

Desenvolvimento e validação de método analítico utilizando a Espectroscopia Raman para identificação dos insumos farmacêuticos ativos Benznidazol e Captopril no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE)

Hamann da Koralyne de Araújo Lopes^a, Severino Grangeiro Júnior^b, Fernanda Vera Cruz de Vasconcelos^{c*}.

Endereço dos autores:

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 51.200-060, Brasil.

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, 51.200-060, Brasil.

^cLaboratório Farmacêutico Governador Miguel Arraes (LAFEPE), Recife, 50.740-52, Brasil.

*Correspondência do autor

E-mail: nandaveracruz@yahoo.com.br

Tel: (+55)-81-3183-1171

Resumo

Objetivo: Desenvolver e validar um método analítico utilizando a Espectroscopia Raman para identificação dos insumos farmacêuticos ativos Benznidazol e Captopril no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE).

Metodologia: Foi feita a montagem da biblioteca para as matérias-primas analisadas utilizando diferentes lotes aprovados pelo controle de qualidade do LAFEPE. Os espectros Raman foram adquiridos utilizando o espectrômetro Raman IdentiCheck da Perkin Elmer, acoplado a uma sonda de fibra óptica. Para realização das medidas foram otimizados os seguintes parâmetros: caminho óptico, tempo de exposição do laser e número de exposições. O espectro de referência foi obtido a partir da média de seis espectros, sendo os quatro espectros restantes utilizados para comparação e cálculo do coeficiente de correlação. Para realização dos cálculos, utilizou-se o software COMPARE™. O método desenvolvido foi validado segundo a RE 899/03.

Resultados: Os parâmetros de medida utilizados para o Captopril e Benznidazol foram: caminho óptico de 7,0 e 6,00 mm; tempo de exposição de 2,0s e 1,0 s; número de exposições de 4,0 e faixa espectral de 3030-200 cm^{-1} e 3278-200 cm^{-1} , respectivamente. As amostras apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,99 corroborando com os resultados obtidos pelo método oficial, infravermelho médio (MIR).

Conclusão: O método proposto foi desenvolvido e validado. A partir dos resultados obtidos é possível utilizar a espectroscopia Raman na identificação de matérias-primas empregando uma técnica rápida, não destrutiva, específica e não requer a amostragem do material.

Palavras-Chave: Espectroscopia Raman, Identificação, Matérias-primas farmacêuticas.

Abstract

Objective: Develop and validate an analytical method using Raman spectroscopy for the identification of raw materials pharmaceuticals (Benznidazole and Captopril) in LAFEPE.

Materials and methods: Initially was made the library assembly to the raw materials analyzed. For this purpose, were using different lots approved by control of quality of the LAFEPE. The Raman spectra were acquired using a Raman spectrometer from Perkin Elmer IdentiCheck coupled a fiber optic probe. For Raman measurements were optimized the parameters: optical path, laser exposure time and number of exposures. The reference spectrum was obtained from the average of six spectra, and the remaining four spectra were used for comparison and calculation of the correlation coefficient. For the calculations, we used the software COMPARE™. The method was validated according to RE 899/03.

Results: The parameters for measurements of the Captopril and Beznidazole were: optical path 7.0 and 6.00 mm; laser exposure time 2.0 and 1.0 s; number of exposures 4.0 and spectral range of 3030-200 cm^{-1} and 3278-200 cm^{-1} , respectively. The samples analyzed showed correlation coefficients greater than 0.99 corroborating with the results obtained by the official method, mid-infrared (MIR).

Conclusion: The proposed method was developed and validated. From these results obtained, it is possible to use Raman spectroscopy in the identification of raw materials pharmaceuticals using the method fast, non-destructive, and not require of sampling of the material.

Keywords: Raman Spectroscopy, Identification, Raw materials pharmaceuticals.

1. Introdução

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) é uma empresa de economia mista fundada no ano de 1963. Tal laboratório é vinculado à Secretaria Estadual de Saúde e tem como objetivo produzir e comercializar medicamentos para atender as políticas de saúde pública em nível estadual, regional e nacional e aos segmentos da população de menor poder aquisitivo.¹

No Brasil, a RDC nº17, de 16 de abril de 2010, dispõe sobre os requisitos mínimos a serem seguidos pelas indústrias farmacêuticas na produção de medicamentos, a fim de padronizar o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, bem como assegurar a qualidade de insumos e produtos farmacêuticos. A realização de ensaios de identificação de 100% das matérias-primas na etapa de recebimento constitui uma das exigências da RDC 17/2010.²

As Boas Práticas de Fabricação é a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. O cumprimento das BPF esta orientado primeiramente a diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados. Os riscos são constituídos essencialmente por contaminação-cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura de produto.²

Para assegurar a qualidade dos insumos farmacêuticos os compêndios oficiais recomendam os métodos tradicionais como: métodos colorimétricos, ultravioleta-visível (UV-vis), cromatografia de camada delgada – CCD, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e infravermelho médio (MIR).³ Apesar de eficientes, esses métodos apresentam algumas desvantagens como o tratamento prévio das amostras, um tempo maior para a liberação dos resultados, além de no caso do HPLC, ser bastante

oneroso. Já no infravermelho médio as medidas podem ser realizadas sem pré-tratamento da amostra e sem o uso de reagentes, utilizando-se acessório de reflectância total atenuada (ATR), entretanto, é necessária a coleta da amostra para análise no laboratório o que demanda certo tempo.

A espectroscopia Raman apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos comumente utilizados para identificação de matérias-primas, é uma técnica analítica rápida, não destrutiva, não invasiva e que permite a construção de equipamentos portáteis possibilitando a realização de testes no local do recebimento, reduzindo assim o tempo de análise e liberação da matéria-prima.⁴

A espectroscopia Raman surgiu em 1928 a partir da descoberta do efeito espalhamento inelástico da radiação feito pelo cientista indiano Chandrasekhara Venkata Raman, e apresenta elevado grau de seletividade molecular. Além disso, pode ser utilizada para medidas em soluções aquosas, visto que, a água apresenta baixo espalhamento no Raman.^{4,5}

As desvantagens da técnica são o custo elevado do equipamento e a presença de ruído devido à fluorescência, gerada em algumas amostras, o que pode sobrepor às bandas do espectro Raman dificultando assim sua interpretação. Porém, esse efeito pode ser minimizado utilizando um laser com comprimento de onda na região espectral do infravermelho próximo (NIR), por apresentar uma menor frequência da radiação incidente e uma menor intensidade de espalhamento reduzindo assim a fluorescência.⁶

A combinação desses fatores permite o desenvolvimento de métodos simples para identificação de compostos químicos. Desse modo, o presente trabalho tem por objetivo do desenvolvimento e validação do método com espectroscopia Raman no processo de identificação de matérias-primas farmacêuticas, em especial, Captopril e Benznidazol, para identificação de 100% dos recipientes na etapa de recebimento no

LAFEPE. Para tanto, foi realizada a aquisição dos espectros Raman, otimização dos parâmetros de medida, montagem da biblioteca, e por fim a validação dos métodos analíticos segundo a Resolução RE 899 de 2003.⁷

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Para realização desse estudo foram utilizados 10 recipientes de diferentes lotes das matérias-primas (Captopril e Benznidazol), a fim de aumentar a variabilidade e a robustez do conjunto de dados. Todos os recipientes foram aprovados pelo controle de qualidade, e armazenados no Almojarifado do LAFEPE sob condições controladas de temperatura e umidade.

2.2. Aquisição dos espectros Raman

Os espectros Raman foram adquiridos utilizando o espectrômetro Raman Portátil IdentiCheck da Perkin Elmer, acoplado a uma sonda de fibra óptica. Para aquisição das medidas foram avaliados os seguintes parâmetros: caminho óptico (4,00 – 7,00 mm), tempo de exposição do laser (1,0 – 2,5 s) e número de exposições (2 – 4).

2.3. Montagem da Biblioteca

Nessa etapa foi realizada a construção de um banco de dados (biblioteca) de substâncias previamente conhecidas, para serem comparadas com os espectros obtidos através das análises realizadas em matérias-primas que chegam diariamente no almojarifado do LAFEPE. A montagem da biblioteca foi realizada após a otimização dos parâmetros de medida, os quais a matéria-prima melhor se comportou espectroscopicamente.

O espectro de referência foi obtido a partir da média de seis espectros selecionados aleatoriamente, e os quatro espectros restantes utilizados para comparação

e cálculo do coeficiente de correlação. Para realização da média dos espectros e cálculo do coeficiente de correlação foi utilizado software COMPARETM disponível no próprio equipamento.

A partir dos resultados obtidos para os coeficientes de correlação foram calculados: a média (equação 01), o desvio padrão (equação 02), e o intervalo de confiança (equação 03), que será utilizado como critério de aceitação para novas matérias-primas.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Equação 01}$$

Onde X_i = valores individuais e n = número de ocorrências.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 02}$$

Onde X_i = valores individuais, \bar{X} = média e n = número de ocorrências.

$$IC = \bar{X} \pm 3.S \quad \text{Equação 03}$$

As matérias-primas que apresentarem coeficientes de correlação maiores que o limite inferior do intervalo de confiança serão consideradas aprovadas no teste de identificação.

2.4. Validação do método analítico:

A validação do método proposto para identificação das matérias-primas analisadas nesse estudo foi realizada de acordo com a Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. Segundo essa resolução para validação de testes de identificação, classificada com categoria IV, é necessária apenas a avaliação da especificidade do método.

Para tanto, foram escolhidas dentro do escopo de produtos do LAFEPE as matérias-primas com estrutura química semelhante às analisadas nesse estudo. No caso

do Captopril foi utilizado o Ácido Acetil Salicílico e para o Benznidazol foi utilizado o Metronidazol.

3. Resultados e Discussões

3.1. Amostras

Os 10 recipientes, para cada uma das matérias-primas analisadas, foram previamente identificados como matéria-prima Captopril e Benznidazol utilizando-se o método por infravermelho médio (MIR) por comparação com a substância química de referência (SQR), conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5^o edição (2010)³.

3.2. Aquisição dos espectros Raman

Para o Captopril os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o caminho óptico de 7,00 mm; tempo de exposição de 2,0 s; número de exposições de 4,0 e faixa espectral de trabalho de 3030-200 cm^{-1} . No caso do Benznidazol os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o caminho óptico de 6,0 mm; tempo de exposição de 1,0s; número de exposições de 4,0 e faixa de espectral trabalho de 3278-200 cm^{-1} .

3.3. Montagem da biblioteca

As Figuras 1 e 2 mostram, respectivamente, os espectros de referência das matérias-primas Captopril e Benznidazol juntamente com os espectros médios dos quatro recipientes das matérias-primas utilizados para o cálculo do coeficiente de correlação.

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação, médias, desvio padrão e intervalo de confiança, para matérias-primas Captopril e Benznidazol são mostrados na Tabela 1.

3.4. Validação do método analítico

Na Figura 3 é mostrado o espectro Raman do Captopril frente ao espectro Raman do Ácido Acetil Salicílico, composto utilizado para avaliação da especificidade do método. Como pode ser observado apesar da estrutura química semelhante, os espectros Raman obtidos para as duas matérias-primas apresentam picos diferentes, o que pode ser útil no teste de identificação. Isso pode ser comprovado a partir do cálculo do coeficiente de correlação, no qual matéria-prima AAS, foi reprovada no método desenvolvido para o Captopril apresentando um coeficiente de correlação de 0,1912. O mesmo se observa para o Benznidazol e o Metronidazol, conforme mostrado na Figura 4. Nesse caso, o resultado obtido para o coeficiente de correlação foi de 0,3785.

4. Conclusão

O método proposto foi validado de acordo com a RE 899/03, no qual os espectros das matérias-primas Captopril e Benznidazol, foram comparados e apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,99, corroborando com os resultados obtidos pelo método oficial (MIR). Comparando-se o espectro Raman da matéria-prima Captopril com o do AAS o software mostrou uma correlação de 0,1912 e um resultado “FAIL”, no caso do Benznidazol, esse foi comparado com o espectro do Metronidazol, apresentando correlação de 0,3785 e um resultado também “FAIL”. Isso comprova a especificidade do método proposto para identificação de matérias-primas com estrutura química semelhante.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo foi demonstrado que é possível utilizar a espectroscopia Raman na identificação de matérias-primas farmacêuticas (Captopril e Benznidazol) do LAFEPE utilizando-se uma técnica analítica rápida, não destrutiva e que permite a identificação dos materiais no local do recebimento, sendo,

portanto uma opção atraente para vistoria de 100% das matérias-primas em atendimento aos requisitos da RDC 17 (2010).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) pela disponibilidade das matérias-primas, equipamentos e estrutura física para realização desse trabalho. Agradecem também a Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS) pelo apoio acadêmico e ao Núcleo de Química Analítica Avançada de Pernambuco (NUQAAPE) pelo apoio técnico.

Referências

1. LAFEPE medicamentos - Memento Terapêutico. Recife: Companhia Editora de Pernambuco, 2006. v. 01. p. 436.
2. Brasil. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC - nº 17 de Abril de 2010: Dispõe sobre o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para Fabricação de Medicamentos, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 2010.
3. Brasil. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Brasília, 2010. v. 02. p. 684, 789.
4. Vankeirsbilck T, Vercauteren A, Baeyens W, Van der Weken G. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis. Trends in Analytical Chemistry. 2002; 21: 869-877.
5. Millen RP, De Faria DL, Temperini MLA. Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados. Quim. Nova. 2005; 28: 289-295.
6. Medeiros VMM. Utilização da espectroscopia Raman para monitorar a cura de tintas epóxi aplicadas em tanques de armazenamento de petróleo [dissertação]. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, 2010.
7. Brasil. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. DOU de 02/06/2003.

Legendas - Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Resultados obtidos para os coeficientes de correlação, média, desvio padrão e intervalo de confiança para as matérias-primas Captopril e Benznidazol.

Fig. 1 – Espectro de referência (média dos seis espectros) da matéria-prima Captopril juntamente com o espectro médio dos quatro recipientes das matérias-primas utilizados para o cálculo do coeficiente de correlação.

Fig. 2 – Espectro de referência (média dos seis espectros) da matéria-prima Benznidazol juntamente com o espectro médio dos quatro recipientes das matérias-primas utilizados para o cálculo do coeficiente de correlação.

Fig. 3 – Espectro da matéria-prima Captopril frente ao espectro da matéria-prima Ácido Acetil Salicílico, composto utilizado para avaliação da especificidade do método.

Fig. 4 – Espectro da matéria-prima Benznidazol frente ao espectro da matéria-prima Metronidazol, composto utilizado para avaliação da especificidade do método.

Ilustrações - Tabelas e Figuras

Tabela 1

Parâmetros	Recipiente	Captopril	Benznidazol
	01	0,9992	0,9998
Coefficiente de correlação	02	0,9991	0,9997
	03	0,9990	0,9997
	04	0,9989	0,9998
Media		0,9991	0,9998
Desvio Padrão		0,0001	0,0001
Intervalo de Confiança		0,0003	0,0002
Valor Maximo		0,9994	1,0000
Valor Mínimo		0,9988	0,9996

Figura 1

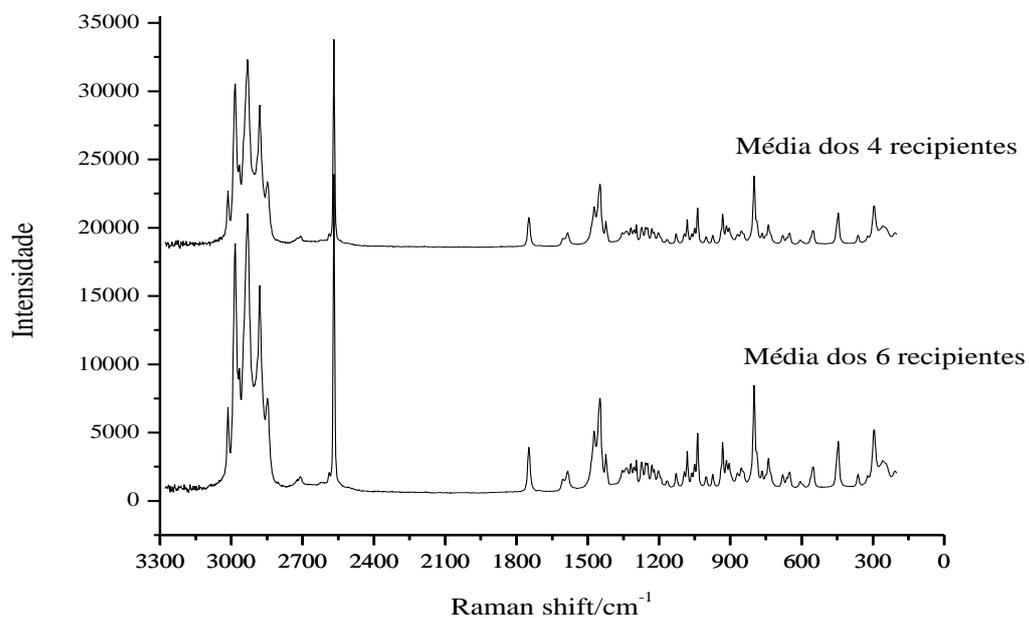


Figura 2

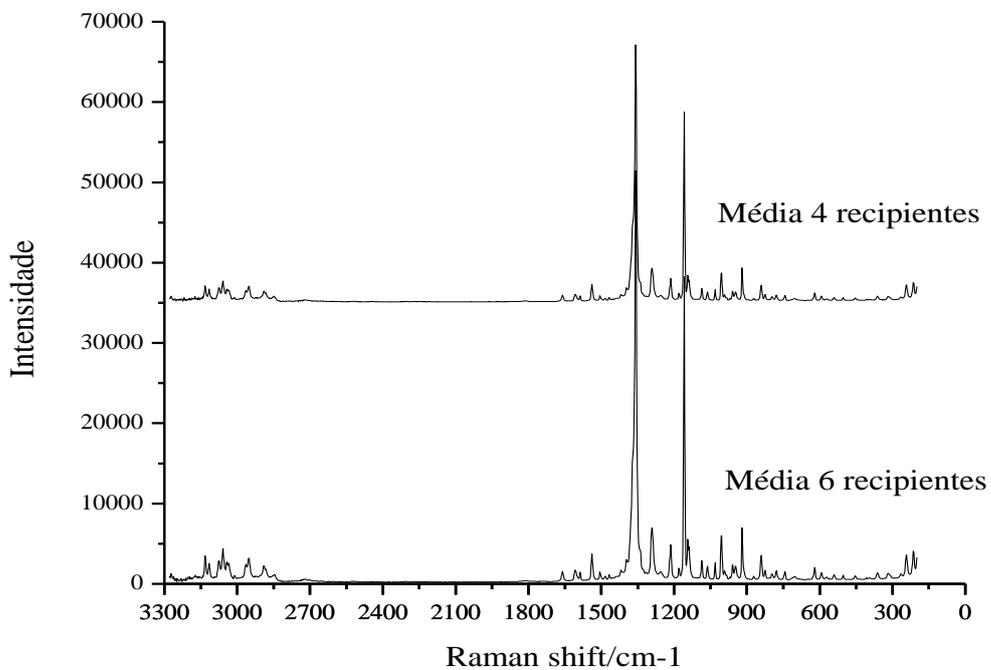


Figura 3

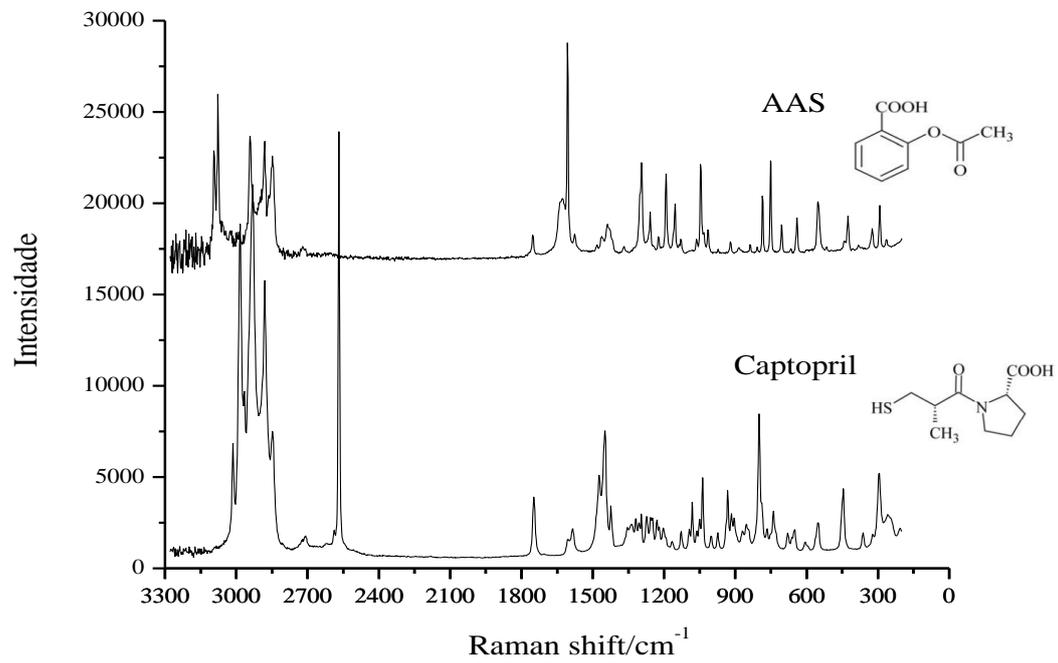


Figura 4

