



## Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação de Metronidazol em Forma Farmacêutica (Gel Vaginal)

Danilo C.G. BEDOR \*<sup>1</sup>; José L. SOARES SOBRINHO <sup>2</sup>; Severino G. JÚNIOR <sup>3</sup>;  
Selma V. RAMOS <sup>3</sup>; Ádley A.N. LIMA <sup>2</sup> & Pedro J. ROLIM NETO <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético - NUDFAC-UFPE. Av. Prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária - CEP 50740-521 - Recife - Pernambuco - Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM-UFPE. Av. Prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária - CEP 50740-521 - Recife - Pernambuco - Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE, Largo de Dois Irmãos, nº 1117, Dois Irmãos - CEP 52171-010 - Recife - Pernambuco - Brasil..

**RESUMO.** O método analítico por espectrofotometria no ultravioleta foi desenvolvido e validado, segundo as normas vigentes das agências regulatórias, para a quantificação de metronidazol gel vaginal. Utilizou-se N-N-dimetilformamida para extração do metronidazol a partir da forma farmacêutica e o comprimento de onda utilizado foi de 308 nm. O método desenvolvido, de acordo com o tratamento estatístico dos resultados demonstrou ser preciso, exato, seletivo, robusto e linear, constituindo-se uma alternativa confiável e eficiente e de baixo custo para a determinação de metronidazol gel vaginal na rotina laboratorial.

**SUMMARY.** "Development and Validation of an Analytical Method for Quantification of Metronidazole in Pharmaceutical Dosage Form (Vaginal Gel)". The analytical method of spectrophotometry by UV for the assay of metronidazole vaginal gel was developed and validated following all the requirements of the regulatory agencies. N-N-dimethylformamide was used for the extraction of metronidazole from pharmaceutical form and the wavelength used was 308 nm. The developed method, in accordance with the statistical treatment of the results demonstrated being precise, accurate, selective, robust and linear, consisting a trustworthy and efficient analytical alternative with low cost for determination of metronidazole vaginal gel in the laboratorial routine.

### INTRODUÇÃO

O Metronidazol, 1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, fármaco antiprotozoário e antimicrobiano pertencente à classe dos imidazóis, sub-grupo dos nitroimidazóis, é ativo contra um amplo espectro de parasitas, protozoários anaeróbios e bactérias anaeróbias, possuindo atividade particularmente elevada in vitro, contra *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* <sup>1,2</sup>. Existe uma importante demanda de métodos rápidos e simples para determinação do metronidazol em preparações farmacêuticas. Métodos baseados em HPLC e volumetria clássica são recomendadas pela farmacopéia para determinação direta do metronidazol <sup>3</sup>. Várias pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de novos métodos alternativos de alta performance para quantificação do metronidazol utilizando diversas técnicas como eletroforese de banda capilar com detecção UV <sup>1</sup>, cromatografia líquida de fase reversa - espectrometria de massa (MS/MS) <sup>4</sup>, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) <sup>5,6</sup>, espectroscopia de Ressonância

Magnética Nuclear (RMN) <sup>7</sup>, espectroscopia do Infravermelho próximo (NIR) <sup>8</sup>, polarografia de pulso diferencial <sup>9</sup>, voltametria com eletrodo de carbono vítreo <sup>10,11</sup>, sendo parte desses métodos em fluidos biológicos. Dentre as técnicas apresentadas anteriormente, a espectrofotometria de UV mostra-se um dos métodos mais empregados, em função da robustez, custo reduzido, rapidez e grande número de aplicações desenvolvidas <sup>12</sup>.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de metronidazol na forma farmacêutica gel vaginal de acordo com a International Conference on Harmonization <sup>13</sup>.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Reagentes e matéria-prima

Para o desenvolvimento e validação do método analítico utilizou-se metronidazol substância química de referência (SQR) obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Sa-

**KEY WORDS:** Development of Method, Metronidazole, Validation.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desenvolvimento de método, Metronidazol, Validação.

\* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: danilo\_bedor@yahoo.com.br

úde (INCQS). Para a realização dos experimentos foram utilizados: gel vaginal produzido no Lafepe, propilparabeno, metilparabeno, CMC 200 Gel S e fosfato monossódico. Os reagentes utilizados no preparo e obtenção da amostra foram: N-N-dimetilformamida e metanol.

### **Equipamento**

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro Shimadzu, com duplo feixe, modelo N-2401 PC, com detector de 190 a 900 nm, possuindo lâmpada deutério e tungstênio. A calibração do equipamento espectrofotômetro foi realizada, através de padrões de referência, rastreado pelo NIST (National Institute of Standards and technology).

### **Desenvolvimento do método analítico**

Inicialmente foi realizada uma varredura espectrofotométrica no intervalo de 190,0 a 600,0 nm com o objetivo de evidenciar o melhor comprimento de onda. A etapa seguinte foi a utilização de uma gama de diferentes solventes em uma escala de polaridade (baseado em log P onde, P é o coeficiente de partição) para o particionamento do metronidazol da matriz do gel vaginal para o solvente (dietiléter, acetato de etila, etanol, metanol, N-N-dimetilformamida, dimetilsulfoxido) sem que houvesse interferência dos componentes da formulação.

### **Validação**

A validação seguiu as recomendações do ICH, onde foram analisados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez <sup>14</sup>.

### **Seletividade**

A seletividade/especificidade do método foi determinada pela análise de amostras em triplicata do placebo contendo os ingredientes inativos da geléia vaginal: Propilparabeno, Metilparabeno, CMC 200 Gel S e Fosfato Monossódico na presença dos mesmos solventes utilizados na quantificação do metronidazol no comprimento de onda de 308 nm.

### **Linearidade**

A linearidade do método foi realizada de modo a compreender o intervalo de trabalho para a análise de rotina de metronidazol gel vaginal 500 mg / 5 g . Seis diferentes pontos foram analisados em quatro replicatas na faixa de 2,5 - 15 µg/mL e realizada uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

### **Precisão**

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade com análise de seis amostras

autênticas na concentração de 10 µg/mL avaliando o coeficiente de variância. A precisão intermediária foi realizada com a análise de seis amostras por dois diferentes analistas em dois dias consecutivos e comparadas estatisticamente por ANOVA.

### **Exatidão**

Para este teste foi realizada a manipulação de três lotes de bancada do gel vaginal com o objetivo de, com as mesmas diluições, as amostras chegassem às concentrações de metronidazol 9 µg/mL, 10 µg/mL e 11 µg/mL equivalente a (90, 100 e 110%) os valores foram comparados com os valores obtidos pela análise da SQR nas mesmas concentrações.

### **Robustez**

Foram analisadas amostras em triplicata para cada parâmetro de variação estudado: tipo de agitação, tempo de agitação e volume de N,N-dimetilformamida. Todas as amostras utilizadas nos estudos de robustez apresentavam concentração de 10 µg/mL. Os resultados foram avaliados através do teste t de Student.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Desenvolvimento do método analítico**

Após avaliação dos resultados preliminares, onde se considerou o comprimento de onda de maior absorbância para o metronidazol sem a interferência dos constituintes da formulação. O comprimento de onda usado na metodologia de 308 nm é o que melhor absorve a molécula de metronidazol comprovando experimentalmente o conhecimento teórico, conforme demonstrado na Figura 1.

O metronidazol foi extraído a partir de 50 mg do gel vaginal com a ajuda de 5 mL de N,N-dimetilformamida e aquecimento durante 8 min na temperatura de 60 °C as diluições subsequentes foram realizadas em metanol.

### **Validação do método analítico**

#### **Seletividade**

As análises realizadas da formulação do gel vaginal sem o princípio ativo não mostraram resposta do equipamento quando analisada no comprimento de onda de 308 nm, ficando evidenciada a especificidade do método desenvolvido frente aos excipientes e solventes utilizados na análise.

#### **Linearidade**

O intervalo das concentrações estudadas (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL) mostrou-se linear após análise estatística pelo método dos mínimos quadrados. Foram obtidas curvas com equações de retas  $Y = 0,051423 (\pm 0,00063)$

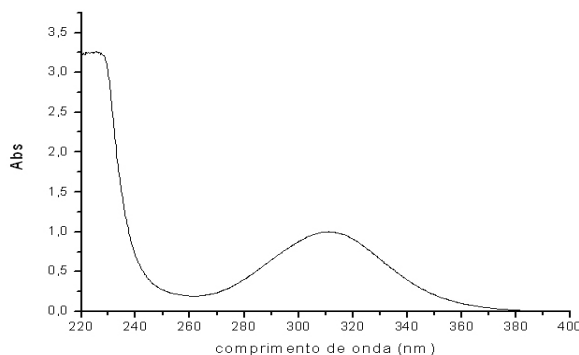


Figura 1. Curva espectrofotométrica do metronidazol.

$x + 0,004883 (\pm 0,006132)$  um bom coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,99923$ ) e que através da ANOVA evidenciou-se que não há falta de ajuste mostrando a capacidade do método gerar resultados proporcionais às concentrações estudadas. As quatro replicatas de cada nível de concentração mostraram coeficientes de variância em torno de 0,8% (média). Ainda como resultado da avaliação da linearidade do método, calculou-se o LQ  $0,3469 \mu\text{g/mL}$  e o LD  $0,1040 \mu\text{g/mL}$ .

#### Precisão

Para o ensaio da precisão, na repetitividade de seis réplicas autênticas na concentração de  $10,0 \mu\text{g/mL}$ , apresentou-se como resultado a média de  $11,14 \mu\text{g/mL}$  e com desvio padrão relativo de 1,87%, atendendo as exigências normativas. Outro ensaio de precisão, a intermediária, foi avaliada entre dois dias e dois analistas diferentes, tendo como resultado do tratamento estatístico por ANOVA, que o método foi preciso, pois mesmo havendo variações entre dias e entre analistas, estas se enquadram dentro dos limites especificados. Isto foi comprovado através da análise de variância, tanto para a precisão entre dias como entre analistas, que apresentaram valores de F calculado abaixo dos valores críticos tabelados, com nível de 95% de confiança.

#### Exatidão

Os resultados de exatidão do método evidenciaram uma concordância entre os resultados encontrados na análise do gel vaginal nas concentrações de 90, 100 e 110%. A análise estatística através do teste t de Student comprovou a similaridade dos resultados em um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostraram  $t$  calculados (2,47604; 3,41049 e 4,234764) foram inferiores ao  $t$  tabelado (4,3030).

#### Robustez

O método mostrou-se robusto a três diferentes parâmetros variados durante o processo de análise das amostras. Avaliou-se a capacidade

do método resistir a dois diferentes tipos de agitação (agitação magnética, sonicador), diferentes tempos de agitação (10 e 15 min) e também a diferença no volume de N-N-dimetilformamida (5,0 e 5,2 mL) utilizado na extração do metronidazol no gel vaginal. Os valores encontrados foram comparados através de testes t de Student onde os  $t$  calculados (0,71944; 0,07885; 1,01969) para o tipo de agitação, o tempo de agitação e o volume do solvente, respectivamente, se apresentaram menores que o  $t$  tabelado (2,77645) dentro de um intervalo de confiança de 95%.

## CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado, tem-se que pelos resultados apresentados o método desenvolvido, apresenta-se validado conforme o International Conference on Harmonisation, estando disponível como método específico, preciso, exato e robusto para acompanhamento do teor e da uniformidade de conteúdo dos géis vaginais a base de metronidazol  $500 \text{ mg/5 g}$ .

**Agradecimentos.** Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE e ao CNPq

## REFERÊNCIAS

1. Manaenkov, O.V., A.I. Sidorov & E.M. Sul'man, (2003) *Pharm. Chem. J.* **11**: 47-8.
2. Dias, A., J.L. Soares Sobrinho, L.C.C. Nunes, M.F. La Roca, M.S.S. Cunha Filho & P.J. Rolim Neto (2005) *Rev. Cienc. Farm. Basic. Apl.* **26**: 217-20.
3. United States Pharmacopeia 28<sup>th</sup> ed. (2005) The United Pharmacopeial Conventional, Rock Ville, pág. 1236.
4. Xia, X., X. Li, S. Zhang, H. Ding, J. Jiang & J. Shen (2007) *Anal. Chim. Acta* **586**: 394-8.
5. Akay, C., S.A. Ozkan, Z. Senturk & S. Cevheroglu (2002) *Farmaco* **57**: 953-7.
6. Tavakoli, N., J. Varshozas, F. Dorkoosh & M.R. Zargazadeh (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**: 325-9.
7. Salem, A.A., H.A. Mossa & B.N. Barsoum (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 654-661.
8. Zhao, L., Y. Dou, Y. Mi, M. Ren & Y. Ren (2007) *Spectrochim. Acta* **66**: 1327-32.
9. La-Scalea, M.A., S.H.P. Serrano & I.G.R.V. Gutz (1999) *J. Braz. Chem. Soc.* **10**: 127-35.
10. Ozkan, A.S., Y. Ozkan & Z. Senturk (1998) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 299-305.
11. Simões, S.S., E.P. Medeiros, E.M. Gaião, W.S. Lyra, P.N.T. Moreira, M.C.U. Araújo, E.C. Silva & V.B. Nascimento (2006) *J. Braz. Chem. Soc.* **17**: 609-13.
12. Rocha, F.R.P. & L.S.G. Teixeira (2004) *Quim. Nova* **5**: 807-12.
13. International Conference on Harmonisation - ICH (1995) *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95).
14. International Conference on Harmonisation - ICH (1995) *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, Q2A (CPMP/ ICH/ 381/95).