

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS / CTM

MARIANA RAMOS TONIOLO

VERIFICAÇÃO FARMACOPÉICA DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE
DOSEAMENTO DE BISOPROLOL COMPRIMIDOS POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

RIO DE JANEIRO

2016

MARIANA RAMOS TONIOLO

VERIFICAÇÃO FARMACOPÉICA DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE
DOSEAMENTO DE BISOPROLOL COMPRIMIDOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Monografia apresentada ao Curso de Pós
Graduação *Lato Sensu* como requisito para
obtenção do título de Especialista em
Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Me. Marcelo Henrique da Cunha
Chaves.

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

T663v Toniolo, Mariana Ramos

Verificação farmacopéica de metodologia analítica de doseamento de Bisoprolol comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. / Mariana Ramos Toniolo. – Rio de Janeiro, 2016.

viii, 34 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: MSc. Marcelo Henrique da Cunha Chaves.

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais Farmacêuticas, 2016.

Bibliografia: f. 34

1. Verificação Farmacopéica. 2. Validação de Metodologia Analítica. 3. Bisoprolol. I. Título.

CDD 615.1

MARIANA RAMOS TONIOLO

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós Graduação *Lato Sensu* do Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Me. Marcelo Henrique da Cunha Chaves

BANCA EXAMINADORA

Eliane dos Santos Machado, Especialista, Farmanguinhos / Fiocruz

Jovana de Mello Rosas, Especialista, Farmanguinhos / Fiocruz

RESUMO

O acompanhamento de fármacos e medicamentos requer um rigoroso controle de qualidade. Grande parte das propostas analíticas aplicadas à análise de medicamentos está baseada em técnicas de quantificação de fármacos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE). O bisoprolol é um beta bloqueador cardiosseletivo utilizado na hipertensão, insuficiência cardíaca crônica e angina pectoris. Para a quantificação do bisoprolol, o método indicado é por CLAE. A validação de metodologia analítica tem como propósito demonstrar que um método é adequado para a determinação de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Existem guias e legislações que servem como diretrizes a serem adotadas no processo de validação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza a utilização dos métodos analíticos descritos na Farmacopéia Brasileira e admite a adoção de farmacopeias estrangeiras. As metodologias analíticas compendiais são consideradas validadas, porém é necessário demonstrar suas adequabilidades nas condições do laboratório antes da implementação. O presente estudo teve como objetivo demonstrar que a metodologia analítica descrita na farmacopeia americana para doseamento de bisoprolol em comprimidos é específica, linear, exata e precisa para o produto Bisoprolol Comprimidos 10 mg, que será lançado por indústria farmacêutica no Brasil. A especificidade foi realizada com amostras da solução branco, solução placebo, solução do insumo farmacêutico ativo (IFA), solução placebo contaminado e solução amostra do produto. Para a linearidade e intervalo, foram feitas três curvas a partir das concentrações de 80%, 90%, 100%, 110% e 120%. A exatidão foi verificada a partir de 9 determinações em 3 concentrações, baixa, média e alta. Para a precisão, foram preparadas seis amostras do produto. O método provou ser específico, linear, exato e preciso, podendo ser utilizado no controle de qualidade do fabricante do produto.

Palavras-chave: Verificação farmacopeica. Validação de metodologia analítica. Bisoprolol.

ABSTRACT

The monitoring of drugs and medications requires a strict quality control. Most of the proposed analytical applied to the analysis of medicines are based on techniques of quantification of drugs by liquid chromatography of high efficiency. Bisoprolol is a beta blocker used cardioselective in hypertension, chronic heart failure and angina pectoris. For quantification of bisoprolol, the method is indicated by liquid chromatography of high efficiency. The analytical methodology validation aims to demonstrate that the method is suitable for determination of drugs and other substances in pharmaceuticals. Products there are guides and laws that serve as guidelines to be adopted in the validation process. The Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recommends the use of analytical methods described in the Brazilian Pharmacopoeia and admits the adoption of foreign pharmacopoeia. The compendial analytical methodologies are considered validated, but is necessary to demonstrate their adequabilidades in laboratory conditions prior to implementation. This study aimed to demonstrate that the analytical methodology described in the US pharmacopoeia for bisoprolol dosage tablet is specific, linear, accurate and precise for the product Bisoprolol Tablets 10 mg, which will be released by the pharmaceutical industry in Brazil. Specificity was performed with samples of the white solution, placebo solution, solution raw material assets, contaminated placebo solution and sample solution of the product. For the linearity and range, three curves were made from the 80% concentration, 90%, 100%, 110% and 120%. The accuracy was verified from 9 determinations in 3 concentrations, low, medium and high. For precision, they were prepared six samples of the product. The method proved to be specific, linear, accurate and can be used in quality control of the product manufacturer.

Keywords: Pharmacopoeia Check. Validation of analytical methodology. Bisoprolol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do bisoprolol (MOFFAT et al, 2011).	10
Figura 2 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução padrão	24
Figura 3 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução branco	25
Figura 4 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução placebo	25
Figura 5 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução matéria-prima do ativo.....	26
Figura 6 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução placebo contaminado.....	26
Figura 7 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução produto	27
Figura 8 – Linearidade 1	29
Figura 9 – Linearidade 2	29
Figura 10 – Linearidade 3	29
Figura 11 – Gráfico de Resíduos.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Limites porcentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos (BRASIL, 2003).....	12
Tabela 02. Reagentes	16
Tabela 03. Materiais e Equipamentos	16
Tabela 04. Matéria-Prima ativa	16
Tabela 05. Coluna Cromatográfica.....	16
Tabela 06. Padrão de Referência.....	17
Tabela 07. Componentes do placebo.....	17
Tabela 08. Volume de cada Solução Mãe para o preparo das soluções do teste de linearidade.....	21
Tabela 09. Quantidade em miligramas utilizada do ativo para o preparo das amostras do teste de exatidão.....	22
Tabela 10. Resultados obtidos das amostras no teste de especificidade	27
Tabela 11. Resultados obtidos das amostras no teste de linearidade	30
Tabela 12. Resultados obtidos das amostras no teste de linearidade	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	<i>CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)</i>	9
2.2	<i>BISOPROLOL</i>	9
2.3	<i>VALIDAÇÃO</i>	10
2.3.1	PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO	11
2.3.1.1	<i>Especificidade</i>	11
2.3.1.2	<i>Linearidade</i>	11
2.3.1.3	<i>Intervalo</i>	11
2.3.1.4	<i>Precisão</i>	12
2.3.1.5	<i>Limite de Detecção</i>	13
2.3.1.6	<i>Limite de Quantificação</i>	13
2.3.1.7	<i>Exatidão</i>	13
2.3.1.8	<i>Robustez</i>	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	OBJETIVO	15
5	METODOLOGIA	16
5.1	<i>MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS</i>	16
5.2	<i>METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE BISOPROLOL NO PRODUTO</i>	17
5.3	<i>DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO E PREPARO DAS AMOSTRAS</i>	19
5.3.1	PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO	19
5.3.1.1	<i>Especificidade</i>	19
5.3.1.2	<i>Linearidade</i>	20
5.3.1.3	<i>Exatidão</i>	21
5.3.1.4	<i>Precisão</i>	22
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1	<i>ESPECIFICIDADE</i>	24
6.2	<i>LINEARIDADE</i>	28
6.3	<i>EXATIDÃO</i>	31
6.4	<i>PRECISÃO</i>	31
7	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O acompanhamento contínuo de fármacos, medicamentos e produtos utilizados no tratamento de pessoas debilitadas por um sintoma ou uma doença, é indispensável e requer um rigoroso controle de qualidade. Em função da importância que esta espécie de controle envolve, grande parte das propostas analíticas aplicadas à análise de medicamentos está baseada em técnicas instrumentais modernas, muitas vezes lentas e dispendiosas. Dentre as técnicas utilizadas na quantificação de fármacos é possível destacar a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (SANTOS, 2009).

A garantia de que uma técnica de quantificação seja capaz de reproduzir resultados confiáveis sobre uma amostra deve ser assegurada por uma verificação do método analítico denominada validação. A validação de um método inicia na elaboração da técnica analítica e segue durante todo o seu desenvolvimento e transferência. Todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica para registro de novos produtos. Um procedimento de validação comprovado e registrado apresenta às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica com grandes avanços na área cromatográfica, na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. As separações em CLAE podem se dar por adsorção, partição ou ambos. O suporte mais comumente utilizado é a sílica. A realização da CLAE requer a utilização de um cromatógrafo composto por amostrador, bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador. Os detectores mais utilizados são os que possuem lâmpadas adequadas para a detecção de compostos que absorvem nas faixas dos comprimentos de onda ultra-violeta/visível. Um detector de arranjo diodo é capaz de quantificar o analito em mais de um comprimento de onda (DEGANI *et al*, 1998).

2.2 BISOPROLOL

O bisoprolol é um beta bloqueador cardiosseletivo. É encontrado na forma de fumarato e é utilizado na hipertensão, insuficiência cardíaca crônica e angina pectoris (MARTINDALE, 2007).

Efeitos adversos causados por alto níveis de bisoprolol foram relatados na bula do medicamento, sendo de grande importância a determinação desta substância.

Algumas técnicas para identificação de bisoprolol em medicamentos são utilizadas, tais como cromatografia em fase líquida de alta eficiência, cromatografia

em camada delgada, cromatografia gasosa, espectrometria ultravioleta, e espectrometria de massas. Para a quantificação, o método usualmente indicado é por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (MOFFAT *et al*, 2011). A Figura 01 representa a estrutura química do bisoprolol.

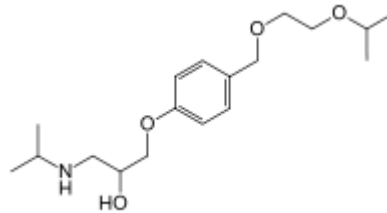


Figura 1 – Estrutura química do bisoprolol (MOFFAT *et al*, 2011).

2.3 VALIDAÇÃO

A validação de metodologia analítica tem como guia a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, e tem o objetivo de demonstrar que um método é adequado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

No Brasil e em diversos países, a validação documentada da metodologia analítica é exigida pelos órgãos regulatórios às indústrias farmacêuticas nos processos de registro de medicamentos. Existem legislações e guias estabelecidos por estes órgãos regulatórios que servem como diretrizes a serem adotadas no processo de validação. De acordo com a RDC nº 37, de 06 de julho de 2009, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza a utilização das monografias descritas na Farmacopeia Brasileira, código oficial farmacêutico do país, como referência no controle de qualidade de insumos e produtos farmacêuticos e, na ausência de monografia oficial inscrita neste compêndio, admite a adoção de farmacopeias estrangeiras, últimas edições (BRASIL, 2009).

Conforme a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, as metodologias analíticas compendiais são consideradas validadas, no entanto, é necessária a aplicabilidade

do método à formulação de cada empresa e a demonstração de que não há nada no produto que interfira no desempenho do método. Sendo assim, deve-se realizar uma adequação farmacopeica, verificando-se a adequabilidade nas condições operacionais do laboratório, realizando testes como especificidade, linearidade, intervalo, precisão e exatidão, não sendo necessário testar todos os parâmetros normalmente usados numa validação analítica (BRASIL, 2003; BRASIL, 2013).

2.3.1 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO

2.3.1.1 *Especificidade*

É a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz, tais como impurezas e produtos de degradação. O método é considerado específico quando o resultado do teste não é afetado por outros componentes (BRASIL, 2003)

2.3.1.2 *Linearidade*

É a capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico que não deve ser diferente de 1, observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 e coeficiente angular diferente de zero. É recomendado que a linearidade seja demonstrada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes, de acordo com o intervalo de 80% a 120% da concentração teórica do teste de doseamento (BRASIL, 2003).

2.3.1.3 *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 conforme mostra a Tabela 01 (BRASIL, 2003).

Tabela 01. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos (BRASIL, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir $- 20\%$ sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

2.3.1.4 Precisão

É a capacidade do método em obter resultados próximos entre várias medidas avaliadas na mesma amostra. A repetibilidade (precisão intracorridas) avalia a proximidade entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, enquanto que a precisão intermediária (precisão intercorridas) avalia a proximidade entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em diferentes dias, com analista e / ou equipamentos diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV) de uma série de medidas, não se admitindo valores superiores a 5% para o DPR (BRASIL, 2003). A fórmula é representada por:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

2.3.1.5 *Limite de Detecção*

É a menor concentração em que o analito presente em uma amostra pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. Existem diferentes critérios para a definição do Limite de Detecção (LD). Nos métodos analíticos utiliza-se a relação sinal/ruído de 3:1 (BRASIL, 2003).

2.3.1.6 *Limite de Quantificação*

É a menor concentração em que o analito presente em uma amostra pode ser quantificada com precisão e exatidão. É calculado utilizando a relação sinal/ruído de 10:1 (BRASIL, 2003).

2.3.1.7 *Exatidão*

A exatidão de um método analítico é a concordância entre o valor real do analito na amostra e dos resultados obtidos pelo método em estudo (BRASIL, 2003).

2.3.1.8 *Robustez*

É a medida da capacidade do método de resistir a pequenas e determinadas variações, indicando sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

Para o registro de um novo produto a ser lançado por uma indústria farmacêutica localizada no Brasil, é necessário apresentar a validação da metodologia analítica para doseamento do ativo. No presente estudo serão avaliados comprimidos revestidos de bisoprolol de 10 mg, no qual há monografia oficial para o doseamento descrita na Farmacopeia Americana 38ª Edição - *United States Pharmacopeia* (USP 38). Sendo assim, será necessário realizar a verificação farmacopeica para demonstrar o desempenho do método ao novo produto, avaliando a especificidade, linearidade, intervalo, exatidão e precisão.

4 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo demonstrar que a metodologia analítica de doseamento descrita na USP 38, é específica, linear, precisa e exata para o produto Bisoprolol Comprimidos 10 mg, que será lançado por indústria farmacêutica no Brasil, garantindo a adequabilidade do método ao produto.

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Todos os materiais e reagentes foram utilizados dentro do prazo de validade e os equipamentos com as calibrações e manutenções em dia de acordo com as Tabelas 02 a 07.

Tabela 02. Reagentes

Nome do reagente	Data de validade	Lote	Fabricante
Acetonitrila	27/05/2016	B050284	Tedia
Ácido Heptafluorobutírico	02/2016	BCBK7808V	Sigma Aldrich
Ácido Fórmico	31/01/2018	K44186564	Merck
Dietilamina	10/2016	12999101	Scharlau

Tabela 03. Materiais e Equipamentos

Descrição	Fabricante
Balança Analítica Adventurer Ohaus	Ohaus Corp. USA
Ultrassom	Unique
Balão volumétrico de 20 mL	Classe A
Balão volumétrico de 25 mL	Classe A
Pipeta volumétrica automática 1-10 mL	Eppendorf
CLAE	Agilent

Tabela 04. Matéria-Prima ativa

Descrição	Procedência	Lote	Validade
Fumarato de Bisoprolol	Moehs	88866	01/11/2017

Tabela 05. Coluna Cromatográfica

Descrição	Fabricante	Lote
Partisphere C8 125 x 4,6 mm 5 µm	Hichrom	11SB04

Tabela 06. Padrão de Referência

Descrição	Procedência	Lote	Validade
Fumarato de Bisoprolol	USP	H0J057	30/09/2016

Tabela 07. Componentes do placebo

Matéria-prima	Quantidade	Unidade
Amido pregelatinado	19,02	G
Crospovidona	8,59	G
Dióxido de sílico coloidal	1,07	G
Celulosa microcristalina	161,66	G
Estearato de magnésio	1,07	G
Opadry y-1-18128 a white	8,59	G

5.2 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE BISOPROLOL NO PRODUTO

Diluyente:

Acetonitrila e água (7:13)

Fase Móvel:

Em 1 L de diluyente, adicionar 5 mL de ácido heptafluorobutírico, 5 mL de dietilamina e 2,5 mL de ácido fórmico. Filtrar à vácuo e degaseificar em ultrassom por 10 minutos.

Solução de Adequação do Sistema:

0,5 mg/mL de cloridrato de propranolol e 1 mg/mL de fumarato de bisoprolol em diluyente.

Solução Padrão:

1 mg/mL do padrão de referência USP fumarato de bisoprolol em diluyente.

Solução Amostra:

Pulverizar não menos que 20 comprimidos e transferir o equivalente a 25 mg de fumarato de bisoprolol para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionar 10 mL de diluente e sonicar por 10 minutos. Resfriar, diluir com o diluente até o volume e homogeneizar. Centrifugar por 20 minutos e usar o sobrenadante.

Condições Cromatográficas:

Detector: UV 273 nm

Coluna: 4,6 mm x 12,5 cm 5 µm C8

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume de Injeção: 10 µL

Adequação do Sistema:

Amostras: Solução de adequação do sistema e solução padrão.

Requerimentos de Adequação:

Resolução: Não menos que 7,0 entre bisoprolol e propranolol na solução de adequação do sistema.

Assimetria: Não mais que 2,0 na solução padrão.

Desvio Padrão Relativo: Não mais que 2,0% na solução padrão.

Análises:

Amostras: Solução padrão e solução amostra

Calcular o teor de fumarato de bisoprolol na amostra utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Fumarato de bisoprolol} = (A_{am}/A_{pd}) \times (C_{pd}/C_{am}) \times 100$$

Onde:

A_{am}: Área do pico de fumarato de bisoprolol na solução amostra.

A_{pd}: Área do pico de fumarato de bisoprolol na solução padrão

C_{pd}: Concentração de fumarato de bisoprolol na solução padrão (mg/mL)

C_{am}: Concentração nominal de fumarato de bisoprolol na solução amostra (mg/mL)

Critérios de Aceitação: 90 – 105%

10,0 mg: 9,00 – 10,50 mg Fumarato de Bisoprolol/ comprimido

5.3 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO E PREPARO DAS AMOSTRAS

5.3.1 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO

5.3.1.1 Especificidade

Preparo das soluções

Para a análise da especificidade do método de teor de bisoprolol no produto Bisoprolol 10,0 mg Comprimidos Revestidos, preparar: solução branco, solução padrão, solução placebo, solução matéria prima do ativo, solução placebo contaminado e solução do produto acabado.

Solução Branco: Diluente

Solução Padrão (1 mg/mL): Proceder conforme o preparo da solução padrão descrito no método, pesando-se 20,0 mg do padrão de fumarato de bisoprolol para um balão volumétrico de 20 mL.

Solução Placebo: Proceder conforme o preparo da solução amostra descrito no método, pesando-se 412,5 mg do placebo de Bisoprolol 10,0 mg Comprimidos Revestidos para um balão volumétrico de 25 mL.

Solução Matéria-Prima do Ativo: Proceder conforme o preparo da solução amostra descrito no método, pesando-se 25,0 mg da matéria prima do ativo para um balão volumétrico de 25 mL.

Solução Placebo Contaminado: Proceder conforme o preparo da solução amostra descrito no método, pesando-se 412,5 mg do placebo de Bisoprolol 10,0 mg Comprimidos Revestidos e 25,0 mg do ativo para um balão volumétrico de 25 mL.

Solução Amostra do Produto Acabado: Proceder conforme o preparo da solução amostra descrito no método, pesando-se 437,5 mg do produto Bisoprolol 10,0 mg Comprimidos Revestidos para um balão volumétrico de 25 mL.

Realizar uma injeção de cada amostra.

Critério de Aceitação:

A RE nº 899 não estabelece valor de referência para este parâmetro. O critério de aceitação foi determinado a partir do conceito de especificidade, que é a capacidade do método de distinguir um composto em presença de possíveis interferentes. Sendo assim, o método será específico se não houver picos interferentes das soluções branco e placebo sob o mesmo tempo de retenção do bisoprolol. O pico do bisoprolol deverá ter pureza de pico $>0,99$.

5.3.1.2 *Linearidade*

Preparo das amostras:

Preparar 3 soluções mãe e a partir delas 15 amostras, três de cada concentração de 80%, 90%, 100%, 110% e 120%, obtendo-se três curvas de calibração.

Solução padrão (1 mg/mL): Proceder conforme o preparo da solução padrão descrito no método, pesando-se 20,00 mg do padrão de fumarato de bisoprolol para um balão volumétrico de 20 mL.

Soluções Mãe: Para 3 balões volumétricos de 20 mL, pesar 200,0 mg de fumarato de bisoprolol. Em seguida adicionar em cada balão 10 mL de diluente e levar ao ultrassom por 10 minutos. Resfriar, avolumar com o diluente e homogeneizar. Em seguida, pipetar para balões volumétricos de 20 mL, de cada Solução Mãe, os volumes descritos na Tabela 08, de acordo com a concentração das faixas de linearidade. Avolumar com o diluente e homogeneizar.

Tabela 08. Volume de cada Solução Mãe para o preparo das soluções do teste de linearidade

Concentração teórica (%)	Concentração teórica (mg/mL)	Solução mãe (mL)	Volume final (mL)
80	0,8	1,6	20
90	0,9	1,8	20
100	1,0	2,0	20
110	1,1	2,2	20
120	1,2	2,4	20

Realizar uma injeção de cada amostra e calcular o coeficiente de correlação linear.

Critério de Aceitação:

De acordo com a RE nº 899, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deverá ser 0,99. A análise dos resíduos não deverá apresentar tendências.

5.3.1.3 *Exatidão*

Preparo das soluções

A exatidão do método foi verificada a partir de 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. Para a determinação da exatidão do bisoprolol no produto, preparar as amostras adicionando-se quantidades conhecidas do ativo ao placebo (placebo contaminado).

Solução padrão (1 mg/mL): Proceder conforme o preparo da solução padrão descrito no método, pesando-se 20,00 mg do padrão de fumarato de bisoprolol para um balão volumétrico de 20 mL.

Solução Amostra: Em 9 balões volumétricos de 25 mL, pesar a quantidade de 412,5 mg do placebo. Adicionar em cada balão a quantidade de ativo descrita na Tabela 09. Proceder o preparo das amostras conforme descrito no método.

Tabela 09. Quantidade em miligramas utilizada do ativo para o preparo das amostras do teste de exatidão

Concentração	Balão 1	Balão 2	Balão 3
80%	20 mg	20 mg	20 mg
100%	25 mg	25 mg	25 mg
120%	30 mg	30 mg	30 mg

Realizar uma injeção de cada amostra.

Critério de Aceitação:

A RE nº 899 não determina uma faixa para o critério de aceitação, portanto definiu-se que o método será exato se os resultados cumprirem a faixa de aceitação de 95% a 105%.

5.3.1.4 *Precisão*

Preparo das soluções

O teste de precisão será avaliado para garantir a repetibilidade, a partir do produto acabado. A precisão intermediária deverá ser avaliada preparando-se da mesma forma que a repetibilidade, porém por analistas e dias diferentes.

Preparar 6 soluções amostra, conforme o modo de preparo descrito no método.

Solução Padrão (1 mg/mL): Proceder conforme o preparo da solução padrão descrito no método, pesando-se 20,0 mg do padrão de fumarato de bisoprolol para um balão volumétrico de 20 mL.

Solução Amostra do Produto Acabado: Proceder conforme o preparo da solução amostra descrito no método, pesando-se 437,5 mg do produto para balões de 25 mL.

Realizar uma injeção de cada amostra.

Critério de Aceitação:

De acordo com a RE nº 899, o valor máximo aceitável do DPR deverá ser definido de acordo com a metodologia analítica, a concentração do analito, a finalidade do método e o tipo de matriz, não se admitindo valores superiores a 5%. Portanto, o método será preciso se apresentar DPR menor que 5% para precisão intra-corrída e inter-corrídas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESPECIFICIDADE

Os cromatogramas das amostras utilizadas para a especificidade estão representados pelas Figuras 2 a 7 e os resultados expressos na Tabela 10.

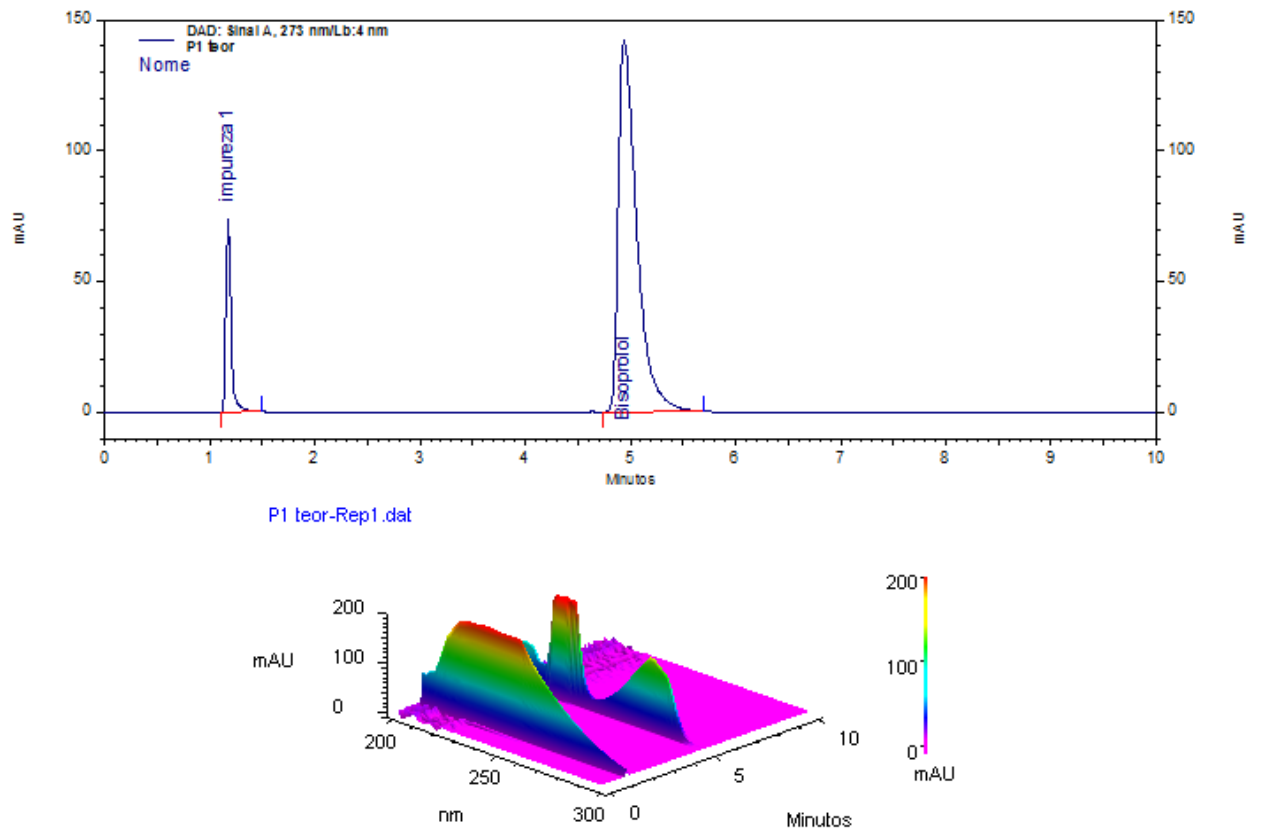


Figura 2 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução padrão

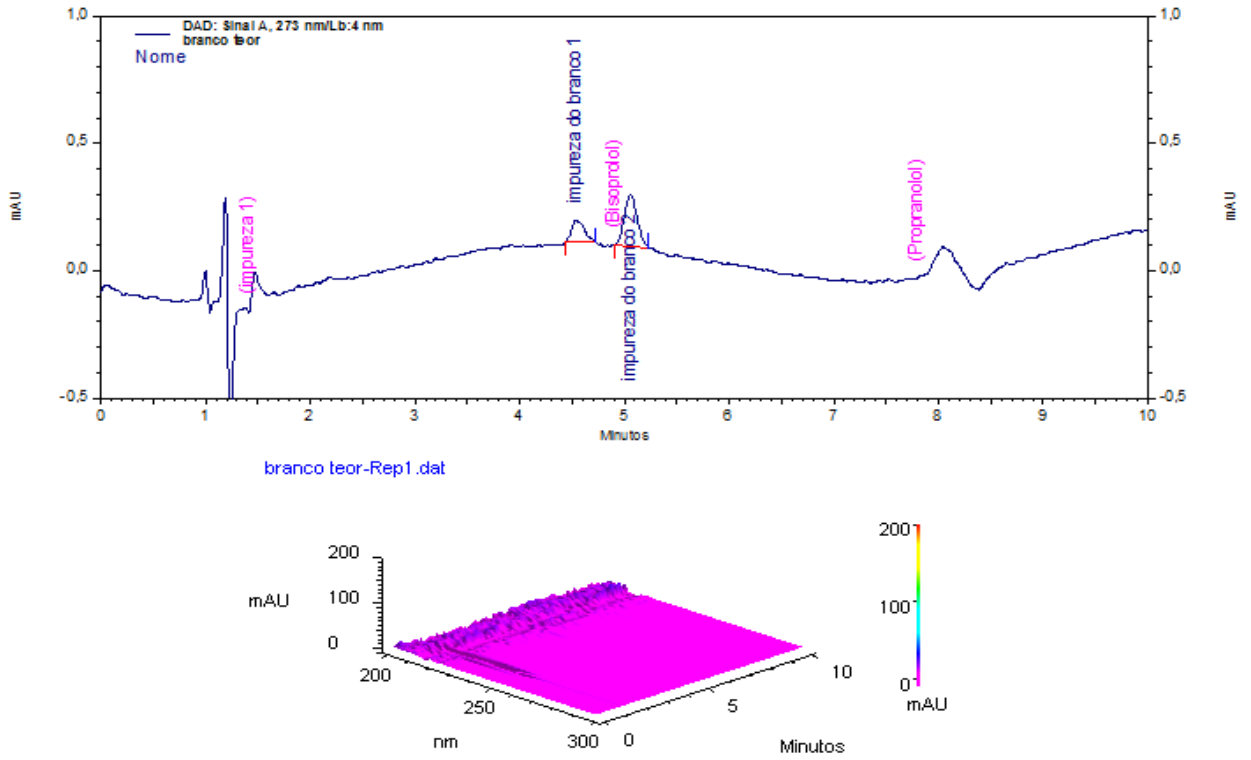


Figura 3 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução branco

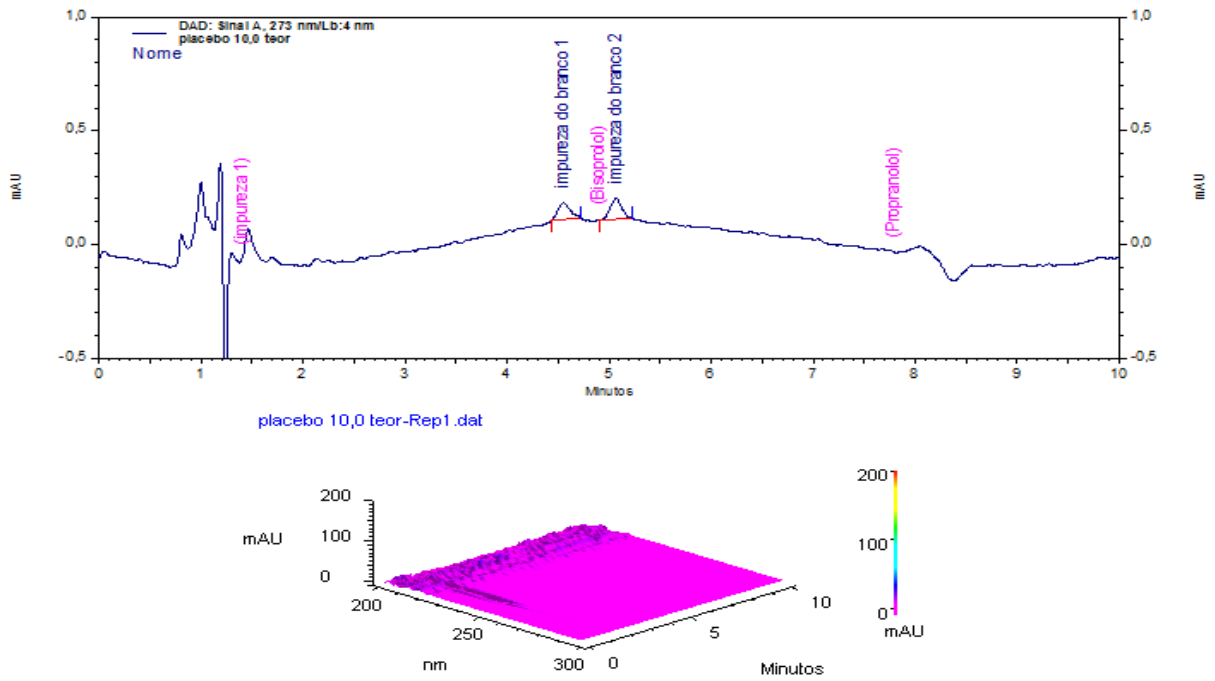


Figura 4 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução placebo

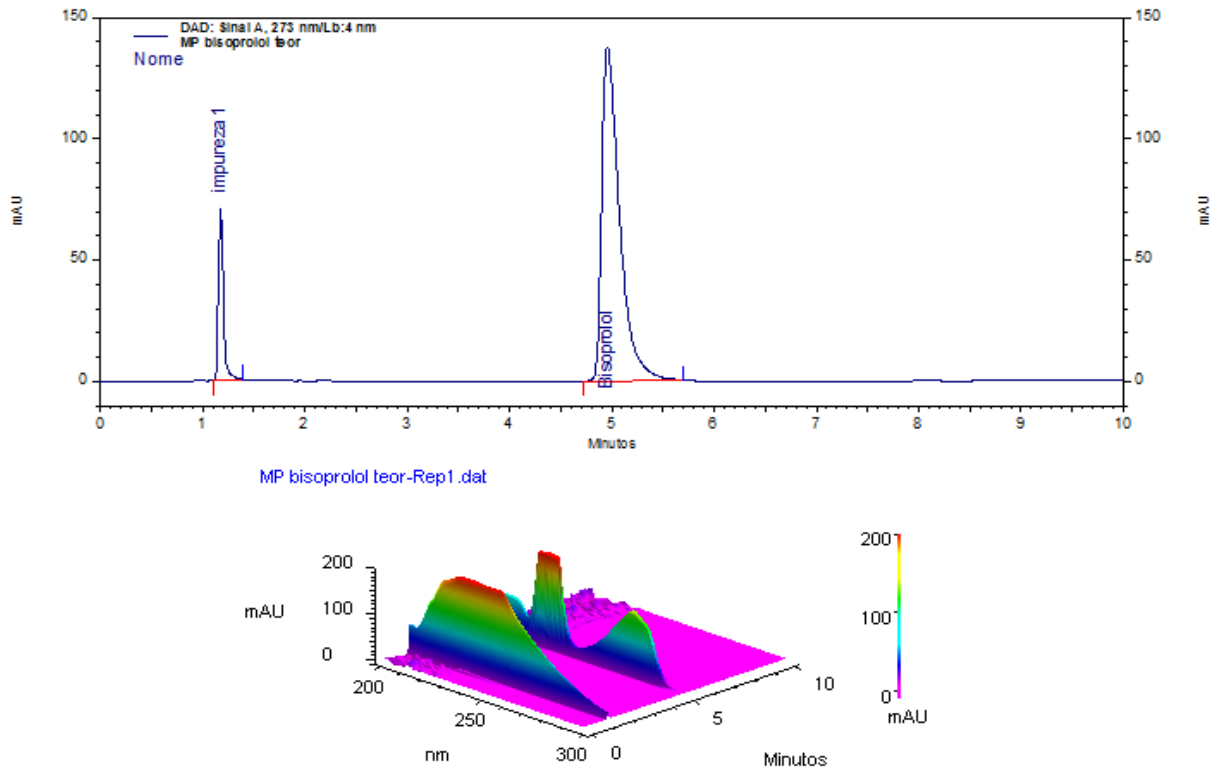


Figura 5 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução matéria-prima do ativo

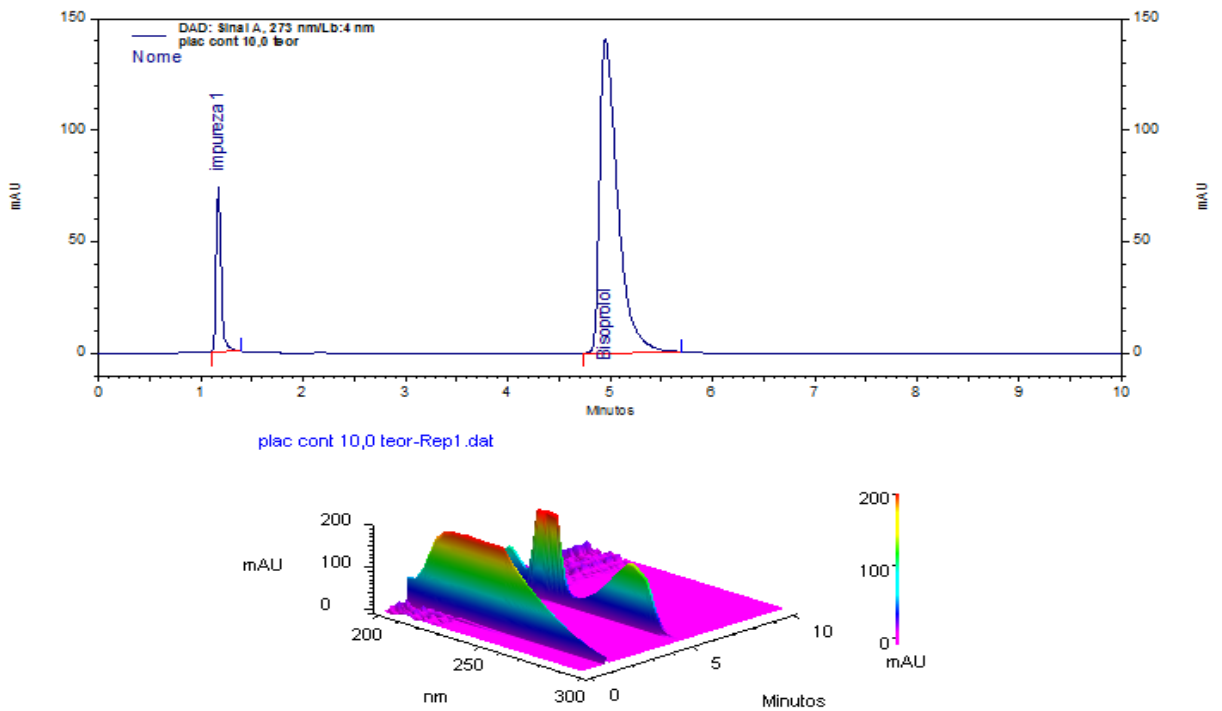


Figura 6 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução placebo contaminado

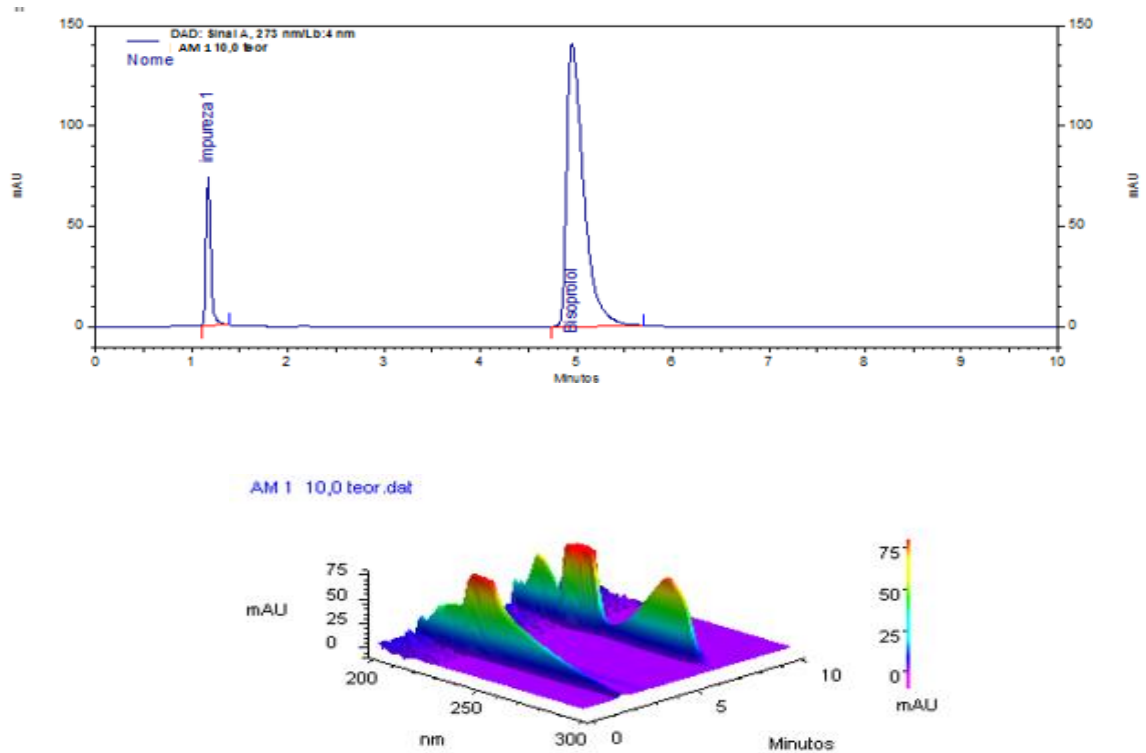


Figura 7 - Cromatograma e espectro de varredura obtidos da solução produto

Tabela 10. Resultados obtidos das amostras no teste de especificidade

Amostra	Pico	Tempo de Retenção	Tempo de Retenção Relativo	Área	Pureza de Pico	Recuperado (%)
Padrão	Impureza 1	1,3	0,26	-	-	-
	Bisoprolol	4,9	1,00	3625302	0,99	100,00
Branco	Impureza Branco 1	4,5	0,91	1762	-	0,05
	Impureza Branco 2	5,1	1,04	3977	-	0,11
Placebo	Impureza Branco 1	4,5	0,91	1240	-	0,03
	Impureza Branco 2	5,1	1,04	1471	-	0,04
Matéria-Prima do ativo	Impureza 1	1,3	0,26	-	-	-
	Bisoprolol	4,9	1,00	3542876	0,98	96,80
Placebo Contaminado	Impureza 1	1,3	0,26	-	-	-
	Bisoprolol	4,9	1,00	3639029	0,98	99,43
Produto	Impureza 1	1,8	0,26	-	-	-
	Bisoprolol	6,6	1,00	3454439	0,98	96,35

Conforme os resultados demonstrados, as amostras da matéria prima do ativo, do placebo contaminado e do produto obtiveram perfis cromatográficos e espectrais semelhantes aos da amostra padrão. Verificou-se que os cromatogramas da solução branco e solução placebo apresentaram 2 picos interferentes, denominados *Impureza Branco 1* e *Impureza Branco 2*, com os tempos de retenção 4,5 e 5,1, respectivamente, próximos ao tempo de retenção do pico principal, como pode ser visto na Figura 3 e Tabela 10. As áreas destes picos representaram menos de 0,5%, não interferindo na quantificação do ativo. Nos cromatogramas obtidos das amostras da solução padrão, da matéria prima, do placebo contaminado e do produto, verificou-se a presença de um pico desconhecido, nomeado como *Impureza 1*, conforme Figura 7 e Tabela 10, que não interfere na quantificação do pico do bisoprolol. O método demonstrou especificidade para o ativo e para a impureza diante dos outros componentes da matriz.

6.2 LINEARIDADE

As Figuras 8 a 10 representam as 3 curvas de linearidade obtidas e a Figura 11 o gráfico de resíduos. A Tabela 11 apresenta os coeficientes angulares (a), os coeficientes lineares (b) e os coeficientes de correlação (r). A Tabela 12 demonstra as quantidades recuperadas em cada nível de concentração.

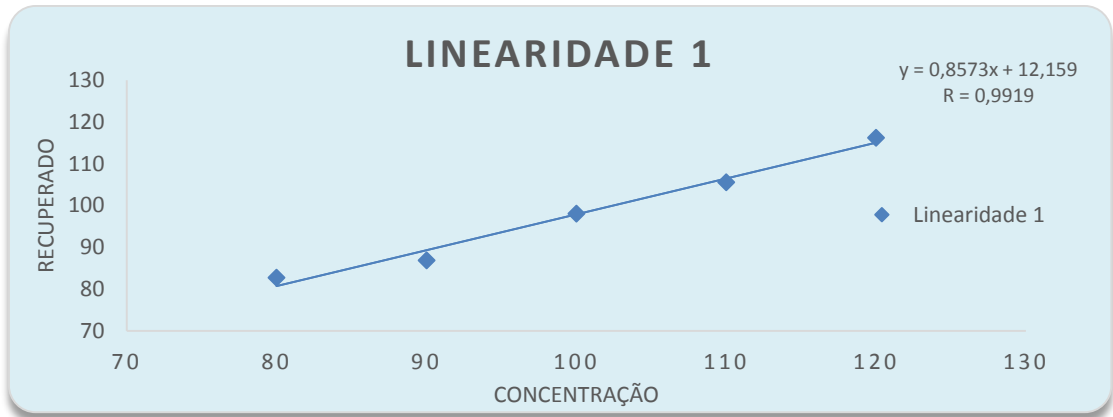


Figura 8 – Linearidade 1

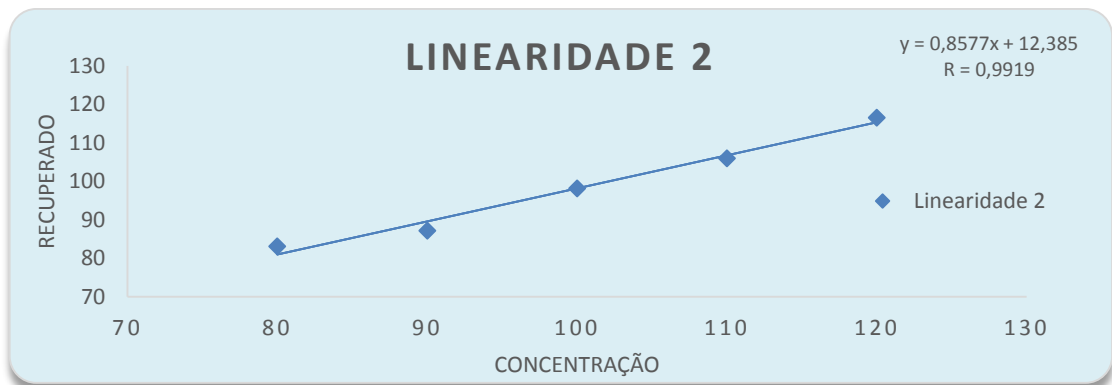


Figura 9 – Linearidade 2

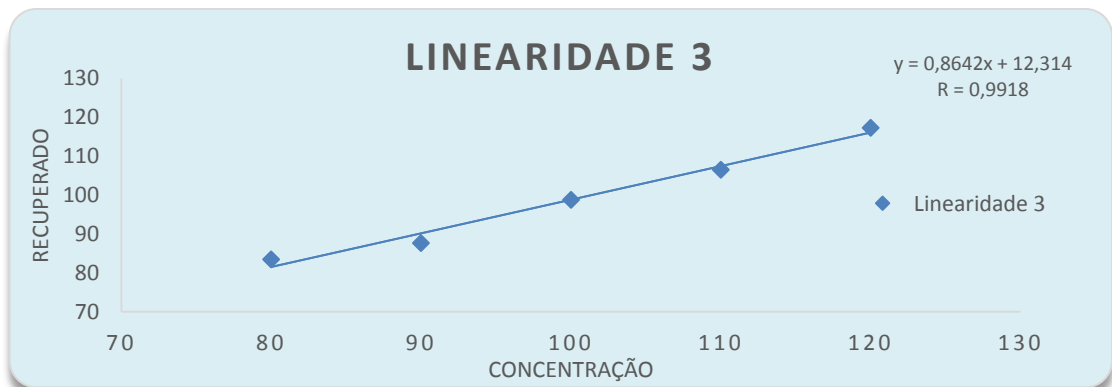


Figura 10 – Linearidade 3

Tabela 11. Resultados obtidos das amostras no teste de linearidade

Linearidade	a	b	R
1	0,8573	12,159	0,9919
2	0,8577	12,385	0,9919
3	0,8642	12,314	0,9918

Tabela 12. Resultados obtidos das amostras no teste de linearidade

Linearidade	Concentração nominal	Concentração obtida	Exatidão
1	80%	82,70	103,38
	90%	86,87	96,53
	100%	98,05	98,05
	110%	105,58	95,98
	120%	116,21	96,84
2	80%	83,03	103,78
	90%	87,14	96,83
	100%	98,14	98,14
	110%	105,96	96,33
	120%	116,50	97,09
3	80%	83,48	104,35
	90%	87,64	97,38
	100%	98,80	98,80
	110%	106,49	96,81
	120%	117,26	97,72

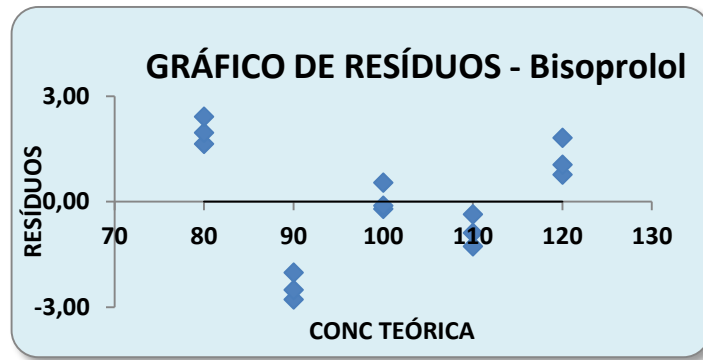


Figura 11 – Gráfico de Resíduos

O método apresentou linearidade para o ativo na faixa de concentração proposta. Os coeficientes de correlação linear nas 3 curvas apresentaram valores maiores que 0,99. Na comparação de variâncias, obteve-se o gráfico de resíduos, que se apresentou aleatório, livre de tendências.

6.3 EXATIDÃO

Os resultados encontrados para a exatidão do método de doseamento encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados obtidos das amostras no teste de exatidão

Concentração	1	2	3
80%	99,85	100,05	99,46
100%	98,54	99,68	97,87
120%	100,64	100,11	98,65

O método mostrou-se exato, uma vez que apresentou resultados dentro da especificação de 95% a 105%, indicando proximidade entre o valor verdadeiro e os resultados obtidos.

6.4 PRECISÃO

Os resultados obtidos no teste de precisão do método encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados obtidos das amostras no teste de precisão

Amostras	Concentração Obtida (%)	
	1º dia	2º dia
1	97,00	98,66
2	95,67	99,54
3	100,98	100,18
4	100,20	98,12
5	100,40	100,36
6	100,77	97,95
DPR(%) Intra-corridas:	2,2699	1,0499
DPR(%) Inter-corridas:	1,6873	

De acordo com os resultados da Tabela 14, os resultados encontrados para o grau de recuperação estão de acordo com as especificações do método, e os DPR apresentaram valores menores que 5%, sendo a repetibilidade aprovada em todas as verificações. A precisão intermediária foi determinada com valores inferiores a 5,0%.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a metodologia analítica para doseamento de bisoprolol em comprimidos, descrita na USP 38 poderá ser utilizada no controle de qualidade do produto desenvolvido, uma vez que foram apresentados resultados satisfatórios para a especificidade, linearidade, exatidão e precisão, de acordo com a Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

REFERÊNCIAS

- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Workshop Validação de Metodologia Analítica – GGMed/ANVISA**. Brasília, DF, 3 dez. 2013. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/26d9cd004253d4d4a528ad6d490f120b/Questionamento+do+Worshop+GGMED+-+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+Metodologia+Anal%C3%ADtica.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 out. 2015
- BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. p. 56
- BRASIL. Resolução nº 37, de 06 de julho de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 jul. 2009. p. 40
- DEGANI, Ana. L.; CASE, Queila. L.; VIEIRA, Paulo. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova**, São Paulo, v. 14, n. 7, p. 21-25, 1998.
- MARTINDALE. **The Complete Drug Reference**. 35th Edition. London; Chicago: Pharmaceutical Press, 2007. v.1. 1107 p.
- MOFFAT, A. C. (Ed.). *et al.* **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 4th Edition. London; Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. v. 2. 983-984 p.
- RIBANI, Marcelo. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SANTOS, Juliana. **Desenvolvimento de métodos espectroscópicos multivariados para quantificação de captopril e hidroclorotiazida em associação**. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em:
<<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/21474/Dissertacao%20de%20Mestrado%20-%20Juliana%20dos%20Santos.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 out. 2015