



Validação de método de doseamento e aplicação em estudo de equivalência farmacêutica de solução injetável de metronidazol

Lourenço, F.R.¹, Silva, A.C.D.¹, Yamamoto, R.N.¹, Pinto, T.J.A.^{1*}

¹Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP

Recebido 07/07/2009 / Aceito 12/04/2010

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivos validar métodos por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência para o doseamento de metronidazol em solução injetável e aplicá-los em estudo de equivalência farmacêutica entre medicamento de referência, genérico e similar. Os métodos propostos para doseamento de metronidazol em solução injetável por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência foram validados, mostrando especificidade / seletividade, linearidade e faixa linear, limite de detecção / quantificação, exatidão e precisão adequados para o uso pretendido. Os medicamentos foram avaliados quanto aos testes de determinação de pH, volume médio, identificação por espectrofotometria de absorção no infravermelho, identificação por cromatografia líquida de alta eficiência, esterilidade, endotoxinas bacterianas e doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência. Os três medicamentos atenderam as especificações para os testes avaliados e, portanto, podem ser considerados apresentando equivalência farmacêutica.

Palavras-chave: Metronidazol. Equivalência farmacêutica. Validação. Flagyl.

INTRODUÇÃO

O metronidazol (Figura 1), quimicamente denominado 1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, é um antiparasitário e antimicrobiano clinicamente eficaz na tricomoníase, na amebíase e na giardíase, e também em uma variedade de infecções causadas por bactérias obrigatoriamente anaeróbias (Brunton et al., 2006). É um fármaco relativamente barato e altamente versátil, sendo

também empregado em combinação com outros agentes antimicrobianos para tratar infecções polimicrobianas com bactérias aeróbias e anaeróbias (Brunton et al., 2006).

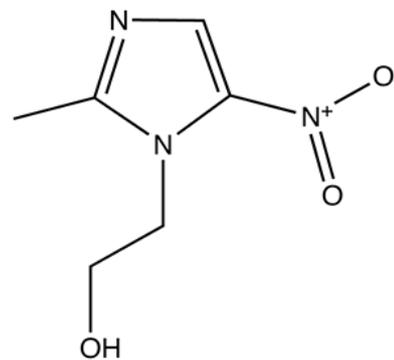


Figura 1: Estrutura química do metronidazol.

Dentro da política nacional de saúde está o programa de medicamentos genéricos, garantido pelas resoluções aprovadas, sendo a mais recente em 16 de março de 2007 – RDC nº 16 (Brasil, 2007). A intercambialidade do medicamento é aceita após estudos de equivalência farmacêutica (Brasil 2004).

A farmacopéia americana (USP, 2009) apresenta método para análise de metronidazol em solução injetável por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. Na monografia da farmacopéia britânica (British Pharmacopeia, 2008), o método descrito é por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Embora exista monografia para o produto em compêndios internacionais (USP, 2009; British Pharmacopeia, 2008), o presente trabalho tem por objetivo estabelecer métodos para o doseamento de metronidazol em solução injetável por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência, com a finalidade de contribuir na elaboração de monografia para metronidazol solução injetável a ser adotada em futuras edições da Farmacopéia Brasileira. Também é objetivo deste trabalho aplicar o método validado em estudo de equivalência farmacêutica entre medicamento de referência, genérico e similar.

Autor correspondente: Terezinha de Jesus Andreoli Pinto - Departamento de Farmácia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo (USP) - Av. Prof. Lineu Prestes, 580- Bloco 13 - CEP. 05508-900 - Butantã - São Paulo - SP - Brasil - fone: (11) 3091-3667 - e-mail: tjapinto@usp.br

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e Substância Química de Referência

Foram avaliados três medicamentos de diferentes laboratórios, sendo um o medicamento de referência (Lote: 800019), um genérico (Lote: 74BG4553) e um similar (Lote: IB073001), todos contendo 5 mg/ml. Os medicamentos foram adquiridos no mercado. Foi utilizada substância química de referência de metronidazol (Lote: 1004) fornecida pela Farmacopéia Brasileira.

Validação do método de doseamento de metronidazol por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Foram avaliadas amostras preparadas em condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação e aquecimento) para avaliação da especificidade / seletividade (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A linearidade e a faixa linear de trabalho foram determinadas a partir da avaliação de três curvas analíticas (preparadas em 3 dias consecutivos) obtidas com cinco concentrações cada (8, 16, 21, 26 e 31 µg/ml). Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do estudo de linearidade do método. Considerou-se como limite mínimo de detecção a concentração capaz de produzir resposta maior que três vezes o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas. Para o limite de quantificação considerou-se a concentração capaz de produzir resposta maior que dez vezes o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, no qual adicionou-se ao medicamento quantidades conhecidas (aproximadamente 10% da quantidade declarada) de padrão de referência de metronidazol. A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e de reprodutibilidade e expressa como o desvio padrão relativo (Brasil, 2003; ICH, 1996).

Validação do método de doseamento de metronidazol por cromatografia líquida de alta eficiência

Foram avaliadas amostras preparadas em condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação e aquecimento) para avaliação da especificidade / seletividade (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A linearidade e a faixa linear de trabalho foram determinadas a partir da avaliação de três curvas analíticas (preparadas em 3 dias consecutivos) obtidas com cinco concentrações cada (100, 150, 210, 260 e 310 µg/ml). Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do estudo de linearidade do método. Considerou-se como limite mínimo de detecção a concentração capaz de produzir resposta maior que três vezes o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas. Para o limite de quantificação considerou-se a concentração capaz de produzir resposta maior que dez vezes o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, no qual adicionou-se ao medicamento quantidades conhecidas (aproximadamente 10% da quantidade declarada) de padrão de referência de metronidazol. A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e de reprodutibilidade e expressa como o desvio padrão relativo (Brasil, 2003; ICH, 1996).

Determinação do pH

O pH das soluções injetáveis de metronidazol foi determinado potenciométricamente (pHmetro Micronal B474), segundo metodologia descrita na farmacopéia americana (USP, 2009). A especificação do pH para solução injetável de metronidazol é de 4,5 a 7,0.

Volume Médio

Foram medidos, individualmente, os volumes de 10 frascos de solução injetável de metronidazol e calculou-se o volume médio. O volume médio deve ser maior que 100% do volume declarado e nenhuma unidade apresenta volume menor a 95% do volume declarado, segundo metodologia descrita na farmacopéia americana (USP, 2009).

Identificação

A identificação do metronidazol presente nos medicamentos foi realizada por espectrofotometria de absorção no infravermelho (Mattson Genesis Series FTIR) e por cromatografia líquida de alta eficiência (Thermo Separation Products). O espectro de absorção no infravermelho da amostra dispersa em brometo de potássio apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de metronidazol padrão, preparado de maneira idêntica. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da solução amostra corresponde àquele do pico principal da solução padrão (Gil, 2007).

Teste de Esterilidade

Foram avaliados 20 frascos de solução injetável de metronidazol quanto à esterilidade, empregando método por filtração em membrana (indireto), segundo metodologia descrita na farmacopéia americana (USP, 2009; Pinto et al., 2003).

Endotoxinas Bacterianas

O limite de endotoxinas bacterianas presente nas soluções injetáveis de metronidazol foi avaliado pelo método *in vitro* Limulus Amebocyte Lysate (LAL Endosafe), segundo metodologia descrita na farmacopéia americana (USP, 2009). A especificação para solução injetável de metronidazol é de, no máximo, 0,35 Unidades Endotóxicas por miligrama (UE/mg) de metronidazol (USP, 2009; Pinto et al., 2003).

Doseamento de metronidazol por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Transferiu-se volume da solução injetável equivalente a 50 mg de metronidazol para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M. Dilui-se, sucessivamente, com ácido clorídrico 0,1 M até concentração de 0,002% (p/V). A solução padrão foi preparada na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Mediu-se as absorbâncias das soluções padrão e amostra em 277 nm (Espectrofotômetro Thermo Evolution 100), utilizando ácido clorídrico 0,1 M para ajuste do zero. Calculou-se a quantidade de metronidazol na solução injetável a partir das leituras obtidas.

Doseamento de metronidazol por cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizou-se cromatógrafo (Thermo Separation Products) provido de detector ultravioleta a 320 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (3 µm a 10 µm); fase móvel constituída por mistura fosfato de potássio monobásico a 0,073% (p/V) e metanol (93:7). Ajustou-se o pH em $4,0 \pm 0,5$ com ácido fosfórico 0,1 M e fluxo da fase móvel de 2 ml/minuto.

Foi preparada solução padrão estoque na concentração de 1 mg/mL em metanol. Transferiu-se 2 mL da solução padrão estoque para balão volumétrico de 10 mL contendo 2 mL de água e completar o volume com fase móvel.

Transferiu-se volume de solução injetável equivalente a 25 mg de metronidazol para balão volumétrico de 25 mL, e completou-se o volume com água. Transferiu-se 2 mL da solução obtida para balão volumétrico de 10 mL contendo 2 mL de metanol e completou-se o volume com fase móvel.

Foram injetados, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra, registrados os cromatogramas e medidas as áreas dos picos. Calculou-se a quantidade de metronidazol na solução injetável a partir das respostas obtidas. O fator de cauda não é maior que 2,0. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não é maior que 2,0%.

RESULTADOS

O método de doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta demonstrou-se específico / seletivo para a quantificação do metronidazol em solução injetável. Apresentou linearidade adequada na faixa de concentração entre 8 e 31 µg/ml, com equação da reta $Y = 0,0039 + 39,7505X$ e $r^2 = 0,9888$ (Figura 2). Os valores de limite de detecção e limite de quantificação obtidos foram de 0,4 µg/ml e 1 µg/ml, respectivamente. A recuperação obtida foi de 98,6% em relação à quantidade adicionada. A precisão em condições de repetibilidade foi de 0,5% e de reprodutibilidade foi de 1,0%.

O método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou-se específico / seletivo para a quantificação do metronidazol em solução injetável. Apresentou linearidade adequada na faixa de concentração

entre 100 e 310 µg/ml, com equação da reta $Y = 34755,84 + 30928388,41X$ e $r^2 = 1,0000$ (Figura 3). Os valores de limite de detecção e limite de quantificação obtidos foram de 3,2 µg/ml e 7,0 µg/ml, respectivamente. A recuperação obtida foi de 95,6% em relação à quantidade adicionada. A precisão em condições de repetibilidade foi de 0,4% e de reprodutibilidade foi de 0,8%.

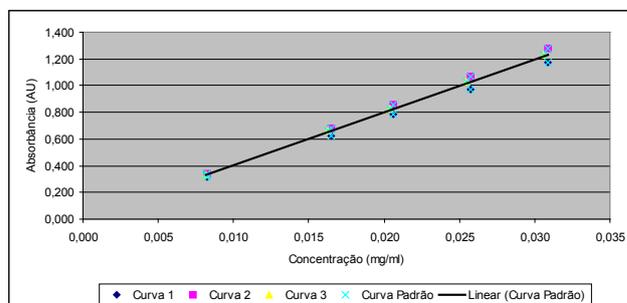


Figura 2: Representação gráfica da curva padrão de metronidazol obtida pelo método de espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

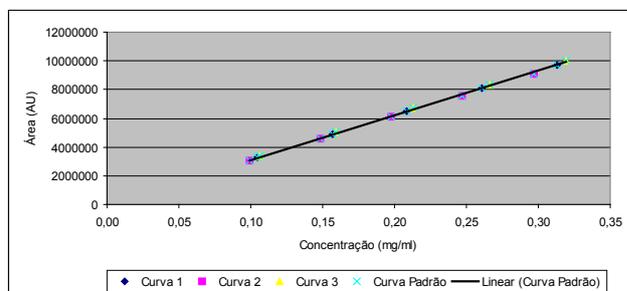


Figura 3: Representação gráfica da curva padrão de metronidazol obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados encontrados para os testes de pH, volume médio, identificação por espectrofotometria de absorção no infravermelho, identificação por cromatografia líquida de alta eficiência, esterilidade, endotoxinas bacterianas e doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência estão apresentados na Tabela 1. Todos os medicamentos avaliados (de referência, genérico e similar) atenderam as especificações para os testes avaliados.

Tabela 1: Resultados das soluções injetáveis de metronidazol avaliadas (medicamento de referência, genérico e similar).

Teste	Especificação	Medicamento de Referência	Medicamento Genérico	Medicamento Similar
Determinação de pH	4,5 a 7,0	4,8	4,8	5,5
Volume médio	Média ≥ 100 ml	110,4 ml	102,4 ml	102,4 ml
Identificação por espectrofotometria de absorção no infravermelho	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Identificação por cromatografia líquida de alta eficiência	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Teste de esterilidade	Estéril	Estéril	Estéril	Estéril
Endotoxinas bacterianas	$\leq 0,35$ EU/mg metronidazol	$\leq 0,35$ EU/mg metronidazol	$\leq 0,35$ EU/mg metronidazol	$\leq 0,35$ EU/mg metronidazol
Doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	90 a 110%VR	98,5% ^a (0,5%) ^b	90,6% ^a (0,6%) ^b	96,1% ^a (0,9%) ^b
Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência	90 a 110%VR	101,0% ^a (0,4%) ^b	101,3% ^a (0,3%) ^b	101,9% ^a (0,4%) ^b

VR: Valor rotulado; ^a: média de três resultados independentes; ^b: desvio padrão relativo

DISCUSSÃO

As especificidades / seletividades dos métodos de doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência foram avaliadas por meio da análise de amostras preparadas em condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação e aquecimento). Os resultados das amostras preparadas em condições de estresse demonstraram que os métodos avaliados são capazes de determinar a quantidade de metronidazol em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2003; ICH, 1996).

As absorbâncias determinadas no método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foram diretamente proporcionais às concentrações das soluções-padrão no intervalo correspondente a 40% e 150% da concentração teórica (20 µg/ml), apresentando ajuste ao modelo de regressão linear e coeficiente de regressão (r^2) superior a 0,98 (Brasil, 2003; ICH, 1996). Para o método por cromatografia líquida de alta eficiência, obteve-se resposta linear no intervalo correspondente a 50% e 150% da concentração teórica (200 µg/ml) e coeficiente de regressão (r^2) superior da 0,98.

Na literatura são descritos métodos para análise de metronidazol por polarografia (Abu Zuhri et al., 1986) e por análise por injeção em fluxo (Mohamed et al., 1996; Simões et al., 2006). O método para análise de metronidazol por espectrofotometria de absorção no ultravioleta proposto neste trabalho apresenta linearidade, faixa linear e limite de detecção semelhante ao método proposto por Simões e colaboradores.

Os resultados de exatidão (recuperação = 98,6% para o método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e recuperação = 95,6% para o método por cromatografia líquida de alta eficiência) e precisão (repetibilidade = 0,5% e reprodutibilidade = 1,0% para o método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e repetibilidade = 0,4% e reprodutibilidade = 0,8% para o método por cromatografia líquida de alta eficiência) estão de acordo com o preconizado em guias nacionais (Brasil, 2003) e internacionais (ICH, 1996).

A análise estatística (teste t pareado) permite concluir que não há diferença significativa entre os resultados obtidos por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência para um nível de confiança de 95%.

Os métodos propostos para doseamento de metronidazol em solução injetável por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência foram validados, mostrando especificidade / seletividade, linearidade e faixa linear, limite de detecção / quantificação, exatidão e precisão adequados para o uso pretendido.

Os medicamentos avaliados atendem as especificações para os testes de determinação de pH, volume médio, identificação por espectrofotometria de absorção no infravermelho, identificação por cromatografia líquida de alta eficiência, esterilidade, endotoxinas bacterianas e doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência. Portanto, os três medicamentos (de referência, genérico e

similar) podem ser considerados apresentando equivalência farmacêutica.

ABSTRACT

Validation of metronidazole assay methods and application to study of pharmaceutical equivalence of injectable solutions of this drug

The aim of this study was to validate analytical methods, based on UV absorption spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC), to assay metronidazole supplied in injectable solutions, and to employ these methods in a study of the pharmaceutical equivalence of the original brand name medicine ('reference'), generic and similar (brand) medicines. The methods proposed for the metronidazole assay were validated, showing adequate specificity/selectivity, linearity, linear range, detection and quantitation limits, accuracy and precision for the intended purpose. The injectable solutions were then tested to determine pH, volume and identity (by IR spectrophotometry), to verify sterility, detect bacterial endotoxins and assay the drug by the proposed UV spectrophotometric and HPLC methods. All three medicines met the requirements in all tests performed and, therefore, can be considered pharmaceutically equivalent.

Keywords: Metronidazole. Pharmaceutical equivalence. Validation. Flagyl.

REFERÊNCIAS

Abu Zuhri AZ, Al-khalil SI, Suleiman MS. Electrochemical reduction of metronidazole and its determination in pharmaceutical dosage forms by D.C. Polarography. *Anal Lett.* 1986; 19(3&4):453-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 16, de 02 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. [citado 07 jul. 2009]. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word=>>>

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE n. 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução". [citado 07 jul. 2009]. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15466&word=>>>

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [citado 07 jul. 2009]. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>>>

British Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationery Office; 2008. p. 2892.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p. 1821.

Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos, São Paulo: Pharmabooks; 2007. p. 485

International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities – Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH; 1996.

Mohamed MY, El-Gendy AE, El-Bardicy MG, Tawakkol MS, Ahmad AKS. Flow injection analysis of pharmaceutical compounds VII - determination of some anthelmintic and antiprotozoal compounds. Spectrosc Lett. 1996; 29(2):299-319.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 325.

Simões SS, Medeiros EP, Gaião EN, Lyra WS, Moreira PNT, Araújo MCU, Silva EC, Nascimento VB. Flow injection determination of metronidazole through spectrophotometric measurement of the nitrite ion produced upon alkaline hydrolysis. J Braz Chem Soc. 2006; 17(3):609-13.

United States Pharmacopeia. 32nd ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009. p. 2973.

