

VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUANTITATIVO POR RMN DE ¹H PARA ANÁLISES DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**Maiara da S. Santos**

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Luiz Alberto Colnago*

Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 29/5/12; aceito em 23/8/12; publicado na web em 6/2/13

VALIDATION OF QUANTITATIVE ¹H NMR METHOD FOR THE ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL FORMULATIONS.

The need for effective and reliable quality control in products from pharmaceutical industries renders the analyses of their active ingredients and constituents of great importance. This study presents the theoretical basis of ¹H NMR for quantitative analyses and an example of the method validation according to Resolution RE N° 899 by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA), in which the compound paracetamol was the active ingredient. All evaluated parameters (selectivity, linearity, accuracy, repeatability and robustness) showed satisfactory results. It was concluded that a single NMR measurement provides structural and quantitative information of active components and excipients in the sample.

Keywords: qNMR; pharmaceutical; validation.

INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêuticas e os órgãos governamentais têm procurado cada vez mais garantir a qualidade dos medicamentos comercializados no país. Devido a isso, há uma demanda crescente por métodos de controle de qualidade que, além de serem seguros e confiáveis, sejam simples, rápidos, de baixo custo, com o mínimo de resíduo químico e que possam ser aplicados a um grande número de princípios ativos e excipientes, sejam eles na matéria-prima ou nos produtos finais (medicamentos). Com este objetivo são usados métodos normatizados, tais como os farmacopeicos.

Caso haja a necessidade de se desenvolver novos métodos, eles devem ser validados de acordo com as normativas específicas. Para que os resultados obtidos em análises de medicamentos sejam aceitos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão responsável pelos registros e pela fiscalização de medicamentos no Brasil, essas validações devem ser baseadas na Resolução RE n° 899.¹

As técnicas mais empregadas para análises de fármacos são as cromatográficas acopladas a diversos detectores e as espectroscópicas, como as espectroscopias na região do ultravioleta visível (UV-Vis), na região do infravermelho médio (FTIR) e infravermelho próximo (NIR).² Já a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que é uma das técnicas mais importantes de análise qualitativa de princípios ativos, ainda é pouco usada para fins quantitativos na indústria farmacêutica brasileira. Além disso, são encontrados poucos estudos quantitativos por RMN validados na literatura³ e, considerando-se o desenvolvimento de novos métodos quantitativos, sua validação se torna indispensável.

Alguns métodos para análises de fármacos usando-se a RMN de alta resolução já foram reconhecidos e oficializados por farmacopeias internacionais.⁴ Como exemplo, podem ser citadas as monografias do citrato de orfenadrina e do nitrito de amila. A primeira aborda a quantificação do isômero *orto* (analito de interesse) em relação aos isômeros *meta* e *para*, os quais não podem ultrapassar 3,0% na formulação farmacêutica. Já a monografia do nitrito de amila aborda sua identificação e quantificação absoluta empregando-se, para isso,

o composto benzoato de benzila como padrão interno.⁵ No entanto, algumas dessas aplicações estão muito aquém da potencialidade da técnica de RMN como uma ferramenta para controle de qualidade de princípios ativos e excipientes em medicamentos, uma vez que esta técnica pode fornecer informações quantitativas significativas simultaneamente às qualitativas.

Assim, neste trabalho são apresentadas a base teórica da RMN de ¹H para análises quantitativas (RMNq), um exemplo de validação de método seguindo-se a Resolução RE n° 899 e o emprego deste método para análises quantitativas, simultaneamente às qualitativas, de formulações comerciais, nas quais o paracetamol é o princípio ativo majoritário.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DA RMNq

A teoria básica de RMN está descrita em vários livros texto e não é objeto deste artigo, somente o seu uso em análises quantitativas (RMNq).⁶ A relação fundamental mais importante das medidas de RMNq de ¹H é que a área do sinal de um espectro de RMN de ¹H (A_H) é diretamente proporcional ao número de hidrogênios (N_H) que absorvem energia na radiofrequência referente a este sinal, de acordo com a Equação 1, onde K_s é uma constante do espectrômetro.⁷

$$A_H = K_s N_H \quad (1)$$

Para que esta relação seja verdadeira em aparelhos de RMN pulsados, como os usados atualmente, é necessário que os spins dos hidrogênios estejam na condição de equilíbrio térmico, o que equivale a um tempo de repetição da sequência de pulsos de, pelo menos, cinco vezes o maior tempo de relaxação longitudinal (T_1).⁶ Após a aquisição do sinal de RMN no domínio do tempo, o espectro de RMN de alta resolução é obtido após a aplicação da transformada de Fourier. Neste caso, uma mesma molécula pode apresentar várias linhas espectrais, de acordo com as diferenças de deslocamento químico de seus núcleos de hidrogênio.⁷ Assim, para as análises quantitativas pode-se escolher um dos sinais de maior intensidade e que não se sobreponha aos outros sinais espectrais.

A maneira mais simples para se obter uma informação quantitativa

*e-mail: luiz.colnago@embrapa.br

através dos espectros de RMN é a determinação relativa, na qual a razão molar de dois compostos pode ser calculada empregando-se a Equação 2:⁷

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{A_x}{A_y} \frac{N_y}{N_x} \quad (2)$$

onde: n = quantidade de matéria (mol) de um composto; A = área referente à linha de ressonância e N = número de núcleos que absorvem na frequência da linha de ressonância.

Consequentemente, a fração molar de um determinado composto x em uma mistura com m componentes também pode ser calculada pela Equação 3:⁷

$$\frac{n_x}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{A_x / N_x}{\sum_{i=1}^m A_i / N_i} \quad (3)$$

Os primeiros estudos quantitativos de RMN surgiram utilizando esse tipo de quantificação. Em 1963, Jungnickel e Forbes demonstraram experimentalmente que a razão das áreas dos sinais de ¹H, em 26 substâncias orgânicas, correspondia à razão entre a quantidade de núcleos quimicamente diferentes, presentes nas moléculas.⁸ Hollis, também 1963, analisou diferentes misturas conhecidas de aspirina, cafeína e fenacetina e observou uma relação quantitativa entre as áreas dos sinais de RMN de ¹H e a porcentagem dessas substâncias nas misturas.⁹

Para a obtenção do teor de analito em uma determinada matriz, uma abordagem diferente deve ser utilizada: a quantificação absoluta. Para isso é necessário o emprego de um padrão interno (PI) de pureza conhecida e, a partir da razão da área da linha de ressonância correspondente ao padrão interno e da área do analito, efetuar o cálculo descrito na Equação 4:⁷

$$P_x = \frac{A_x}{A_{PI}} \frac{N_{PI}}{N_x} \frac{M_x}{M_{PI}} \frac{m_{PI}}{m} P_{PI} \quad (4)$$

na qual: x = analito; P = pureza; A = área do sinal de ressonância; N = número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância; M = massa molar; m = massa de amostra.

Nesse contexto, a medida quantitativa absoluta por RMN de alta resolução pode ser considerada como um método de padronização primária, uma vez que para a realização da análise é desnecessária a construção de uma curva de calibração, bem como o emprego de padrões de referência idênticos aos analitos.

Esta é uma grande vantagem da RMNq quando comparada às técnicas cromatográficas e demais técnicas espectroscópicas, as quais necessitam desses padrões para a construção da curva analítica, pois a aquisição desses compostos padronizados, muitas vezes, é um processo demorado (quando pode envolver importação) e nem sempre se encontram disponíveis no mercado mundial.

Apesar do custo considerável do equipamento de RMN, outras vantagens do emprego da RMNq podem ser destacadas: a possibilidade de determinação de estruturas a nível molecular (análise qualitativa simultânea à quantitativa); as medidas podem ser realizadas em tempo relativamente curto (considerando-se núcleos abundantes); dispensa isolamento do analito quando o mesmo estiver presente em mistura (desde que haja a seletividade necessária); possibilidade de análise simultânea de analitos diferentes em uma mesma medida (se houver seletividade), entre outras.⁷

A técnica RMNq, além de apresentar essas vantagens, fornece resultados similares ou superiores aos obtidos através de técnicas cromatográficas, quando o analito se encontra em alta concentração (constituente majoritário), como é o caso dos ativos em produtos

formulados. Esta comparação está documentada na literatura.¹⁰

Devido a fatos como esses, somados ao desenvolvimento de novos espectrômetros com maior sensibilidade e resolução, os métodos quantitativos via RMN estão em ascensão.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparo das amostras

O composto dimetil sulfona (material de referência certificado-MRC, rastreável ao *National Institute of Standards and Technology* - NIST) 99,65 ± 0,08%, empregado como padrão interno (PI), foi adquirido da Sigma Aldrich e a substância de referência (SR) de paracetamol 99,8%, da Fiocruz. As amostras comerciais avaliadas foram adquiridas no mercado local (São Carlos-SP).

Todas as pesagens foram realizadas em uma balança semimicro analítica, modelo AUW 220D, da Shimadzu (capacidade 82 g/220 g e precisão 0,1 mg/0,01 mg). Para as transferências de volumes se utilizaram micropipetas automáticas, modelo Research®, da Eppendorf, de volumes variáveis 10 -100 e 100 -1000 µL, previamente aferidas (erro < 1,0%).

Nos ensaios de seletividade/especificidade foram analisados os brancos: do solvente (BS); do padrão interno (BPI), da substância de referência (BSR) e das amostras comerciais (BST).

Para o ensaio de linearidade, pesaram-se 5 massas diferentes da SR, juntamente com uma determinada massa de PI (aproximadamente 5,0 mg), de forma a abranger uma faixa de trabalho de 1,0 a 10,0 mg. Essas amostras foram colocadas em tubos tipo Eppendorf, onde foram adicionados 600 µL DMSO-d₆ com agitação manual até completa solubilização. Em seguida, transferiram-se as soluções obtidas para os tubos de RMN de 5 mm, nos quais foram adicionados aproximadamente 10 µL de TMS (tetrametilsilano) para a calibração do espectro ($\delta = 0,00$ ppm) e o ajuste da homogeneidade do campo magnético principal.

Para os demais ensaios da validação foram preparadas amostras de 3 massas de SR diferentes (aproximadamente 1,0; 5,0 e 10,0 mg), em triplicata, da mesma maneira descrita anteriormente. Em um dos ensaios de robustez (*RBI*, *RBI* e *RBI*) as massas pesadas foram dissolvidas em metanol deuterado e não em DMSO-d₆, como nos outros ensaios.

Diferentes tipos de formulações comerciais foram analisados.

Formulações líquidas

As análises quantitativas dessas amostras foram realizadas em triplicata, da seguinte maneira:

- quantificação - transferiram-se alíquotas dos medicamentos (*sol1*, *sol2* e *sol3*) que contivessem em seus respectivos volumes uma massa de ativo de aproximadamente 5,0 mg para os tubos tipo Eppendorf, nos quais haviam massas de PI previamente pesadas. A estes tubos foi adicionado um volume tal de DMSO-d₆ que completasse os 600 µL e agitou-se manualmente até completa homogeneização;
- recuperação - prepararam-se amostras (*sol3*) da mesma maneira descrita anteriormente, pesando-se, juntamente com o PI, uma massa de aproximadamente 3,00 mg de SR.

Formulações sólidas

Para os comprimidos simples (*comp1* e *comp2*) e efervescente (*comp3*), inicialmente determinou-se a massa de cada comprimido a ser analisado e, então, realizou-se a moagem até se obter um pó fino. Para a cápsula (*comp4*), pesou-se a massa do medicamento em pó que estava no interior do revestimento. Essas amostras foram quantitativamente analisadas em triplicata, conforme descrição a seguir:

- quantificação - pesaram-se em tubos tipo Eppendorf, que continham aproximadamente 5,0 mg de paracetamol, massas de PI e dos comprimidos. A esses tubos foi adicionado um determinado volume de solvente (800 μL na amostra *comp2*; 1000 μL nas amostras *comp1* e *comp4* e 1100 μL na amostra *comp3*), seguido de agitação em um vortex durante 3 min, a 3000 rpm. Após agitação, as amostras foram submetidas à centrifugação durante 5 min, a 10000 rpm. Por fim, alíquotas das soluções sobrenadantes (600 μL da amostra *comp2* e 500 μL das demais) foram transferidas para os tubos de RMN de 5 mm, nos quais foram adicionados aproximadamente 10 μL de TMS (tetrametilsilano). Nos tubos de RMN que continham as amostras *comp1*, *comp3* e *comp4* foram também adicionados mais 100 μL de solvente DMSO- d_6 ;
- recuperação - adicionaram-se 500 μL das soluções restantes, que foram reservadas, aos tubos tipo Eppendorf contendo uma massa de SR previamente pesada e procedeu-se da mesma maneira descrita anteriormente.

Para a análise de outros ativos presentes em algumas das formulações estudadas, prepararam-se novas amostras *sol3* e *comp3*, também em triplicata. Para isso, 450 μL da amostra *sol3* foi diluída em 150 μL de DMSO- d_6 e os 600 μL da solução obtida foram transferidos para um tubo de RMN de 5 mm, no qual foram adicionados aproximadamente 10 μL de TMS. Um branco da amostra *comp3* em D_2O foi previamente preparado dissolvendo-se aproximadamente 10 mg da amostra em 600 μL do solvente. As massas de *comp3* pesadas para as quantificações foram dissolvidas em 1200 μL de água deuterada (D_2O). Após agitação no vortex (3 min, 3000 rpm) e centrifugação (5 min, 10000 rpm), 600 μL da solução obtida foram transferidos para um tubo de RMN. Neste caso, o ajuste da homogeneidade do campo magnético principal e a referência da escala de deslocamento químico foram realizados baseando-se no sinal da água ($\delta = 4,81$ ppm).

Análises por RMN

As medidas de RMN de ^1H foram executadas à temperatura ambiente ($T \approx 21$ °C), em um espectrômetro Varian INOVA 400 de 9,4 Tesla, utilizando-se uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm, com um giro de 20 Hz.

Com uma das réplicas preparadas, inicialmente realizou-se a calibração do pulso variando-se o tempo de duração do mesmo (pw) de 13,4 até 40 μs , a uma potência (tpwr) de 52 dB. Obteve-se um tempo de 17,15 μs para um pulso de 90°.

Após determinação desse parâmetro, estimou-se o tempo de relaxação longitudinal (T_1) empregando-se a sequência de pulsos de inversão e recuperação; o T_1 obtido para o sinal de interesse mais lento foi de 3,5 s. Considerando-se o tempo estimado neste experimento e um tempo de aquisição (at) igual a 6,7 s, o tempo de reciclo estabelecido foi de 20 s (d_1). Foram acumulados 8 transientes (nt) com 64000 pontos durante a aquisição (np) em uma janela espectral (sw) de 4799,9 Hz e um ganho igual a 42, para as ensaios de validação, e 22, para algumas das amostras comerciais.

Os espectros foram processados com 65536 pontos (fn), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um lb = 0,3 Hz, correções automáticas da linha de base e correção manual da fase. As integrações também foram executadas manualmente, respeitando-se um intervalo de 20 vezes a largura de linha (v) à meia-altura do sinal ($20 \times \Delta v_{1/2}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, o estudo foi particularizado para formulações farmacêuticas de mesmo princípio ativo majoritário, o paracetamol. O paracetamol é um dos analgésicos/antipiréticos mais vendidos no

mundo (há mais de 15 marcas com essa substância), que pode ser adquirido sem prescrição médica.¹¹ Devido a esta grande e crescente demanda, muitos métodos para a quantificação desse composto são encontrados na literatura,¹² porém, na maioria das vezes, esses métodos são complicados e não estão de acordo com as exigências da ANVISA.

Métodos oficiais para análise de paracetamol em diferentes formulações farmacêuticas são encontrados em farmacopeias, inclusive na brasileira. Os métodos descritos nas monografias das farmacopeias para a determinação do teor do ativo abordam análises por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência, as quais exigem etapas trabalhosas de preparação de amostra.¹³

Neste caso, a utilização da RMN, além de ser mais prática, mais rápida e exigir menor quantidade de solventes, possibilitaria a quantificação de outros compostos presentes, além de fornecer, simultaneamente, as informações qualitativas presentes no espectro obtido, o qual poderia ser empregado nos ensaios de identificação do princípio ativo e dos excipientes, o que eliminaria mais algumas etapas analíticas.

A Figura 1A apresenta o espectro de RMN de ^1H e a estrutura do paracetamol, N-(4-hidroxifenil) acetamida, (MM=151,1626 g/mol). A quantificação desse analito foi realizada em relação ao composto dimetil sulfona (MM=94,1338 g/mol), empregado como padrão interno (PI). O espectro de ^1H adquirido, a estrutura química e a atribuição dos sinais dos hidrogênios deste composto estão ilustrados na Figura 1B. Os sinais usados na quantificação foram os simpletos localizados em 1,99 ppm, referentes ao grupo metila do paracetamol (3H), e em 3,00 ppm, referentes aos dois grupos metila do PI (6H).

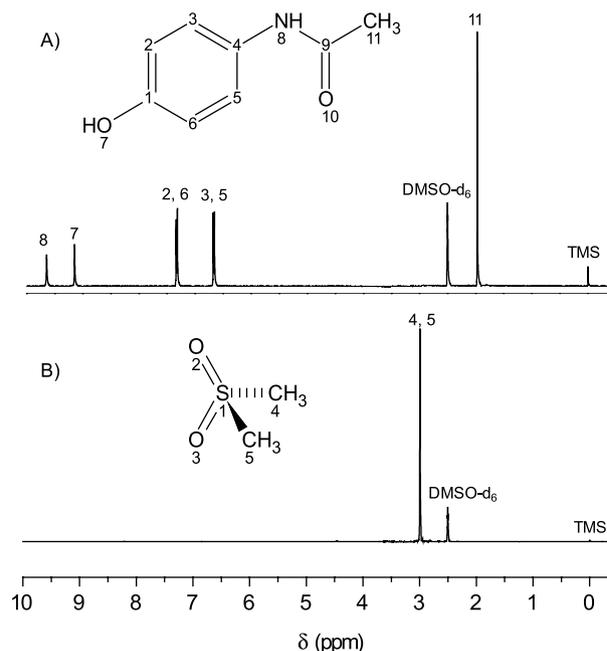


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H da substância de referência, paracetamol (A), e do material de referência certificado, dimetil sulfona (B), com as atribuições dos sinais numerados nas respectivas fórmulas estruturais

O intervalo de integração empregado para a quantificação ($20 \times \Delta v_{1/2}$) foi o mesmo para ambos os sinais e corresponde a aproximadamente 97% da área total de um sinal lorentziano.¹⁴ No entanto, essa porcentagem não é relevante no método proposto, uma vez que nos cálculos efetuados para a quantificação se utiliza a razão das áreas do analito e do padrão interno. Como o intervalo de integração foi o mesmo para ambos os sinais, essa porcentagem

é idêntica e se cancela nos cálculos. Por isso, o importante nesses casos é garantir que o intervalo de integração seja o mesmo para os sinais a serem integrados.

Validação do método por RMN de ¹H

A validação do método para a quantificação de paracetamol foi realizada baseando-se na Resolução RE nº 899 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, de 29/05/2003, aprovada pelo Adjunto da Diretoria Colegiada da ANVISA, em março de 2003.¹ De acordo com essa resolução, devem ser realizados os ensaios de especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetitividade e intermediária), exatidão e robustez na validação de métodos para a determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.¹

O objetivo do ensaio de especificidade/seletividade é garantir que os sinais a serem integrados para a quantificação correspondam apenas ao analito. Para isso, foram obtidos separadamente os espectros do solvente, do padrão interno e da substância de referência. Desta maneira, verificou-se que os sinais presentes em cada um dos espectros não se sobrepunham.

Na Tabela 1 estão descritos os resultados médios obtidos nos demais ensaios da validação do método analítico.

Tabela 1. Valores dos parâmetros de validação por RMNq

Ensaio	Resultado ^a	Valor aceito ^b
linearidade	r = 0,991	r ≥ 0,99
exatidão	99,39%	98-102% ^c
repetitividade	CV = 2,5%	CV ≤ 5,0%
precisão intermediária	CV = 1,7%	
robustez	CV = 2,5%	

^a resultado obtido a partir da média de todas as replicatas analisadas (n = 9); ^b valores de acordo com a Resolução RE nº 899; ^c intervalo de acordo com a NBR ABNT 14029

A curva de linearidade foi construída com 5 concentrações diferentes do analito, conforme recomendação da Resolução RE nº 899.¹ O intervalo ficou determinado pelo menor (1,0 mg) e maior (10,0 mg) ponto dessa curva, a qual resultou em um coeficiente de correlação (r) igual a 0,991. Como o valor obtido foi superior ao critério mínimo de aceitação descrito na RE nº 899 (r ≥ 0,99),¹ o ensaio de linearidade foi considerado válido.

Apesar da normativa em questão exigir o ensaio de linearidade, para dados de RMN a necessidade deste ensaio pode ser questionada, devido a particularidades da técnica. Como a área do sinal de RMN sempre será proporcional ao número de núcleos (Equação 1), a linearidade poderia ser considerada intrínseca da técnica, uma vez que em qualquer faixa de trabalho o sinal de resposta será diretamente proporcional à concentração do analito. Para medidas de RMN, esta faixa de trabalho é delimitada pelo limite de quantificação (nível inferior) e pelo nível superior que dependerá da solubilidade da amostra nos 600 µL de solvente empregado no seu preparo ou do receptor do espectrômetro, pois, caso a amostra seja bastante solúvel, os sinais oriundos da sua alta concentração saturarão o receptor.

O ensaio de exatidão foi realizado aplicando-se o método analítico proposto na análise de uma substância de pureza conhecida: a substância de referência de paracetamol. De acordo com a normativa seguida, a exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 5:¹

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{pureza média experimental}}{\text{pureza teórica}} \times 100 \quad (5)$$

Para a determinação da área do analito, realizou-se a integração respeitando-se a sua largura de linha (20 x Δv_{1/2}), de forma similar ao tratamento dado ao sinal do PI. A área do sinal do PI foi referenciada como 1000 e obteve-se o valor para a área do analito em relação a esta área de referência.

Os valores da pureza média experimental (teor em %, m/m) foram calculados a partir da Equação 4 e os de exatidão a partir da Equação 5. O resultado médio obtido, 99,39% de exatidão, foi considerado satisfatório e também válido, baseando-se na norma da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) NBR 14029 (98-102%),¹⁵ já que não há especificação na Resolução RE nº 899.

Os ensaios de repetitividade e de precisão intermediária avaliam a precisão do método analítico, a qual pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%).¹

Conforme a Resolução RE nº 899, a repetitividade do método foi avaliada a partir dos resultados de 9 determinações, contemplando-se o intervalo linear do método com 3 replicatas cada e utilizando-se as mesmas amostras analisadas no ensaio de exatidão. O ensaio de precisão intermediária foi realizado por outro analista, após 2 dias, de acordo com o recomendado na normativa. Os resultados obtidos em ambos os ensaios foram considerados válidos, pois resultaram em coeficientes de variação menores do que o máximo permitido na Resolução RE nº 899 (CV% ≤ 5,0).¹

O ensaio de robustez é importante para se constatar a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas. Essas variações deverão ser controladas e devem ser incluídas precauções no procedimento.¹

A primeira variável modificada foi a massa de PI empregada nos ensaios. Diferentemente dos ensaios anteriores, nos quais se utilizaram aproximadamente 5,0 mg de PI, o ensaio de robustez foi feito inicialmente com o emprego de aproximadamente 1,0 mg de PI. Nessas condições verificou-se que a precisão e a exatidão foram inferiores e excederam o limite de CV aceito pela normativa; isso se deveu, muito provavelmente, ao fato dessa massa estar mais próxima do erro da balança (± 0,01 mg). Concluiu-se, então, que uma massa de 1,0 mg de PI não poderia ser empregada no método, com a balança utilizada.

Em seguida, novamente variou-se a massa de PI, mas para um valor superior (10 mg) ao empregado nos outros ensaios, juntamente com a utilização de metanol deuterado no lugar do DMSO-d₆. Essas modificações não resultaram em alterações significativas na precisão e na exatidão do método, quando comparadas aos ensaios de repetitividade e de exatidão. Concluiu-se que uma massa de PI superior a 5,0 mg poderia ser empregada, assim como outros solventes, desde que os sinais não coincidam com os sinais de interesse do analito e do PI, ou seja, que não interfiram na seletividade/especificidade do método.

Quantificação das amostras comerciais

Inicialmente avaliaram-se os espectros de RMN de ¹H das amostras comerciais (brancos) para verificação da seletividade/especificidade. Ficou evidente, a partir da medida da relação entre as áreas dos sinais do paracetamol, que o sinal presente em 1,99 ppm pertencia somente ao analito de interesse. Além disso, observou-se também que não havia sinais que coincidiriam com o sinal do PI em 3,00 ppm.

Paralelamente à aquisição do branco de cada uma das amostras foram realizadas medidas de estimativas de T₁ para verificar se a presença dos excipientes interferiria nesse parâmetro e, consequentemente, se haveria necessidade de alterar o tempo de reciclo. Como

essa interferência não foi observada em nenhum caso pôde-se trabalhar com o mesmo valor de d1 empregado na validação.

Por fim, seguindo-se o método desenvolvido e validado analisaram-se algumas amostras comerciais, codificadas por *sol1*, *sol2*, *sol3*, *comp1*, *comp2*, *comp3* e *comp4*, e oriundas de diferentes tipos de formulações, como formulações líquidas, cápsulas, comprimidos simples e efervescentes.

Formulações líquidas

A obtenção do valor das massas de analito presentes nas alíquotas analisadas foi feita através da Equação 6 (Equação 4 modificada):

$$m_{\text{analito}} = \frac{A_x \times N_{PI} \times M_x \times m_{PI} \times P_{PI}}{A_{PI} \times N_x \times M_{PI}} \quad (6)$$

A seguir, empregando-se o resultado obtido para uma das replicatas, exemplifica-se o cálculo efetuado para a obtenção do teor de analito presente em uma das formulações:

$$\frac{0,00448 \text{ g paracetamol}}{25 \mu\text{L de medicamento}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = \frac{179,2 \text{ mg paracetamol}}{\text{mL}} = 179,2 \text{ mg/mL}$$

Considerando-se as concentrações descritas nas respectivas bulas, a média dos resultados obtidos (Tabela 2) mostra que os três produtos avaliados (*sol1*, *sol2* e *sol3*) atendem à exigência da farmacopeia, que normatiza as variações do princípio ativo, paracetamol, em formulações líquidas entre 90-110% no medicamento.¹³

Como as amostras eram líquidas, o procedimento de preparo de amostra teve que ser um pouco diferente do seguido nos ensaios da validação. Por esse motivo, foi realizado um ensaio de recuperação, de forma a avaliar a exatidão e a precisão. Procedeu-se a este ensaio da maneira recomendada pela Resolução RE n° 899: nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, se aceita a análise do método de adição de padrão, no qual se adicionam quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.¹

A massa de analito determinada neste ensaio refere-se à quantidade presente nos 50 μL de medicamento de acordo com o teor quantificado anteriormente, somada à quantidade de SR adicionada. Dessa forma, o cálculo de recuperação foi realizado empregando-se a Equação 7.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{m_{\text{analito total}}}{m_{\text{analito no medicamento}} + m_{\text{SR}}} \times 100 \quad (7)$$

O resultado médio obtido no ensaio de recuperação foi

considerado satisfatório e válido, uma vez que o CV está abaixo do máximo exigido pela normativa seguida, e a média da porcentagem de recuperação atende à ABNT NBR 14029 (98-102%).¹⁵ É importante ressaltar que não há especificação alguma sobre recuperação na Resolução RE n° 899.

Formulações sólidas

Embora tenham sido analisadas apenas alíquotas das soluções previamente preparadas, os valores das massas totais de analito podem ser obtidos da mesma maneira descrita para as soluções orais, empregando-se a Equação 7, uma vez que a razão da massa de PI e a massa de amostra será constante, independente do volume analisado.

A determinação do teor de analito está exemplificada, utilizando-se o resultado obtido para uma das amostras, a massa do comprimido inteiro (0,85867 g) e a massa do comprimido analisada (0,01170 g).

$$\frac{0,01041 \text{ g paracetamol}}{0,01170 \text{ g medicamento}} \times \frac{0,85867 \text{ g medicamento}}{1 \text{ comprimido}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = \frac{764,00 \text{ mg paracetamol}}{\text{comprimido}} = 764,00 \text{ mg/comp.}$$

Considerando-se as concentrações descritas nas bulas, a média dos resultados obtidos (Tabela 2) mostra que os produtos codificados como *comp1*, *comp2* e *comp4* atendem à exigência da farmacopeia, pois a mesma normatiza que as variações do princípio ativo paracetamol em comprimidos estejam entre 95-105% no medicamento.¹³ Por outro lado, como a variação para a amostra *comp3* foi de 91,98%, esta amostra foi considerada suspeita.

Assim como para as amostras líquidas, o procedimento de preparo de amostra para tipo de comprimido teve que ser um pouco diferente do executado nos ensaios da validação, uma vez que as amostras sólidas nem sempre foram total e/ou facilmente solúveis no solvente empregado. Isso se deve à presença de outros compostos, denominados excipientes. Novamente realizaram-se ensaios de recuperação para a verificação da exatidão e da precisão, conforme as recomendações da Resolução RE n° 899.

A massa de analito determinada neste ensaio refere-se à quantidade presente nas alíquotas analisadas de solução de medicamento, somada à massa de SR adicionada. Dessa forma, primeiramente calculou-se a quantidade de analito presente na alíquota analisada, aplicando-se a Equação 8, considerando-se o resultado médio do teor, determinado anteriormente:

$$m_{\text{aliquota}} = V_{\text{aliquota}} \times \frac{m_{\text{amostra}}}{V_{\text{total}}} \times \frac{1 \text{ comp.}}{m_{\text{comp.}}} \times \text{Teor}_{\text{médio}} \quad (8)$$

na qual: m_{aliquota} = massa de analito presente na alíquota analisada; V_{aliquota} = volume da alíquota de solução analisada; m_{amostra} = massa

Tabela 2. Resultados obtidos para as amostras comerciais avaliadas usando-se a RMNq

Amostra	Formulação	Teor _{RMNq}	CV (%)	Teor _{bula}	Tolerância da farmacopeia
<i>sol1</i>	líquida	183,4 (mg/mL)	2,94	200 (mg/mL)	180-220 (mg/mL)
<i>sol2</i>		187,2 (mg/mL)	2,83		
<i>sol3</i>		96,8 (mg/mL)	1,61	100 (mg/mL)	90-100 (mg/mL)
<i>comp1</i>	comprimido simples	761,4 (mg/comp.)	2,24	750 (mg/comp.)	712,5-787,5 (mg/comp.)
<i>comp2</i>		746,9 (mg/comp.)	4,32		
<i>comp3</i>	comprimido efervescente	459,9 (mg/comp.)	2,15	500 (mg/comp.)	475-525 (mg/comp.)
<i>comp4</i>	cápsula	390,2 (mg/comp.)	1,95	400 (mg/comp.)	380- 420 (mg/comp.)

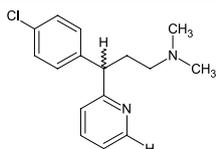
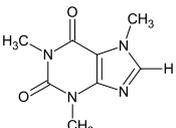
de amostra pesada para o preparo da solução; V_{total} = volume total da solução; m_{comp} = massa do comprimido inteiro.

Após a determinação da massa de analito presente na alíquota analisada, efetuou-se o cálculo de recuperação, também se empregando a Equação 7. Os ensaios de recuperação apresentaram boa precisão ($CV\% \leq 5,0$) para todas as amostras. No entanto, a porcentagem de recuperação para o comprimido simples foi inferior aos 98%, exigidos na ABNT NBR 14029, e igual a 90,78%.

Quantificação simultânea de outros princípios ativos

Com o intuito de se demonstrar a viabilidade de quantificações simultâneas via RMNq, foram estudadas 2 das amostras comerciais analisadas anteriormente, as quais possuíam outros ativos, como cafeína e maleato de clorfeniramina (Tabela 3) em sua composição. Como a concentração desses princípios ativos nos medicamentos é inferior à do paracetamol, prepararam-se amostras mais concentradas, a fim de aumentar a razão S/R dos sinais dessas substâncias.

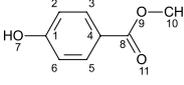
Tabela 3. Informações sobre a cafeína e maleato de clorfeniramina, quantificados por RMNq nas formulações farmacêuticas

Amostra	Ativo	Teor _{bula}	Fórmula estrutural
sol3	maleato de clorfeniramina	2,0 mg/mL	
comp3	cafeína	65 mg/comp.	

Na Figura 2 estão os espectros dessas 2 amostras. O sinal empregado para a quantificação do maleato de clorfeniramina, situado em 8,54 ppm, refere-se ao hidrogênio *orto* ao nitrogênio do anel heteroaromático. Para a cafeína, empregou-se o sinal situado em 7,79 ppm, referente ao hidrogênio olefínico.

Os resultados obtidos por RMNq estão de acordo com os valores descritos nas respectivas bulas dos medicamentos, com 421 e 65,1 mg/mL de paracetamol e de cafeína na amostra *comp3*, respectivamente, e 96,8 mg/mL de paracetamol e de 2,04 mg/mL de maleato de clorfeniramina na amostra *sol3*. Esses resultados, obtidos simultaneamente ao paracetamol em um mesmo espectro são bastante promissores e podem ser melhorados através de otimizações no método analítico.

Tabela 4. Identificação de alguns dos excipientes identificados na amostra *sol3*

Molécula	Sinal atribuído	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
 álcool etílico (A)	-CH ₃	1,17	triplete	7,10
	-CH ₂	3,61	quadrupeto	7,10
 propilenoglicol (B)	-CH ₃	1,13	dupeto	6,29
	-CH	3,81	multipeto	-
	-CH ₂	3,43	dupeto	5,55
 metilparabeno (C)	-CH ₃	3,44	simpleto	-

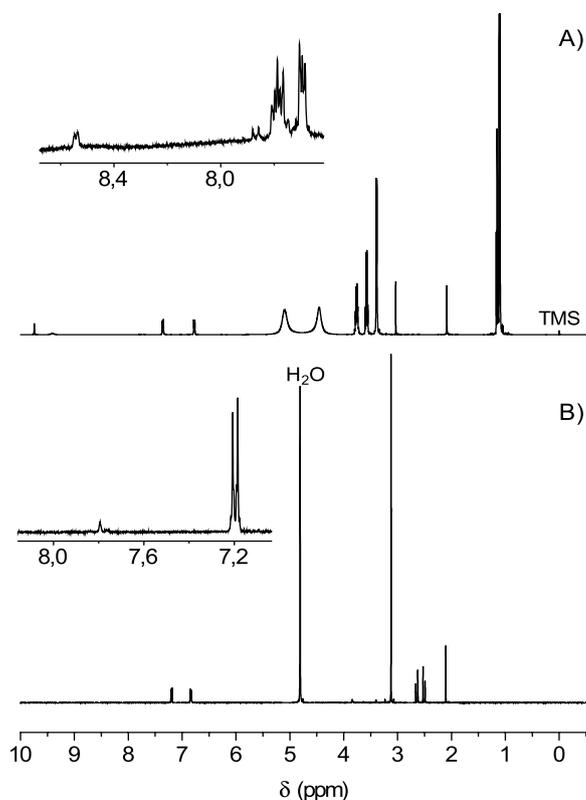


Figura 2. Espectro de RMN de ¹H da amostra *sol3* (A), com ampliação da região de 8,69 a 7,61 ppm para visualização do sinal do maleato de clorfeniramina em 8,54 ppm, destacado na estrutura ilustrada na Tabela 3, e da amostra *comp3* (B), com ampliação da região de 8,26 a 7,02 ppm para visualização do sinal da cafeína em 7,79 ppm, também destacado na Tabela 3

Análises qualitativas das formulações

Além da análise quantitativa, a RMNq permitiu identificar alguns dos excipientes como o álcool etílico, o propilenoglicol e, possivelmente, o metilparabeno (Tabela 4), presentes na amostra *sol3*, em conformidade com o indicado na bula. A ampliação do espectro dessa amostra está ilustrada na Figura 3, na qual constam as atribuições para esses três compostos.

Nas formulações líquidas *sol1* e *sol2*, identificou-se o excipiente denominado macrogol. Esta identificação foi baseada no tripleto ($J = 5,45$ Hz), atribuído aos hidrogênios metilênicos, e situado em 4,65 ppm, no espectro da amostra *sol1*, e em 4,63 ppm, no espectro da *sol2*. A partir dessas informações qualitativas, também seria possível

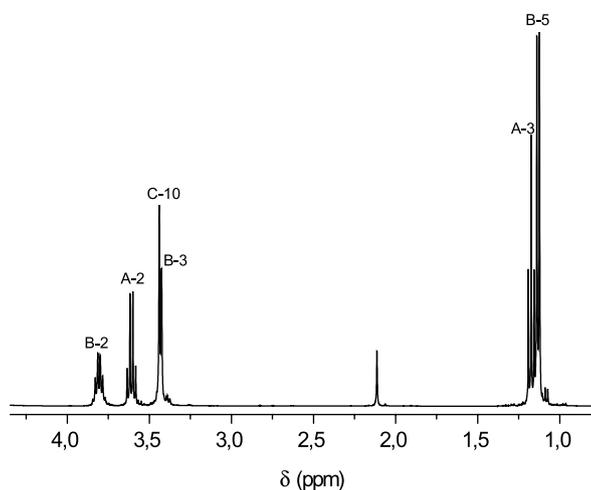


Figura 3. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (4,35 a 0,79 ppm) da amostra sol3, com a atribuição dos excipientes identificados: A) álcool etílico; B) propilenoglicol e C) metilparabeno

efetuar as quantificações dos excipientes simultaneamente às dos princípios ativos, de forma similar à demonstrada para o paracetamol, a cafeína e o maleato de clorfeniramina.

CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou a viabilidade da aplicação da técnica de RMN de alta resolução para análises quantitativas e qualitativas de formulações farmacêuticas através de experimentos observando-se o ^1H . O método proposto foi validado, em conformidade com a Resolução RE n° 899 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Empregando-se o método validado, o teor de paracetamol presente em 7 amostras comerciais foi determinado e apenas em uma delas o resultado obtido se apresentou fora da tolerância da farmacopeia.

A quantificação simultânea de princípios ativos diferentes mostrou ser um método bastante promissor, assim como as análises qualitativas dos espectros de RMN de ^1H das amostras comerciais, as quais propiciaram a identificação de outros componentes presentes na formulação (excipientes) de algumas das amostras analisadas. Nesse contexto, concluiu-se que uma única medida de RMN de ^1H pode fornecer informações estruturais significativas sobre ativos e excipientes, além das informações quantitativas desses compostos, o que contribuiu para um controle de qualidade eficiente, simples e rápido.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA; *Resolução-RE n° 899*, de 29 de maio de 2003.
2. Santos, J. V.; Carvalho, L. A. E. B.; Pina, M. E.; *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 283; Silva, G. R.; Lages, G. P.; Pianetti, G. A.; Nunan, E. A.; Soares, C. D. V.; Campos, L. M. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1159; Kolomiets, O.; Hoffmann, U.; Geladi, P.; Siesler, H. W.; *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62*, 1200; Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 683; Cantarelli, M. A.; Pellerano, R. G.; Marchevsky, E. J.; Camina, J. M.; *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 73.
3. Malz, F.; Jancke, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 813; Tavares, L. A.; Ferreira, A. G.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 911; Maniara, G.; Rajamoorthi, K.; Rajan, S.; Stockton, G. W.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4921; He, W.; Du, F.; Wu, Y.; Wang, Y.; Liu, X.; Liu, H.; Zhao, X.; *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 809; Gadape, H. H.; Parikh, K. S.; *e-J. Chem.* **2011**, *8*, 767; Bekiroglu, S.; Myrberg, O.; Ostman, K.; Ek, M.; Arvidsson, T.; Rundlöf, T.; Hakkarainen, B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 958.
4. Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel, B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 806.
5. Holzgrabe, U.; Diehl, B. W. K.; Wawer, I.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 557.
6. Gil, V. M. S.; Geraldles, C. F. G. C.; *Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos, Métodos e Aplicações*, 1ª ed.; Ed. Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1987; Claridge, T. D. W.; *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 1ª ed.; Tetrahedron Organic Chemistry Series, Elsevier: Amsterdam, 1999.
7. Holzgrabe, U.; Diehl, B.; Wawer, I.; *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, 1ª ed.; Elsevier: Amsterdam, 2008.
8. Jungnickel, J. L.; Forbes, J. W.; *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 938.
9. Hollis, D. P.; *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1682.
10. Podgorskii, V. V.; Mikhalev, A. S.; Kalabin, G. A.; *Pharm. Chem. J.* **2011**, *45*, 194; Liu, N. Q.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; van der Kooy, F.; *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 451; Choi, Y. H.; Kim, H. K.; Wilson, E. G.; Erkelens, C.; Trijzelaar B.; Verpoorte, R.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *512*, 141.
11. http://www.medley.com.br/portal/src/noticias_det.asp?id=145, acessada em Julho 2012.
12. Baptista, M.; Rocha, W. F. D.; Poppi, R. J.; *J. Mol. Struct.* **2011**, *1002*, 167; Ganghi, S. V.; Ranher, S. S.; Deshpande, P. B.; Shah, D. K.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1068; Oliveira, G. G.; Janegitz, B. C.; Batista, M. B.; Salami, F. H.; Fatibello-Filho, O.; Leite, O. D.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1755.
13. *Farmacopeia Brasileira*, ANVISA, Brasília, 5ª ed.; 2010, vol. 2, p. 1189-1193.
14. Griffiths, L.; Irving, A. M.; *Analyst* **1998**, *123*, 1061.
15. ABNT; *NBR 14029 Agrotóxicos e Afins – Validação de Métodos Analíticos*, 2005.