7; 22,9. Verifique se haverá rejeição de resultados para um nível de 95% de confiança e após calcular o desvio padrão apresente o intervalo onde deve estar a média da população com um grau de confiança de 95%.

2- Ao avaliar a qualidade de um novo laboratório de análises, foram feitas no mesmo, 6 determinações de cobalto em Sulfato de Cobalto, tendo-se encontrado uma média de 35,25% m/v de Co com desvio padrão de 0,34%. O laboratório de referência obteve uma média de 35,35% de Co com desvio padrão de 0,25% em 5 determinações. Há diferença significativa entre os resultados dos laboratórios envolvidos a um nível de 95% ?

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.28

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



Aplicações da Espectrofotometria de Visível e Ultra Violeta

1-Determinado composto apresentou absorvidade molar de $2,17 \cdot 10^3 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Que concentração do composto será necessária para produzir uma solução em célula de 2,5 cm?

2-Uma solução contendo um complexo de tiouréia e Bi(III) apresentou absorvidade molar de $9,32 \cdot 10^3 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ a 472 nm.

a) qual a absorbância de solução de $6,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do complexo á 472 nm em célula de 1 cm de espessura?

b) qual a %T descrita em (a) ?

c) qual a concentração molar do complexo na solução que tem absorbância descrita em (a) quando medida em célula de 3 cm?

3-Uma alíquota de 25 mL de solução aquosa de quinino foi diluída a 50 mL e encontrou-se a 348 nm uma absorbância de 0,832, quando medida em célula de 2 cm.

Uma segunda alíquota de 25 mL foi misturada a 10 mL de solução contendo 28 ppm de quinino. Após diluição á 50 mL a solução apresentou Absorbância de 1,22 , em célula de 2,00 cm. Qual a concentração de quinino na amostra?

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.29

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal



4-Ti e V formam complexos coloridos com água oxigenada. Soluções separadas destes metais, contendo 5 mg dos mesmos, foram tratadas com ácido perclórico e água oxigenada e diluídas a 100 mL.

Uma terceira solução foi preparada dissolvendo-se 10 mg de uma liga(que contem apenas Ti e V.)e tratada de mesma forma que os padrões.

As absorbâncias das três soluções foram medidas em 410 e 460 nm. Calcule as %T de Ti e de V na liga.

solução	A 410 nm	A 460 nm
Ti	0,760	0,513
V	0,185	0,250
Liga	0,715	0,657

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis, p.30

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012



Estudo de caso

Otimização e validação de Princípio Ativo em Antinflamatório por Espectrofotometria de Ultra Violeta (Artigo em anexo)



Referências Bibliográficas Úteis

- 1-SKOOOG,D.A.;Holler,F.J, and Nieman,T.A. *Principles of Instrumental Analysis* .
.5Th Ed.Harcourt. Brace & Company.USA, 1998.
- 2-HARRIS,D.C. *Análise Química Quantitativa*.6ª Ed.LTC Ed.Rio de Janeiro,2005.
- 3-BASSET,J.;Denney,R.C.;Jeffery,G.H.;Mendham,J. *Vogel-Análise Inorgânica Qualitativa Ed. Guanabara II*,Rio de Janeiro 1978.
- 4.OHLWEILLER,O.A.*Fundamentos de Análise Instrumental*.Rio de Janeiro, LTC Ed.,1981.

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis,p.31

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

MINICURSOS - 2012



- 5-GONÇALVES,M.L.S.S.*MÉTODOS Instrumentais para Análise de Soluções*.3ª Ed.FUNDAÇÃO CALOUSTE Gulbenkian,Lisboa,1996.
- 6-DOQ-CGCRE-008 rev03,fev 2010-Orientação sobre validação de Métodos Analíticos.INMETRO.
- 7-Resolução .Res nº 899,29/05/2003*Guia para Validação de métodos analíticos e Bioanalíticos*.ANVISA.
- 8-PINTO,T.J.;FERRARINI,M.;GATTI,R.M.*Proposta para Roteiro Prático para Validação de Métodos Analíticos*. Farm. e Quím.SP,v.36.p26-36,2003.
- 9-Acta Farm.Bonaerense 25(2): 262-6(2006)

Dra. Thaís Vitória da Silva Reis,p.32

Conselho Regional de Química IV Região (SP) – Apoio: Caixa Econômica Federal

Determinação Quantitativa de Tenoxicam em Comprimidos por Espectrofotometria no Ultravioleta

Simone Gonçalves CARDOSO*, Clarice Madalena Bueno ROLIM, Ana Laura ESCARRONE, Carine Viana Silva IEGGLI, Cláudia CAVALETT, Daniele Carvalho de OLIVEIRA, Erico Silva de LORETO, Gabriela Cristina SCHMITT, Iara Peruffo CARLOSSO, Keli CÂMERA, Lisiane BAJERSKI, Marcelo Donadel MALESUIK & Tânia Maria BÖER

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, Brasil

RESUMO. Diferentes condições experimentais foram otimizadas e validadas para rápida determinação quantitativa de tenoxicam em comprimidos. Os solventes utilizados foram: hidróxido de sódio 0,1 M (M₁), metanol (M₂) e metanol/ácido clorídrico 0,1 M (M₃). A validação dos métodos incluiu parâmetros como linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão e especificidade. Houve linearidade no intervalo de concentração de 6,0 a 16,0 µg/mL para todas as condições testadas. Os métodos M₁, M₂ e M₃ apresentaram precisão e exatidão comparáveis ao método oficial, não havendo interferências dos excipientes dos comprimidos.

SUMMARY. "Quantitative Determination of Tenoxicam in Tablets by UV Spectrophotometry". Different experimental conditions were optimized and validated for fast quantitative determination of tenoxicam in tablets. The solvents used were: sodium hydroxide 0,1M, methanol and methanol/hydrochloric acid 0,1M. The methods were validated with regard to linearity, limit of quantitation and detection, precision, accuracy and specificity. The linearity was observed in the range of 6,0 to 16,0 µg/mL for all tested conditions. The methods M₁, M₂ and M₃ showed precision and accuracy compared to the official method, with no interference of the excipients used in the tablets.

INTRODUÇÃO

Tenoxicam (TNX, Fig. 1) é um fármaco não-esteroidal do grupo dos oxicams que apresenta propriedades antiinflamatórias, analgésicas e também inibidoras da agregação plaquetária¹. Quimicamente corresponde a 1,1-Dióxido de 4-hidroxi-2-metil-N-(2-piridinil)-2H-tieno[2,3-e]-1,2-tiazino-3-carboxamida². Comercialmente o TNX é encontrado na forma de comprimidos, supositórios, granulado solúvel e pó liofilizado para injetável. A Farmacopéia Brasileira 4ª ed.² disponibiliza monografia para TNX como matéria-prima. Para avaliação da pureza da matéria-prima essa monografia descreve a titrimetria de neutralização em meio não aquoso. Na Farmacopéia Britânica¹ os métodos indicados para determinação de TNX são: titrimetria de neutralização em meio não aquoso, para avaliar a matéria-prima e a cromatografia líquida de alta eficiência, para quantificação do fármaco em comprimidos. Essa mesma farmacopéia descreve a espectrofotometria no ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M, para a quantificação do TNX em pó para injetável. Outros métodos en-

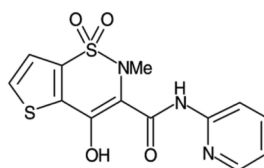


Figura 1.
Estrutura
Química
do Tenoxicam.

contram-se descritos na literatura para a determinação quantitativa do TNX e incluem: determinação polarográfica^{3,4} cromatografia líquida de alta eficiência^{5,6}, espectroscopia no infravermelho^{7,8}, determinação espectrofotométrica na região do visível^{9,10}, espectrofotometria de injeção de fluxo¹¹, espectrofotometria derivada⁵ e espectrofluorimetria¹².

A determinação de TNX em comprimidos por espectrofotometria na região do ultravioleta não se encontra referenciada na literatura consultada. Os métodos espectrofotométricos constituem-se em procedimento bastante utilizados na análise de fármacos, principalmente em laboratórios que não disponham de equipamentos sofisticados. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver e validar método para a determinação rápida de tenoxicam em compri-

PALAVRAS CHAVE: Espectrofotometria no UV, Tenoxicam, Validação.

KEY WORDS: Tenoxicam, UV-spectrophotometry, Validation.

* Autor a quem dirigir correspondência. E-mail: simonegc@ccs.ufsm.br

dos através da espectrofotometria no ultravioleta, por ser esta técnica mais simples e menos dispendiosa que a cromatografia líquida de alta eficiência indicada pela Farmacopéia Britânica ¹. O emprego de hidróxido de sódio 0,1M (M₁), metanol (M₂) e metanol/ácido clorídrico 0,1M (M₃) como diluentes foram avaliados. As validações foram conduzidas conforme preconizado pela Farmacopéia Americana ¹³ e ICH ¹⁴. Os métodos podem ser utilizados para controle do fármaco durante a produção e para avaliar a uniformidade de conteúdo. Devido à limitada seletividade dos métodos espectrofotométricos, a avaliação da qualidade dos comprimidos deve ser complementada com outras técnicas, com o intuito de verificar a presença de produtos de degradação ou impurezas relacionadas ao fármaco.

MATERIAL E MÉTODO

Equipamento

Espectrofotômetro UV/Vis, Milton-Roy Genesys 2; com cubetas de quartzo de 10 mm de espessura.

Reagentes e solventes

Ácido clorídrico fumegante, grau analítico (Merck), Metanol grau cromatográfico (Tedia), Hidróxido de sódio grau analítico (Merck).

Substância química de referência (SQR) e produto farmacêutico

TNX, substância química de referência (pureza declarada de 99,91%), foi adquirido da empresa Delaware (Brasil). Os comprimidos foram adquiridos comercialmente, com teor declarado de 20 mg de TNX e apresentavam os seguintes excipientes: estearato de magnésio, croscarmellose sódica, dióxido de silício coloidal, lactose monoidratada, celulose microcristalina, dióxido de titânio, óxido férrico amarelo, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol 3350 e água purificada.

Padronização do método

Preparo das soluções estoques da SQR

Foram pesadas, analiticamente, quantidades da SQR, previamente dessecada a 110 °C por 1 h, correspondentes a 25,0 mg de tenoxicam as quais foram transferidas para balões volumétricos de 250 mL. Após solubilização, os volumes foram completados com hidróxido de sódio 0,1 M (M₁) ou metanol (M₂), obtendo-se soluções com concentração de 100,0 µg/mL. A partir dessas soluções foram preparadas soluções para construção dos espectros de absorção, curvas de Ringbom e curvas de calibração.

Espectros de absorção

Os espectros de absorção das soluções da SQR e dos comprimidos foram traçados no intervalo de 200 a 450 nm, utilizando soluções contendo 8,0 µg/mL de TNX preparadas em hidróxido de sódio 0,1 M (M₁), metanol (M₂) e metanol/ácido clorídrico 0,1M (M₃). Para M₃, utilizou-se solução estoque preparada em metanol com concentração de 100,0 µg/mL de TNX.

Construção das curvas de Ringbom

A partir da solução estoque da SQR em hidróxido de sódio 0,1 M, foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas variando de 0,5 a 12,5 mL, para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com hidróxido de sódio 0,1 M para obter soluções com concentrações variando de 1,0 a 25,0 µg/mL. As leituras de transmitância foram realizadas a 368 nm. O mesmo procedimento foi aplicado para métodos M₂ e M₃ utilizando, entretanto, metanol (M₂) e ácido clorídrico 0,1 M (M₃) para obter as concentrações de 1,0 a 25,0 µg/mL, a partir de soluções metanólicas da SQR. Para M₂ e M₃ as leituras de transmitância foram realizadas em 372 nm e 360 nm, respectivamente.

Validação dos métodos

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados na validação dos métodos propostos (M₁, M₂ e M₃) para a determinação de teor de TNX em comprimidos:

Especificidade

Foi avaliada pela comparação entre os espectros de absorção obtidos para a substância de referência e as amostras e pelo ensaio de amostra simulada, contendo os excipientes (ASE) presentes nos comprimidos.

Linearidade

Três curvas de calibração foram preparadas, cada uma com seis níveis de concentração, em três diferentes dias. As curvas foram obtidas a partir das soluções estoques da SQR. Alíquotas de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 mL das soluções estoque foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com hidróxido de sódio 0,1 M (M₁), metanol (M₂) ou ácido clorídrico 0,1M (M₃), obtendo-se soluções com concentrações de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 µg/mL. Os valores de absorvâncias foram obtidos em 368 nm (M₁), 372 nm (M₂) e 360 nm (M₃). Com os valores das absorvâncias em função das concentrações de TNX foram calculados os coeficientes de correlação e as equações das retas de calibração.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Foram calculados, conforme ICH¹⁴, a partir do desvio padrão da resposta e da inclinação das curvas de calibração obtidas por regressão linear.

Precisão

Para determinação da repetibilidade foram preparadas e analisadas, no mesmo dia, seis amostras de comprimidos na mesma concentração (12,0 µg/mL). Na determinação da precisão intermediária foram preparadas e analisadas, em três diferentes dias, três amostras de comprimidos na mesma concentração (12,0 µg/mL). A precisão foi expressa como coeficiente de variação percentual (CV%). Para análise das amostras foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, os quais foram posteriormente triturados. Pesaram-se quantidades equivalentes a 10 mg de TNX as quais foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, com auxílio de hidróxido de sódio 0,1 M ou metanol. Após banho de ultra-som durante 5 min, os volumes foram completados com hidróxido de sódio 0,1 M ou metanol, obtendo-se soluções com concentração de 200 µg/mL, as quais foram filtradas. A partir da solução preparada em hidróxido de sódio 0,1M foram transferidos 3,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente (M₁). A partir da solução metanólica foram transferidas alíquotas de 3,0 mL para balões volumétricos de 50 mL, completando-se o volume com o metanol (M₂) ou ácido clorídrico 0,1 M (M₃). A concentração

de TNX nas amostras foi 12,0 µg/mL, tanto para M₁, M₂ e M₃. As leituras de absorvâncias foram efetuadas nos comprimentos de onda citados anteriormente.

Exatidão

Foi verificada pela comparação dos resultados obtidos com um segundo e bem caracterizado método. Empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência descrita na Farmacopéia Britânica¹ para análise do teor de TNX em comprimidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para otimização de método espectrofotométrico na região do ultravioleta deve-se, inicialmente, investigar o espectro de absorção do fármaco em diferentes solventes para definir as bandas de absorção máxima e suas intensidades e para escolher o comprimento de onda de trabalho, onde não devem observadas interferências de excipientes, impurezas ou de solventes. TNX é solúvel em soluções ácidas e básicas, em metanol e diclorometano e é insolúvel em água^{1,2}. Com base na sua solubilidade^{1,2} e em estudos prévios^{5,15}, foi avaliado o emprego de hidróxido de sódio 0,1 M, de metanol e de metanol/ácido clorídrico 0,1 M para determinação quantitativa do fármaco em comprimidos. Os máximos de absorção em hidróxido de sódio 0,1 M, metanol e metanol/ácido clorídrico foram, respectivamente, 368 nm, 372 nm e 360 nm, conforme pode ser observado na Fig. 2.

Em relação ao hidróxido de sódio 0,1 M ob-

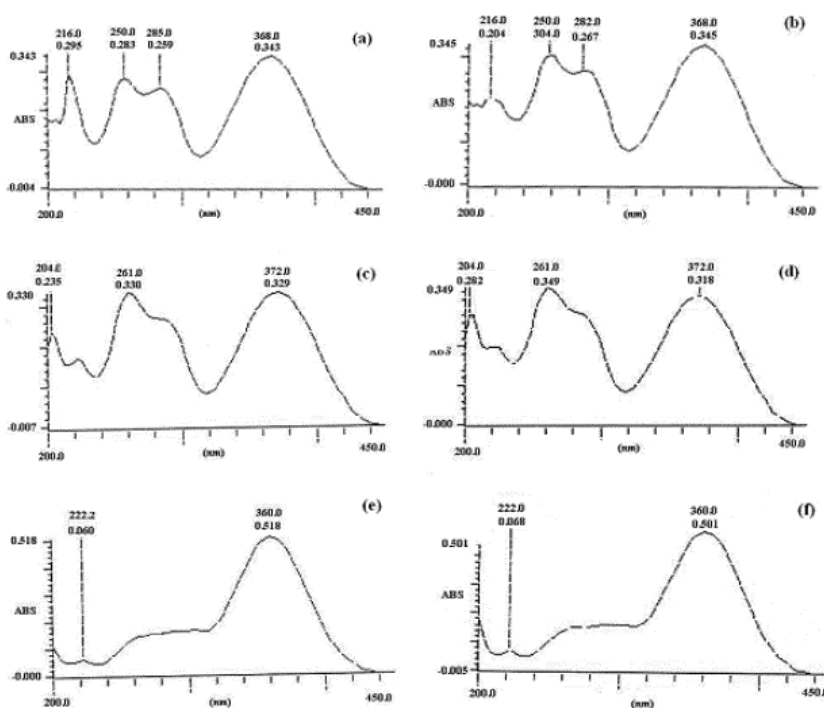


Figura 2.

Espectros de absorção de na região do UV referentes às soluções de Tenoxicam, na concentração de 8 µg/mL: (a) SQR em hidróxido de sódio 0,1 M; (b) comprimidos em hidróxido de sódio 0,1 M; (c) SQR em metanol; (d) comprimidos em metanol; (e) SQR em metanol/ácido clorídrico 0,1 M; (f) comprimidos em metanol/ácido clorídrico 0,1 M.

Concentração (µg/ml)	Absorvâncias Médias ^(a) ± e.p.m.		
	M ₁	M ₂	M ₃
6,0	0,258 ± 0,001	0,246 ± 0,003	0,388 ± 0,003
8,0	0,344 ± 0,002	0,329 ± 0,003	0,518 ± 0,003
10,0	0,434 ± 0,001	0,411 ± 0,005	0,649 ± 0,009
12,0	0,519 ± 0,003	0,485 ± 0,006	0,780 ± 0,009
14,0	0,617 ± 0,007	0,568 ± 0,004	0,902 ± 0,009
16,0	0,701 ± 0,005	0,644 ± 0,006	1,029 ± 0,013
λ _{máx}	368 nm	372 nm	360 nm
Equação da reta	y = 0,0446x - 0,0116	y = 0,04x + 0,0076	y = 0,0644x + 0,0028
r	0,9997	0,9998	0,9999
Absortividade molar (ε)	14619,72	13661,97	21971,83
Limite de detecção	0,4 µg/ml	0,4 µg/ml	0,2 µg/ml
Limite de quantificação	1,2 µg/ml	1,1 µg/ml	0,7 µg/ml

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação das curvas de calibração através dos métodos propostos. ^a n = 3; e.p.m. = erro padrão da média; r = coeficiente de correlação; λ_{máx} = Comprimento de onda de máxima absorção.

serva-se efeito batocrômico para metanol e hipso-crômico para metanol/ácido clorídrico 0,1 M nos máximos de absorção. Segundo Banerjee et al. ¹⁵ em soluções acidificadas predominam as formas neutras e/ou dipolares (zwitterions) do TNX enquanto que em soluções alcalinas ou solventes polares, tais como metanol, etanol e 1-propanol, predominam as espécies aniônicas do fármaco. Comparando os espectros de absorção obtidos para TNX SQR com aqueles obtidos para os comprimidos, verifica-se que não houve interferência de excipientes presentes nos comprimidos (Fig. 2) para os métodos M₁, M₂ e M₃. Nas análises realizadas com amostras simuladas de excipientes, verificou-se, também, não haver interferência dos mesmos.

Após definição dos solventes e dos máximos de absorção, iniciou-se a validação dos métodos, de acordo com Farmacopéia Americana ¹³ e ICH ¹⁴. Com o objetivo de determinar a faixa ideal de concentração na qual o método obedece a Lei de Lambert-Beer foram construídas curvas de Ringbom, com concentrações variando de 0,5 a 12,5 µg/ml, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M, metanol e metanol/ácido clorídrico 0,1 M como solventes. Verificou-se, através das curvas de Ringbom, que a faixa de concentração de 6,0 a 16,0 µg/ml é adequada para quantificação. As equações da reta, obtidas pelo método dos mínimos quadrados, o coeficiente de correlação e as absortividades molares, encontram-se na Tabela 1. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,999, demonstrando relação linear entre absorvância e concentração. Análises de variância (ANOVA) das curvas obtidas demonstraram que houve regressão linear significativa, não havendo desvio significativo da li-

nearidade (p<0,01) tanto para M₁, M₂ e M₃. Os limites de detecção e quantificação foram calculados através do intercepto e inclinação da curvas obtidas e os valores encontram-se na Tabela 1. Os valores experimentais obtidos na determinação de TNX nos comprimidos estão apresentados na Tabela 2.

A precisão foi demonstrada pela repetibilidade dos resultados obtidos através de várias reproduções dos métodos, nas mesmas condições, no mesmo dia. Os coeficientes de variação (CV%) inferiores a 1% demonstram a boa precisão dos métodos. A precisão intermediária foi avaliada pelo CV% e teste F, sendo que os resultados individuais estão apresentados na Tabela 2. Os CV% foram 0,91%; 0,44% e 0,54% para M₁,

Repetibilidade (mesmo dia)			
Amostra	M1	M2	M3
1	100,56	96,10	95,85
2	101,97	97,25	95,73
3	100,00	97,25	96,11
4	99,72	95,72	95,22
5	101,69	96,29	94,71
6	100,28	96,67	94,84
Média	100,70	96,55	95,41
CV%	0,91	0,64	0,60
Precisão Intermediária (diferentes dias)			
Dia	M1	M2	M3
1	100,70	95,55	95,41
2	99,28	96,45	96,21
3	99,01	95,77	95,24
Média	99,66	96,26	95,62
CV%	0,91	0,44	0,54
F _(2,9) = 4,26 P=0,05	4,05	1,63	4,15

Tabela 2. Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) dos métodos propostos.

	M ₁	M ₂	M ₃	CL (BP 2003)
Média (%), n = 3	99,66	96,26	95,62	97,54
Desvio padrão (DP)	0,908	0,424	0,518	0,857
Variância (DP ²)	0,824	0,180	0,268	0,735
Teste <i>t</i> (4; 0,01) = 4,60 (exatidão)	2,94*	2,32*	1,36*	-
Teste <i>F</i> (2,2; 0,05) = 19 (precisão)	1,12*	0,25*	0,36*	-

Tabela 3. Comparação estatística da exatidão e precisão de cada método com o método oficial (cromatografia líquida - CL). * valores não significativos

Exatidão			
teste <i>t</i> (4; 0,01) = 4,60			
	M ₁	M ₂	
M ₂	5,89	-	
M ₃	6,70	2,92*	
Precisão			
teste <i>F</i> (2,2; 0,05) = 19			
Variância (DP ²)	M ₂	M ₃	
M ₁	0,824	4,58*	3,07*
M ₃	0,268	1,49*	-
M ₂	0,180	-	-

Tabela 4. Comparação estatística da exatidão e precisão entre os métodos. * Valores não significativos.

M₂ e M₃, respectivamente. Os valores de *F* obtidos foram 4,05; 1,63 e 4,15; respectivamente para M₁, M₂ e M₃ (*F* tabelado = 4,26), indicando não haver diferença significativa entre os resultados obtidos em dias diferentes (*P* < 0,05). Segundo ICH¹⁴, para demonstrar a exatidão do método pode-se utilizar um segundo e bem caracterizado método. Dessa forma, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida (CL), conforme método descrito na Farmacopéia Britânica ¹ e os resultados da determinação em triplicata estão apresentados na Tabela 3. A comparação dos métodos M₁, M₂ e M₃ com o método oficial foi realizada através de testes de significância. Para avaliar a exatidão utilizou-se o teste *t* de Student ¹⁶. Para comparar a precisão empregou-se o teste *F* ¹⁶, comparando-se as variâncias dos métodos. Verificou-se que não houver diferença significativa quanto à exatidão e à precisão para M₁ e CL, M₂ e CL e M₃ e CL (Tabela 3).

A comparação da exatidão e da precisão entre os métodos M₁, M₂ e M₃ foi igualmente avaliada (Tabela 4). Verificou-se que M₁ diferiu de M₂ e M₃ quanto à exatidão, não havendo diferença significativa quanto à precisão entre os três métodos. Os resultados obtidos pelos métodos M₁, M₂ e M₃ encontram-se, no entanto, dentro da faixa de variação de 92,5 a 105% estabelecida pela Farmacopéia Britânica ¹.

CONCLUSÕES

Os métodos propostos possuem as vantagens de economia e facilidade de execução, po-

dendo ser utilizados durante o processo de produção, quando se necessitam de análises rápidas, ou para avaliar a uniformidade de conteúdo dos comprimidos. A desvantagem dos mesmos é a impossibilidade de diferenciar produtos de degradação ou compostos relacionados. Para que possam ser utilizados como método de quantificação, devem ser complementados com outras técnicas tais como cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência, para verificar presença de produtos de degradação ou impurezas relacionadas.

REFERÊNCIAS

1. British Pharmacopoeia (2003) London, Her Majesty's Stationery Office.
2. Farmacopéia Brasileira 4 ed. (2003) São Paulo: Atheneu, Monografia
3. Atkobar, Z. & M. Tuncel, (1996) *Anal. Lett.* **29**: 2383-97.
4. Acuña, J.A, Vázquez, M.D, Tascón, M. L. & Sánchez-Batane P. (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**: 157-62.
5. El Walil Y.A.F.M., S.M. Blaih, M.H Barary, M.A. El-Sayed, H.H. Abdine & A.M. El-Kersh (1997) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**: 1923-8.
6. Joseph-Charles, J. & M. Bertucat (1999) *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **22**: 2009-21.
7. Atay, O. & F. Dincol (1997) *Anal. Lett.* **30**: 1675-84.
8. El-Gazayerly, O.N. (2000) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **26**: 925-30.
9. Amim, A.S. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**: 729-36.
10. El Ryes, M.A., G. Mohamed, S. Khalil & M. El-Shal (2003) *Chem. Pharm. Bull.* **51**: 6-10.
11. Al-Tamrah, S.A. (1998) *Anal. Chim. Acta.* **375**: 277-83.
12. Barary M.H, M.H. Abdel-Hay, S.M. Sabry & T.S. Bela (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**: 221-6.
13. The United States Pharmacopoeia, 28 ed. (2005) US Pharmacopeial Convention, Rockville.
14. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Methodology (1996), Geneva, IFPMA.
15. Banerjee, R., H. Chakraborty, & M. Sarkar, (2003) *Spectrochim. Acta Part A* **39**: 1213- 22.
16. Miller, J.C. & J.N. Miller (2000) "Statistics and chemometrics for analytical chemistry", 4^a ed. Prentice Hall.