

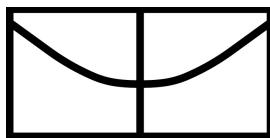
Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos de Quantificação do Fármaco furosemida por
Ressonância Magnética Nuclear**

Luana Ferreira da Costa

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aline Lima de Oliveira

Brasília, Junho de 2014



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos de Quantificação do Fármaco furosemida por
Ressonância Magnética Nuclear**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química como
pré-requisito para obtenção do título
de mestre em Química.

Luana Ferreira da Costa

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Lima de Oliveira

Brasília, Junho de 2014

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Luana Ferreira da Costa**, matrícula nº **12/0178150**, intitulada "**Estudos de Quantificação do Fármaco do Furosemida por Ressonância Magnética Nuclear**", apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 27 de junho de 2014.



Profª Drª Aline Lima de Oliveira
Presidente de Banca (IQ/UnB)



Profª Drª Ana Cristi Basile Dias
Membro Titular (IQ/UnB)



Prof. Dr. Carlos Martín Infante Córdoba
Membro Titular (FS/UnB)



Prof. Dr. Adriano Otávio Maldaner
Membro Suplente (INC/PF)

Em 27 de junho de 2014.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar a persistência e força necessária para concluir este trabalho.

Aos meus pais e irmãos pela paciência exigida durante este período, nas muitas vezes em que perguntas não eram bem-vindas.

À minha orientadora Aline, que topou orientar em uma área diferente e que teve muita paciência para meus questionamentos, às vezes bobos. Esta pessoa me auxiliou no decorrer do início ao final, resultando nessa dissertação.

À minha ex-professora Silvia Keli, que atuou como uma co-orientadora. Uma pessoa que me deu apoio, além de fornecer matéria-prima, laboratório disponível para que pudesse trabalhar e discutir os resultados obtidos.

Ao Jonatas, pela ajuda com referências, discussões analíticas e análises de UV.

Aos meus amigos químicos: Arilson (tio do churrasco) e Luciana (vaquinha) pelas discussões referentes à dissertação e momentos de descontração.

Agradeço a todos a vocês, porque sem vocês não acredito que seria possível aprender tanto no decorrer do desenvolvimento deste trabalho e muito menos concluí-lo.

RESUMO

Problemas em testes descritos nas Farmacopéias que envolvem a avaliação da qualidade de medicamentos têm estimulado o desenvolvimento de novos métodos que sejam capazes de identificar impurezas e falsificações. Uma das técnicas propostas para esta finalidade é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que pode ser considerada como um detector universal. Compostos orgânicos, tais como excipientes ou impurezas, são sempre detectados no espectro de RMN obtido para a formulação farmacêutica. Neste trabalho foi desenvolvido um novo método para a quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas utilizando RMN. Depois da aquisição de todos os dados necessários para a construção de uma curva analítica com padrão externo e validação do método, este foi aplicado para a quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos por RMN foram comparados com os resultados obtidos pelo método indicado pela Farmacopéia Brasileira. Após esta análise foi possível concluir que as médias obtidas através de ambos os métodos não são significativamente diferentes.

ABSTRACT

Problems in tests described in Pharmacopoeia that involves the assessment of drug quality have stimulated the development of new methods that are capable of identifying impurities and counterfeits. One of the techniques proposed for this purpose is a nuclear magnetic resonance (NMR), which can be considered as a universal detector. Organic compounds, such as excipients or impurities are always detected in the NMR spectrum obtained for the pharmaceutical formulation. In this work we developed a new method for quantitation of furosemide in pharmaceutical formulations using NMR. After acquisition of all the necessary data for the construction of an analytical curve with external standard and method validation, it was applied to quantify furosemide in pharmaceutical formulations. The NMR results were compared with the results obtained by the method described by the Brazilian Pharmacopoeia. After this analysis it was possible to conclude that the mean values obtained by both methods are not significantly different.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
Lista de Abreviaturas	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras.....	viii
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 FUROSEMIDA	10
1.2 QUALIDADE DE FÁRMACOS	11
1.2.1 Método Oficial	12
1.2.2 Métodos alternativos.....	13
1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	15
1.3.1 Breve histórico	17
1.3.2 Preparo de amostra	19
1.3.3 Parâmetros de Aquisição	23
1.3.4 Processamento dos espectros.....	27
1.3.5 Quantificação	29
1.3.6 Análise de variância.....	31
1.3.7 Validação.....	33
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
3.1 REAGENTES E SOLVENTES	36
3.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	36
3.3 PREPARO DE AMOSTRA.....	36
3.4 DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO	38
3.5 AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO	39
3.6 PROCESSAMENTO E TRATAMENTO DOS DADOS	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 ATRIBUIÇÃO DE SINAIS	41

4.2	PREPARO DE AMOSTRA E PUREZA DE SINAIS	43
4.3	PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DE ESPECTROS.....	47
4.4	CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	51
4.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	55
4.6	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS	58
5	CONCLUSÕES.....	62
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

Lista de Abreviaturas

- ANOVA** – Análise de Variância
- AT** – *acquisition time* / tempo de aquisição
- CDCl₃** – clorofórmio deuterado
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CV** – Coeficiente de variação
- D₂O** – água deuterada
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- EC** – eletroforese capilar
- EtOH** – etanol
- FB 5** – Farmacopéia Brasileira, 5^a edição
- FID** – *free induction delay* / decaimento livre de indução
- FT** – *Fourier transformation* / transformada de Fourier
- COSY** – *Correlation Spectroscopy* / Espectroscopia de Correlação
- HOD** – água residual
- ICH** – *International Conference on Harmonization*
- IV** – Infravermelho
- LOD** – *limit of detection* / limite de detecção
- LOQ** – *limit of quantification* / limite de quantificação
- MeOH** – metanol
- NOESY** – *homonuclear two-dimensional NOE spectroscopy*
- NS** – *number of scans* / número de transientes
- OSCS** – *Oversulfated chondroitin sulfate* / sulfato de condroitina supersulfatada
- PI** – padrão interno
- Pre-Sat** – Pré-saturação
- pw** – *pulse width* / largura do pulso
- RD** – *Relaxation delay* / tempo de espera da relaxação
- RG** – *Receiver gain* / ganho do receptor
- RMN** – Ressonância Magnética Nuclear
- RMNq** – Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
- S/R** – sinal/ruído
- SD** – sulfato de dermatano
- SQR** – Substância Química de Referência

TMS – tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

Lista de Tabelas

Tabela 1. ; Fórmulas utilizadas nos cálculos da tabela de ANOVA, onde \bar{Y} =média global, \bar{Y}_i =média do nível, \hat{Y}_i =valor estimado, Y_{ij} =valor experimental, p =número de parâmetros do modelo, n =número de replicatas no total e m =número de níveis.	31
Tabela 2. Alíquotas dos solventes utilizados no preparo de amostra 5. NaAcO = acetato de sódio.	38
Tabela 3. Resumo dos dados obtidos para atribuição de sinais da furosemida.	41
Tabela 4. Constantes de acoplamento do anel furano (Adaptado da ref. 55).	42
Tabela 5. Alíquotas dos solventes utilizados nos preparos de amostra 3-5 das formulações farmacêuticas.	44
Tabela 6. Valores dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da furosemida.	48
Tabela 7. Valores dos parâmetros de aquisição utilizados para obter os espectros quantitativos.	51
Tabela 8. Tabela de ANOVA preenchida a partir dos resultados obtidos para o hidrogênio 6 da furosemida.	53
Tabela 9. Tabela de ANOVA preenchida a partir dos resultados obtidos para o hidrogênio 7 da furosemida.	53
Tabela 10. Inclinação e intercepto para ambos os hidrogênios aromáticos da furosemida.	55
Tabela 11. Deslocamentos químicos obtidos para avaliação de robustez (δ_{exp}) e valores descritos na literatura (δ_{ref}). ^{57,58,59}	56
Tabela 12. Coeficientes de variação para avaliação da precisão do método.	57
Tabela 13. Resumo dos excipientes contidos em cada formulação farmacêutica, indicados pela bula.	58
Tabela 14. Porcentagens de furosemida em cinco marcas de formulações farmacêuticas obtidas por duas técnicas: UV e RMNq.	60

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular da furosemida.	10
Figura 2. Reações de decomposição da furosemida, (a) furosemida, (b) N-furfuril-5-sulfamoilantranílico, (c) ácido 4-cloro-5-sulfoantranílico, (d) ácido 4-cloro-5-amino-sulfamoilantranílico ou saluamina, (e) álcool furfúrico, (f) ácido levulínico (Adaptado da ref. 10).	11
Figura 3. Heparina contaminada contendo OSCS marcado com asterisco, metanol (MeOH), sulfato de dermatano (SD) e etanol (EtOH) (Adaptado da ref. 16).	19
Figura 4. Espectros de RMN – ^1H de solventes deuterados: (a) dimetilsulfóxido e (b) acetona. A letra H indica o sinal de água residual (HOD) e a letra S o sinal de prótons residuais do solvente (Adaptado da ref. 38).	21
Figura 5. Influência do solvente deuterado nos deslocamentos químicos de: Cr (Diidroergocristina), α (α -Dihidroergocriptina), β (β -Dihidroergocriptina) e Cor (Diidroergocornina) (Adaptado da ref. 36).	21
Figura 6. Magnetização resultante (M_0): (a) no eixo z, em equilíbrio e (b) após o pulso de 90° (Adaptada de 21).	23
Figura 7. Aumento exponencial da razão M_z/M_0 de acordo com o tempo de relaxação (T_1) (Adaptado da ref. 21).	25
Figura 8. Seqüência de pulsos da pre-saturação, RD= tempo de espera da relaxação, pw= largura do pulso e AT = tempo de aquisição (Adaptado da ref. 21).	26
Figura 9. Efeito da adição de zeros ao final do FID, (a) sem adição e (b) número de pontos duplicado pela adição de zeros (Adaptado de 21).	28
Figura 10. Exemplos de gráficos de resíduos: y_{exp} é o valor medido experimentalmente e y_{est} é o valor estimado (Adaptado da ref. 50).	32
Figura 11. Espectro da furosemida pura em D_2O e NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, acompanhada da sua estrutura molecular com hidrogênios numerados para indicação no espectro. O DSS indica a referência da escala em $0,0 \text{ ppm}$. Solv. = sinal do solvente saturado.	41
Figura 12. Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY da furosemida pura em D_2O e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	43
Figura 13. Espectros de RMN de ^1H : furosemida pura (azul) e furosemida após o preparo de amostra 1 (verde), ambos em acetona- d_6	44

Figura 14. Os Espectros de RMN de ^1H : furosemida pura (azul) e formulação farmacêutica (verde), ambos em solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os asteriscos indicam os sinais dos excipientes que são solúveis na mistura de solventes, os sinais entre 3 e 4 ppm também são atribuídos aos excipientes.	46
Figura 15. Espectro bidimensional (COSY) da furosemida presente em uma formulação farmacêutica e seus excipientes.	47
Figura 16. Espectros obtidos no experimento de determinação do tempo do pulso de 90° para furosemida.	48
Figura 17. Exemplos de sintonia: (a) sintonia com erros no match e tune e (b) sintonia adequada tanto no match quanto no tune (Adaptado da ref. 21).	49
Figura 18. Relação entre a área do sinal de interesse e a frequência no momento da sintonia.	50
Figura 19. Relação entre a razão sinal/ruído do sinal em 7 ppm e a frequência na sintonia.	50
Figura 20. Curvas analíticas obtidas em três momentos diferentes, mostrando o efeito da substituição de componentes eletrônicos. As curvas foram obtidas (A) antes e (B) após a troca de componente eletrônico, e (C) após a troca dos cabos de sintonia.	52
Figura 21. Gráfico de resíduos dos dados obtidos por RMNq para furosemida. Os pontos representam os resíduos do hidrogênio 6 (azul) e hidrogênio 7 (vermelho).....	54
Figura 22. Espectros de RMN de ^1H da furosemida pura em dimetilsulfóxido (vermelho), acetona (preto) e solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (azul). s = sinal saturado do solvente.....	55
Figura 23. Espectros de RMN – ^1H da furosemida em cinco formulações farmacêuticas com as letras indicando as marcas.	59
Figura 24. Espectros de absorção molecular no UV da furosemida pura e das cinco formulações farmacêuticas diferentes.	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUROSEMIDA

A furosemida, com fórmula molecular $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ e estrutura apresentada na Figura 1, é um fármaco da classe dos diuréticos de características fortemente ácidas que é utilizada principalmente para o tratamento de edemas e hipertensão.^{1,2} Também pode ser utilizada para tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento com diuréticos de tiazídicos.³

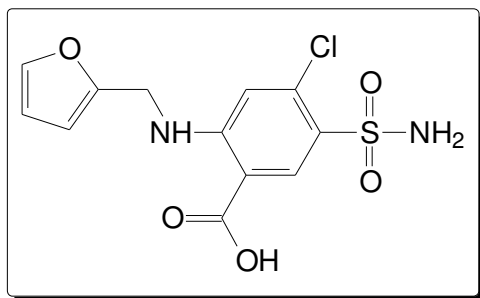


Figura 1. Estrutura molecular da furosemida.

O efeito diurético da furosemida se dá através do bloqueio da absorção de sais e fluídos pelos rins. Este bloqueio ocasiona o aumento da produção de urina e, conseqüentemente, a redução da quantidade de água e eletrólitos no corpo.¹ Porém, apesar destes conhecidos benefícios da furosemida, o medicamento também pode ser utilizado em fraudes nos esportes. Devido ao aumento na produção de urina, o medicamento pode diminuir a concentração de outros compostos considerados doping ou reduzir o peso de atletas que competem em esportes onde os mesmos são separados por categorias de peso.^{1,4}

Outra utilização indevida da furosemida é a sua ingestão para redução de peso.⁵ Mulheres com distúrbios alimentares procuram por medicamentos sem prescrição médica que induzam purgação ou causam perda de peso. Desta forma, estas mulheres acabam por utilizar a furosemida buscando a perda de peso. O uso contínuo de furosemida, bem como outros diuréticos, pode levar a um ciclo de diurese e posterior retenção de água. A suspensão do uso de diuréticos sem prescrição médica causa um aumento de peso que é normalizado após alguns dias.⁶

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a furosemida é comercializada no Brasil sob duas formas: comprimidos e soluções injetáveis. Os comprimidos são vendidos em cartelas, sendo que cada comprimido contém 40 mg do fármaco. Já as soluções injetáveis contêm 10 mg mL⁻¹ de furosemida, vendidas em ampolas contendo 2 mL da solução.⁷

A furosemida degrada em temperaturas acima de 204 °C, não possuindo ponto de fusão ou ebulição.⁸ A presença de luz é outra forma de degradação deste composto quando no estado sólido, necessitando ser armazenado em recipientes que evitem sua fotodecomposição. Sob a radiação ultravioleta (UV) e atmosfera de nitrogênio a furosemida no estado sólido forma apenas o ácido 4-cloro-5-sulfoantranílico. Já na presença de oxigênio, outros produtos não identificados são formados.⁹ Além disso, conforme exemplificado na Figura 2, este fármaco também pode sofrer hidrólise e forma precipitado em meio ácido.¹⁰ Outros dois compostos, formados quando a furosemida está solubilizada em metanol e exposta à radiação ultravioleta, estão representados na Figura 2, estrutura (b) e (c). Em soluções de pH básico a furosemida é estável, porém é necessário que a solução seja protegida contra a radiação ultravioleta (UV). Soluções desoxigenadas de furosemida em pH neutro ao serem submetidas à radiação UV levam à total perda do cloro.¹¹

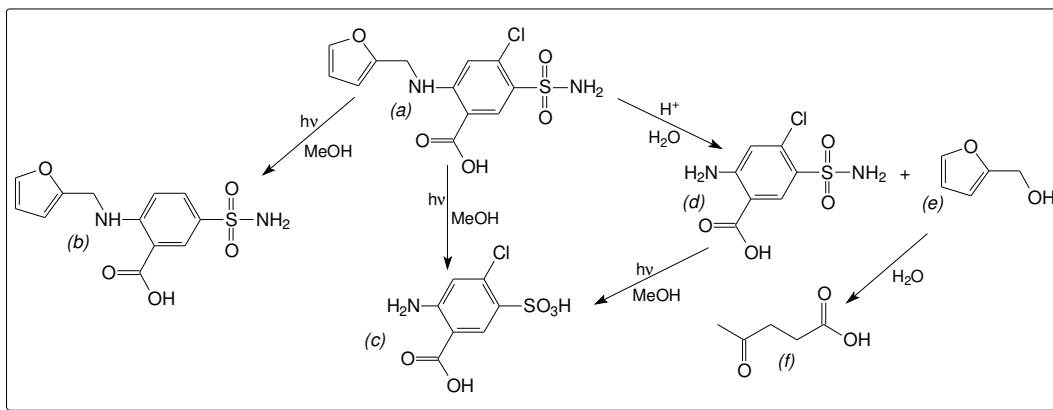


Figura 2. Reações de decomposição da furosemida, (a) furosemida, (b) N-furfuril-5-sulfamoilantranílico, (c) ácido 4-cloro-5-sulfoantranílico, (d) ácido 4-cloro-5-amino-sulfamoilantranílico ou saluamina, (e) álcool furfurílico, (f) ácido levulínico (Adaptado da ref. 10).

1.2 QUALIDADE DE FÁRMACOS

Para garantir a eficácia de um medicamento e consequentemente a segurança de seus consumidores é de suma importância que a indústria farmacêutica determine a composição final dos medicamentos comercializados.¹² Para isso, as indústrias

farmacêuticas se baseiam nas monografias presentes em Farmacopéias que informam as propriedades físico-químicas, os métodos de identificação e determinação da quantidade de fármacos, bem como testes para quantificação de impurezas conhecidas.¹³

Para medicamentos sintetizados, as principais impurezas são reagentes de partida, intermediários de reação ou subprodutos da mesma, compostos degradados, bem como solventes residuais. Estes compostos geralmente são identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou eletroforese capilar (EC) com detector de UV.^{13,14}

Caso os processos de obtenção de um medicamento, como extração ou rotas de síntese, sejam modificados, novas impurezas podem não ser identificadas ou mesmo quantificadas pelos métodos indicados pelas Farmacopéias Internacionais.^{13,14} A ICH (*International Conference on Harmonization*) também indica a necessidade de revalidação de um método caso haja modificações na síntese de uma substância, na composição final do produto ou no procedimento analítico.¹⁵ Após o caso da heparina contaminada nos Estados Unidos, em que mais de 100 pessoas morreram, iniciou-se uma discussão para adotar métodos alternativos para avaliar a qualidade de medicamentos.¹⁶ Foram propostas as espectroscopias: Raman, Infravermelho próximo e raios X, todos necessitando de tratamento estatístico dos dados obtidos.¹³

1.2.1 Método Oficial

Segundo a 5ª edição da Farmacopéia Brasileira (FB 5) é possível identificar furosemida por três técnicas diferentes: a espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), a espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV) e através de uma reação química de identificação. Para as análises de IV, comparam-se as intensidades de absorção nos mesmos comprimentos de onda da furosemida e da Substância Química de Referência (SQR). Da mesma forma, no método de UV, as soluções de furosemida e da SQR devem apresentar as mesmas bandas de máxima de absorção nos comprimentos de onda: 228, 271 e 333 nm. Outro método de identificação descrito na FB 5 é feito através da reação química da furosemida com os reagentes indicados, a solução de furosemida ao final da reação deve apresentar a coloração vermelho-violeta.¹⁷

Para identificar furosemida em comprimidos utiliza-se o preparo de doseamento descrito na FB 5, sendo utilizado hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ como solvente. Ao

final das diluições descritas nos procedimentos é obtida uma solução de concentração $2,42 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de furosemida. Em seguida, são obtidos os espectros de absorção no ultravioleta na faixa de 220 a 320 nm para a SQR e para o medicamento, ambos devem apresentar absorções máximas em 228 e 271 nm. Para quantificar a furosemida em medicamentos comercializados na forma de comprimidos são comparadas as absorvâncias da SQR e dos comprimidos em 271 nm. Sendo que os valores permitidos para a furosemida devem se encontrar entre 90 e 110%.¹⁷

1.2.2 Métodos alternativos

Nos últimos anos, os métodos desenvolvidos para quantificação de furosemida se concentraram em amostras de fluídos biológicos como sangue e urina. Estes métodos foram propostos com o objetivo principal de aplicação na análise antidoping. Outros estudos apresentam métodos em que é possível analisar furosemida em formulações farmacêuticas e urina/sangue. A seguir são citados alguns trabalhos mais recentes em que são propostos métodos alternativos de quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas, sempre com o objetivo de obter resultados de forma mais rápida, sensível e reduzindo o custo da análise.

Os métodos eletroquímicos desenvolvidos para análise de fármacos são sensíveis, de baixo custo e o tempo de análise é menor quando comparado a outras técnicas. Entretanto, os eletrodos apresentam problemas de adsorção de analito na sua superfície. Uma das formas de contornar o problema tem sido utilizar eletrodos construídos a partir de nanotubos de carbono. Este tipo de eletrodo apresentou em outros estudos baixos limites de detecção, sensibilidade, bem como resistência à adsorção de analito na sua superfície. Por estes motivos, foi desenvolvido um método eletroquímico para análise de furosemida em formulações farmacêuticas e urina utilizando este tipo de eletrodo. O método desenvolvido utilizou a voltametria diferencial de pulso para quantificação de furosemida, relacionando a concentração com a corrente. Neste estudo a adsorção na superfície do eletrodo foi observada apenas para concentrações de furosemida acima de $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, resultando em um desvio da linearidade. Para avaliar a interferência de excipientes, foram adicionados os excipientes mais comuns com concentração de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Alguns destes excipientes, como ácido láctico, dextrose, goma acácia e sacarose não interferiram no resultado. Enquanto

que outros, ácido cítrico, glucose, ácido oxálico e amido, resultaram uma diferença de 10% nas quantificações.¹⁸

Segundo a ICH, os estudos de estabilidade do fármaco são importantes para a validação de um método analítico. Considerando essas recomendações, um novo método analítico utilizando CLAE com detecção de arranjo de diodos foi proposto para quantificação de furosemida e espironolactona em formulações farmacêuticas contendo ambos os fármacos. Parâmetros cromatográficos como os tampões e sua concentração, solventes orgânicos para fase móvel e sua composição foram testados para posterior determinação dos fármacos. As curvas analíticas dos fármacos foram construídas com sete pontos variando de 40 a 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,99 para ambos os fármacos. A especificidade do método foi testada com relação aos excipientes presentes no medicamento e a produtos de degradação de ambos os fármacos. A precisão do método foi avaliada com relação à repetitividade e à precisão intermediária, em ambos os casos o percentual de desvio padrão relativo é abaixo de 1,2%. A exatidão foi avaliada através dos resultados obtidos após adição de quantidades conhecidas de furosemida e espironolactona a um placebo em três concentrações distintas, sendo obtidas porcentagens de recuperação entre 98 e 100,6%. Para a robustez, foram modificados: a vazão ($\pm 0,1$ mL/min), a composição da fase móvel, o pH do tampão ($\pm 0,2$) e colunas cromatográficas de diferentes lotes. Os resultados obtidos (97,9 – 102,1%) não foram afetados por tais variações. As soluções preparadas foram guardadas em duas temperaturas diferentes, 2–5°C e temperatura ambiente, a fim de avaliar a sua estabilidade. Em ambos os casos, os resultados obtidos não indicaram diminuição nas quantidades de furosemida e espironolactona, e as soluções se revelaram estáveis por até 48h. Considerando os resultados descritos acima, os autores afirmaram que o método é recomendado para controle de qualidade, pois é específico, linear, preciso, exato e robusto, além de indicar a estabilidade das amostras em soluções.¹⁹

Apesar de métodos baseados na CLAE necessitarem de longos tempos de análise e altos custos, estes ainda são os métodos mais escolhidos para quantificação de diuréticos. No estudo de Youm em 2013, a CLAE foi a técnica analítica considerada para quantificação de furosemida em medicamentos. As condições para análise cromatográfica foram ajustadas de forma a minimizar caudas nos picos, ou seja, reduzir a assimetria do pico cromatográfico. Alguns fatores como a razão entre acetonitrila/tampão de fosfato e o valor do pH foram testados. Após definir os valores

dos parâmetros que apresentaram resultados com maior eficiência, o método foi validado seguindo as recomendações da ICH. Os resultados dos testes para as figuras de mérito foram satisfatórios segundo os valores descritos pela ICH.²⁰

Ademais, nos estudos acima e nos artigos de revisão são abordadas as influências dos excipientes mais comuns presentes na formulação farmacêutica contendo furosemida. Já influência de substâncias similares à furosemida, como seus produtos de decomposição e a presença de outras impurezas não é abordada em todos os estudos citados e seus efeitos na quantificação através dos métodos alternativos são desconhecidos.^{1,10,18,19,20}

1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) está baseada no fenômeno de ressonância, para isso o núcleo observado deve apresentar spin diferente de zero, sendo assim ativo no RMN. Sob o efeito de um campo magnético, os momentos magnéticos dos núcleos se alinham em duas populações (α e β) para um núcleo com spin igual a $\frac{1}{2}$. A população de α apresenta uma energia levemente menor e, portanto uma população maior de spins que a de β . Este pequeno excesso pode ser simplificado para uma representação de magnetização resultante (M_0) que é considerada para descrever o comportamento dos vetores do momento magnético após um pulso de radiofrequência.²¹

Semelhante a outras espectroscopias, o desenvolvimento da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) estava inicialmente voltada para interpretação dos espectros com objetivo de identificação da estrutura molecular.²² Nesse sentido, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (^1H) e de carbono (^{13}C) se estabeleceu com o objetivo principal de se determinar as estruturas moleculares de produtos sintéticos ou naturais. Outros núcleos como flúor (^{19}F), nitrogênio (^{15}N) e fósforo (^{31}P) também são úteis nessas determinações.¹⁶ A RMN em estado líquido utiliza principalmente o isótopo de hidrogênio (^1H) que possui abundância de aproximadamente 100% e tempos de relaxação mais curtos, gerando assim espectros com sinais finos e boas razões de sinal/ruído.²³

Inicialmente o caráter quantitativo da RMN se restringia ao cálculo do número de hidrogênios que originavam os sinais em um espectro. Somente após o estudo de

Hollis em que foi possível quantificar aspirina, fenacetina e cafeína em formulações farmacêuticas por RMN, vários outros estudos surgiram com o mesmo objetivo.²

Diferentemente de outras técnicas, a RMN de maneira geral dispensa métodos de separação de todos componentes presentes na amostra para analisar quantitativamente o analito de interesse. Desta forma os solventes residuais, excipientes, produtos degradados e outras impurezas em medicamentos podem ser identificados e posteriormente quantificados. Por outro lado, a RMN necessita de solventes deuterados, apresenta limites de detecção elevados e requer quantidades maiores de amostra para análise quando comparado a outras técnicas.²⁴

No caso de falsificações em que há a adição intencional de impurezas ou diluentes, a qualidade do medicamento pode ser aferida com facilidade, pois cada componente adicionado apresentará sinais característicos nos espectros obtidos utilizando o núcleo de ^1H ou ^{13}C . Desta forma é possível afirmar que uma impureza orgânica desconhecida dificilmente não seria detectada por RMN, e que este pode ser considerado um detector universal capaz de identificar falsificações em medicamentos.^{16,25}

Apesar dos altos limites de detecção, a RMN é suficiente para avaliar fármacos desde que os sinais estejam bem separados dos sinais relativos a outros componentes. Para melhorar a detecção da RMN utilizam-se técnicas automáticas de homogeneização do campo magnético, sondas criogênicas, tubos para quantidades reduzidas de amostra e/ou espectrômetros de campos magnéticos maiores ($>400\text{MHz}$).²⁶ Considerando os campos magnéticos mais elevados para maior sensibilidade, estes também implicam em um aumento na separação de sinais muito próximos entre si, além de facilitar a detecção de componentes minoritários presentes nas amostras.²⁷ Além disso, a RMN é uma técnica capaz de revelar outras impurezas antes desconhecidas acompanhadas de sua informação estrutural e não destrutível, permitindo que a mesma amostra seja analisada posteriormente por outra técnica.^{25,28}

A RMN também é indicada para avaliar a qualidade de medicamentos, pois apresenta diversas vantagens com uma única análise e não é uma técnica otimizada para um tipo de síntese ou processo de obtenção do medicamento. Com esta técnica é possível identificar e quantificar o fármaco bem como as impurezas presentes, sendo esta a principal aplicação da Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq). A composição isomérica e os solventes residuais também podem ser avaliados a fim de

controlar a produção do medicamento, e também é possível estudar a degradação de um composto.^{13,28,29}

Assim, esse método já consta em algumas farmacopéias internacionais. Na Farmacopéia Européia é utilizado a RMN, porém somente com o objetivo de identificar os fármacos presentes no medicamento. Diferente da primeira, a Farmacopéia Americana possui descrições para análises qualitativas e quantitativas por RMN. Qualitativamente são avaliados os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e a elucidação da molécula. Quantitativamente são indicados o método absoluto com padrão interno e o método relativo.¹⁴ A seguir alguns exemplos de quantificação de fármacos por RMNq serão abordados.

1.3.1 Breve histórico

Os primeiros estudos de RMNq são da década de 70. Em um destes estudos Turczan (1972) propôs a quantificação de aminofilina, uma mistura de teofilina e etilenodiamina com razão 2:1. Neste período foi detectado um erro relacionado com a solubilidade do complexo de prata teofilina obtido conforme o ensaio descrito pela Farmacopéia Americana. Por este motivo novas metodologias precisavam ser propostas para determinação de teofilina. Além disso, eram necessários dois procedimentos de determinação: um para etilenodiamina e outro para teofilina. Neste estudo os espectros de RMN de ¹H das amostras foram obtidos a 42°C, sendo preparadas com padrão interno (álcool t-butílico) e água deuterada. Substâncias adicionais foram necessárias para evitar a precipitação da teofilina e a complexação da etilenodiamina com metais pesados. Os autores compararam a RMNq com o método oficial, indicando que o novo método é mais simples, rápido e específico. Além disso, a RMNq permitiu a quantificação de ambos os componentes em uma única análise, diferentemente do método oficial que necessitava de duas titulações para um mesmo medicamento.³⁰

Em 1986, Eberhart propôs uma nova substância para padrão interno na análise de medicamentos contendo uma mistura de aspirina, fenacetina e cafeína. O novo padrão interno, 1,3,5-trioxano, deveria ser mais barato, estável, inerte, com pureza satisfatória e, principalmente, apresentar um sinal no espectro de RMN de ¹H não sobreposto com os sinais de interesse. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro de 60 MHz utilizando o núcleo de hidrogênio, clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência para a escala em 0 ppm. Os

resultados indicaram melhor precisão e exatidão, quando comparados a estudos anteriores.³¹

Na década de 90, Casy publicou um artigo onde o principal objetivo dos autores era diferenciar o fármaco captopril de suas principais impurezas: epicaptopril e um análogo dissulfureto de captopril. No estudo foram testados três solventes diferentes, D₂O, D₂O–NaOD e DMSO-*d*₆. Em um dos solventes, DMSO-*d*₆, foi possível visualizar três dubletos bem resolvidos, cada um sendo atribuído a um dos três componentes que se desejava diferenciar por RMN.³² Apesar dos sinais estarem bem resolvidos e possivelmente serem adequados para quantificação por RMNq, essa possibilidade não foi abordada pelos autores.

Posteriormente, Forshed em 2005 teve o interesse em quantificar a principal impureza do paracetamol, o 4-aminofenol por RMNq. Neste estudo, os sinais de interesse da impureza estão sobrepostos com os sinais de satélites de ¹³C do paracetamol, que foram utilizados como padrão interno. Misturas conhecidas de paracetamol e 4-aminofenol foram utilizadas para montar um modelo não linear de calibração multivariada e os resultados indicaram que mesmo com a sobreposição de sinais é possível quantificar a impureza presente.²⁴

Em 2002 no estudo de Shamsipur, foi discutida a quantificação de produtos de degradação e outras impurezas para penicilinas, que são medicamentos antimicrobianos. O novo método por RMNq foi proposto devido à instabilidade das penicilinas em solventes orgânicos, que geram diferentes produtos de degradação. A presença de impurezas pode diminuir a eficácia do fármaco e causar efeitos colaterais ou reações alérgicas. Os métodos recomendados para as quantificações incluem extração seguida de análise por CLAE, possuindo como desvantagens a grande quantidade de amostra utilizada e as diferentes condições experimentais para determinação de cada impureza. Assim o método por RMNq utilizou ácido maleico como padrão interno em D₂O e foi validado utilizando misturas sintéticas dos compostos para posterior aplicação às amostras reais. Os resultados mostraram que os métodos RMNq e CLAE não são estatisticamente diferentes.³³

Nos estudos citados acima foi possível perceber a preocupação crescente com a presença de impurezas nos medicamentos. Após a morte de pessoas devido à presença de sulfato de condroitina supersulfatada (OSCS) na heparina, a RMN foi indicada como técnica para revisão da Farmacopéia Americana. Neste caso, escolheu-se o núcleo de hidrogênio para identificações e quantificações.¹⁶ A heparina não fracionada de cálcio

ou sódio é obtida da mucosa intestinal de bois, porcos ou ovelhas. O fármaco final pode conter ácido acético, ácido sulfúrico, sulfato de condroitina supersulfatada (OSCS), além de sulfato de dermatano (SD) que indica a qualidade da purificação do medicamento. Considerando as impurezas citadas, SD, metanol e etanol, foi proposto um método usando a RMNq. Através do sinal do grupo acetil da heparina é possível identificar a quantidade 0,1% de OSCS no medicamento e determinar a quantidade de heparina e SD no fármaco. Nesta proposta, os sinais dos compostos foram facilmente assinalados pela obtenção individual dos espectros. Na Figura 3 temos um exemplo de espectro de RMN de ^1H de heparina contendo algumas das impurezas citadas. O espectro foi obtido em um espectrômetro de 300 MHz, numa temperatura de 80°C e utilizando D_2O como solvente.³⁴

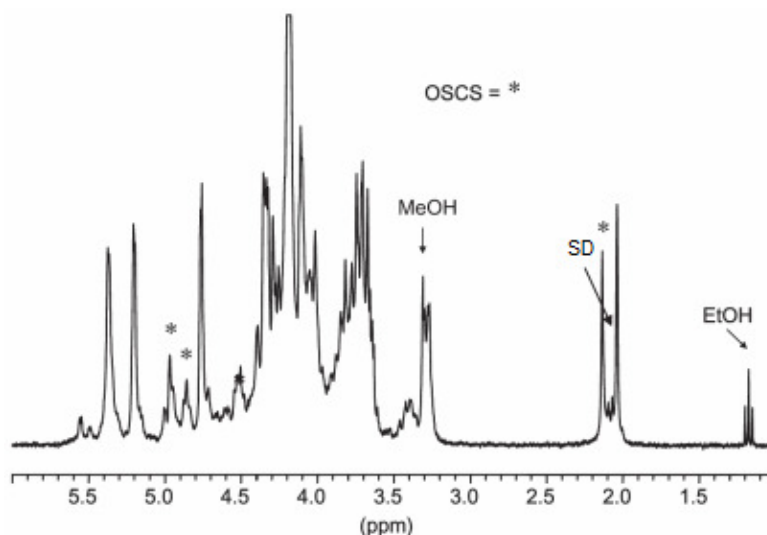


Figura 3. Heparina contaminada contendo OSCS marcado com asterisco, metanol (MeOH), sulfato de dermatano (SD) e etanol (EtOH) (Adaptado da ref. 16).

1.3.2 Preparo de amostra

Uma das vantagens da RMNq é o preparo de amostra simples, onde basta dissolver a amostra no solvente deuterado adequado.²⁸ Caso haja componentes não solúveis, um procedimento extra de filtração ou centrifugação é suficiente para finalizar o preparo de amostra.^{30, 31, 35}

Para medicamentos comercializados na forma de comprimidos, há na literatura procedimentos de como realizar o preparo de amostra. Os comprimidos devem ser macerados e uma quantidade conhecida solubilizada em 0,8–3,0 mL de solvente

deuterado. Devido a não solubilização de alguns excipientes presentes nos medicamentos, o frasco contendo a mistura é levado para a centrifugação. Após estes procedimentos é feita a retirada de uma alíquota de 0,4–0,6 mL do sobrenadante para posterior análise por RMN.^{30,35}

Além da centrifugação, é possível substituir este procedimento por uma filtração utilizando uma pipeta Pasteur e algodão. Assim é possível transferir a solução filtrada diretamente para um tubo de RMN.³¹ Para fármacos comercializados em cápsulas, basta retirar a quantidade necessária de sólido e a cápsula pode ser descartada.³³

Para o preparo de outros tipos de amostras, há na literatura recomendações de preparo nas mais diversas matrizes como mistura reacional, fluídos biológicos, células e tecidos de animais ou vegetais, líquidos viscosos e amostras ambientais.¹² A seguir serão discutidos fatores que influenciam na quantificação de fármacos na RMNq.

1.3.2.1 Solventes, aditivos e pH da amostra

A escolha do solvente deve ser feita cuidadosamente, afinal a complexidade do espectro, a dispersão dos sinais e formato da linha podem ser modificados pela simples troca do solvente utilizado.³⁶ Além disso, os deslocamentos químicos dos hidrogênios variam devido a interações moleculares do solvente com o analito, dentre elas as ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, efeitos estéricos e anisotropia.³⁷

Outros fatores a serem considerados na escolha do solvente, diz respeito aos sinais das impurezas. Todos os solventes deuterados possuem água dissolvida ou são higroscópicos, portanto o sinal da água pode sobrepor com sinais de interesse.^{36,38} Além deste sinal, o solvente pode apresentar sinais referentes a prótons residuais. Na Figura 4 é possível observar os prótons devido às impurezas citadas acima para dimetilsulfóxido e acetona deuterados. Em ambos os casos, os deslocamentos químicos de tais sinais podem ser encontrados em tabelas e a sobreposição de sinais pode ser evitada.³⁸

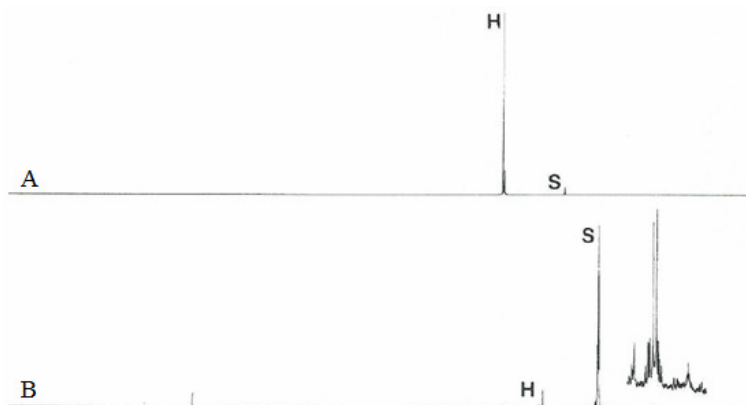


Figura 4. Espectros de RMN – ^1H de solventes deuterados: (a) dimetilsulfóxido e (b) acetona. A letra H indica o sinal de água residual (HOD) e a letra S o sinal de prótons residuais do solvente (Adaptado da ref. 38).

Quando os sinais dos componentes de interesse estão sobrepostos no espectro de RMN, as opções para sua separação são limitadas. Isso porque além de sinais bem resolvidos, a RMNq também requer que o analito seja completamente solúvel no solvente ou mistura de solventes selecionados.^{16,36} Entretanto, é possível selecionar solventes aromáticos, que alteram os deslocamentos químicos devido à anisotropia magnética, ou misturas de solventes. Porém, para obter as alterações de deslocamento é necessário que o analito possua um dipolo natural.¹⁶ Na Figura 5 temos um exemplo de como os deslocamentos químicos de quatro compostos é afetado pelas diferentes misturas de solventes deuterados utilizados no preparo de amostra, sendo possível observar que o problema inicial de sobreposição de sinais é solucionado.

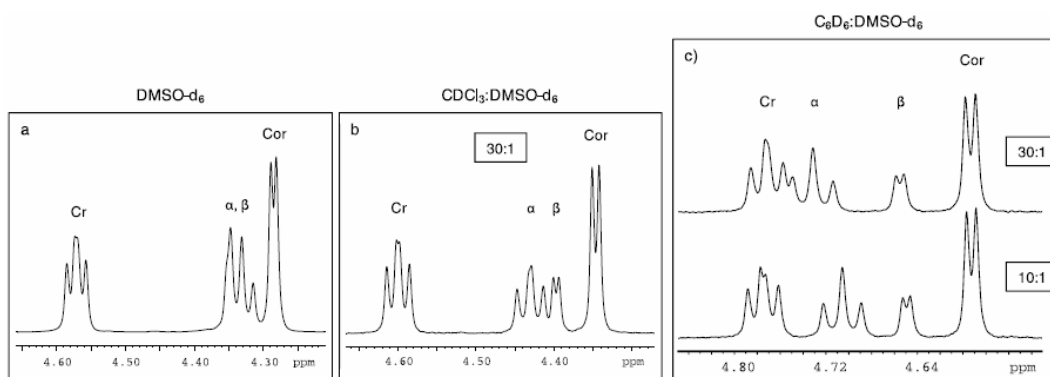


Figura 5. Influência do solvente deuterado nos deslocamentos químicos de: Cr (Diidroergocristina), α (α -Dihidroergocriptina), β (β -Dihidroergocriptina) e Cor (Diidroergocornina) (Adaptado da ref. 36).

Quando uma mistura de solventes é necessária, o segundo solvente pode ser um solubilizante que garanta a solubilização completa do analito. Entretanto a mistura de

solventes deuterados pode dificultar os ajustes do equipamento de RMN, como o *lock* e a homogeneização do campo.³⁶ Caso a mistura a ser analisada apresente enantiômeros em sua composição, estes compostos apresentam espectros de RMN idênticos. Para quantificar a razão molar dessas moléculas é necessário adicionar solventes quirais ou agentes complexantes.³⁹

Outra forma de alterar os deslocamentos químicos é adicionando-se ciclodextrinas, agentes de solvatação e reagentes lantanídeos.¹³ Os últimos podem produzir diferenças grandes nos deslocamentos devido a seus elétrons desemparelhados.¹⁶ Apesar de reagentes paramagnéticos produzirem alargamento de banda, lantanídeos como európio, itérbio e prosedímio são satisfatórios para esse tipo de aplicação. Porém, o alargamento de banda está relacionado com o campo magnético utilizado ao quadrado. Para campos mais elevados, a utilização desses reagentes implica em um maior alargamento de banda.¹⁶

Caso as opções acima não resultem em uma melhora na dispersão dos sinais no espectro, outra opção é utilizar um núcleo diferente do próton. Núcleos como ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P , além de dispersarem os sinais em janelas espectrais maiores geralmente apresentam uma quantidade de sinais reduzida.²⁹ Entretanto, a sensibilidade e a abundância de tais núcleos devem ser observadas.²¹

Para aminas e ácidos carboxílicos, sua protonação e desprotonação, respectivamente, podem introduzir cargas ao sistema e desta forma alterar os deslocamentos químicos.¹⁶ A alteração dos deslocamentos pode ocasionar a sobreposição de sinais, bem como alterações nos tempos de relaxação.²⁹ Caso a alteração nos deslocamentos seja problemática, um tampão deve ser utilizado para manter o pH da amostra constante.¹² Também é possível obter a separação de sinais para ácidos ou bases ajustando-se o pH da amostra a ser analisada.¹³

É importante ressaltar que apenas após determinado o solvente ou mistura de solventes ideal para análise dos compostos, os parâmetros de aquisição do espectro quantitativo e a pureza do sinal escolhido podem ser definidos. Isso porque estes fatores estão diretamente relacionados com o solvente escolhido.^{16,36}

1.3.2.2 Concentração de sais

As quantificações são influenciadas pela variação da força iônica da solução, isso porque a concentração de sais altera o tempo de relaxação e o deslocamento

químico. Altos valores de força iônica dificultam a sintonia.²⁹ Para solucionar este problema, podem ser utilizados agentes quelantes deuterados ou reduzir a força iônica pela diluição da amostra se possível.²⁹ Procedimentos adicionais de preparo de amostra também podem ser úteis para reduzir a concentração de sais.¹²

1.3.3 Parâmetros de Aquisição

Para a análise quantitativa, a escolha dos parâmetros de aquisição é um fator importante para garantir que os espectros sejam reprodutíveis e não apresentem distorções, mantendo assim a precisão e exatidão das integrações, que estão relacionadas com concentração de analito.^{12,27} A seguir serão discutidos os principais parâmetros de aquisição que devem ser observados em uma análise quantitativa por RMN.

1.3.3.1 Pulso de 90°

A magnetização resultante da amostra (M_0) permanece alinhada com o campo magnético do espectrômetro, ou seja, em equilíbrio, como indicado na Figura 6a.⁴⁰ Para excitar todos os núcleos em uma faixa de radiofrequência, atualmente os espectrômetros utilizam um pulso curto, ou seja, uma perturbação no equilíbrio inicial através de um pulso de radiofrequência. Este pulso curto aplicado está relacionado com o ângulo da magnetização resultante, como mostra a Figura 6b, caracterizando o pulso de 90°.²¹

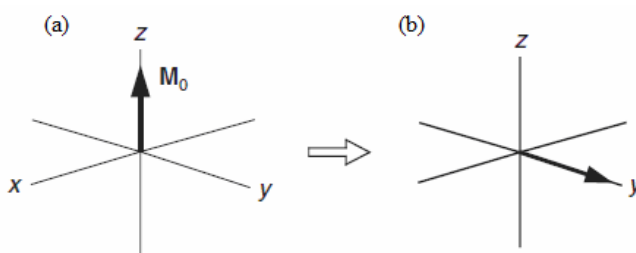


Figura 6. Magnetização resultante (M_0): (a) no eixo z, em equilíbrio e (b) após o pulso de 90° (Adaptada de 21).

Para a obtenção de espectros quantitativos recomenda-se que seja aplicado um pulso de radiofrequência por tempo suficiente para que a magnetização resultante apresente um ângulo de 90°, desta forma é obtido um espectro com o máximo de

intensidade dos sinais. Entretanto, deve-se aguardar o completo retorno ao equilíbrio inicial da magnetização resultante.²¹

Para determinar o pulso de 90° de uma amostra, deve-se adquirir um espectro com um pulso curto e fase ajustada. Em seguida outros decaimentos livres de indução (FIDs) devem ser adquiridos, cada um com um incremento no tempo de excitação da radiofrequência e o tempo de espera da relaxação (RD) adequado. Desta forma é possível visualizar o aumento da intensidade dos sinais e posterior decaimento em um nulo que corresponde a 180°. Assume-se o tempo do pulso de 90° como a metade do valor obtido para o ângulo de 180°, isso porque o último é melhor visualizado nessa seqüência de espectros.⁴⁰

Em toda a janela espectral o pulso deve ser uniforme, além de curto para o caso de espectros adquiridos para o núcleo de hidrogênio (¹H). Espectros de núcleos como flúor (¹⁹F) ou fósforo (³¹P) possuem janelas espectrais mais amplas e podem sofrer distorções em campos magnéticos mais elevados.¹⁶ O uso de pulsos mais curtos, ou seja, ângulos menores que 90° necessitam de um tempo menor para o retorno ao equilíbrio, entretanto são gerados FIDs com uma razão sinal/ruído inferior.²⁷ Para compensar esta redução, é possível diminuir o tempo de espera da relaxação, melhorando a razão sinal/ruído para o mesmo tempo de aquisição do espectro.⁴¹

1.3.3.2 Tempo de relaxação longitudinal (T_1)

O tempo de relaxação corresponde ao tempo em que a magnetização necessita para retornar ao equilíbrio inicial. Esse tempo é decomposto em tempo de relaxação longitudinal (T_1) e tempo de relaxação transversal (T_2).⁴² Para a aquisição de espectros quantitativos, os tempos de relaxação longitudinal dos sinais selecionados devem ser determinados, incluindo o T_1 do padrão interno (PI), caso este seja utilizado. De forma geral, o PI apresenta tempos mais longos que os tempos do analito.¹⁶ Os tempos de relaxação longitudinal (T_1) dos sinais podem ser obtidos através de experimentos de inversão-recuperação.¹⁶

Espectros quantitativos necessitam que seja garantido o completo retorno da magnetização resultante ao equilíbrio antes do pulso seguinte. Para isso deve ser considerada a relação entre o tempo de relaxação (T_1), o completo retorno da magnetização resultante (M_z) e a magnetização resultante no equilíbrio térmico (M_0) descrita na Equação 1.

$$M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1})$$

Equação 1

Utilizando um pulso de 90° , aproximadamente 99,3% da magnetização resultante retorna ao equilíbrio após um tempo de espera de $5T_1$, como indicado na Figura 7. Após determinado os tempos de relaxação (T_1) dos sinais de interesse, o maior valor deve ser multiplicado por um valor entre 5 e 7, desta forma define-se o tempo de espera da relaxação (RD).²⁹ Desta forma os espectros obtidos permitem a posterior quantificação dos compostos presentes evitando distorções nos sinais de interesse.²⁵

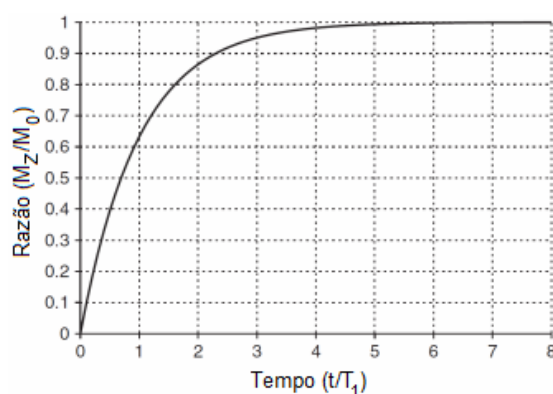


Figura 7. Aumento exponencial da razão M_z/M_0 de acordo com o tempo de relaxação (T_1) (Adaptado da ref. 21).

1.3.3.3 Supressão do solvente

Para diminuir a intensidade de sinais de solvente, várias seqüências de pulsos podem ser utilizadas, como por exemplo: WATERGATE (*water suppression by gradient-tailor excitation*), Pre-SAT (*presaturation*), WET (*gradient and weak RF pulse*) ou NOESY-presaturation.^{12,16}

A supressão do sinal deve ser feita com cautela, o sinal de interesse não deve estar próximo do sinal a ser saturado, pois a maioria dos experimentos citados causa alguma influência na sua intensidade.¹⁶ Os sinais de hidrogênios que interagem com o solvente, realizando trocas podem ser afetados pela pré-saturação.⁴³

O valor de energia do pulso utilizado para a pré-saturação deve ser menor que o valor geralmente utilizado para pulsos de excitação, isso para não resultar em um aquecimento considerável da amostra. Na Figura 8 podemos observar esse menor valor de energia, mostrada na seqüência de pulsos da pré-saturação. Experimentos de

saturação que contêm múltiplos pulsos devem ser evitados, pois a uniformidade da excitação não é garantida.⁴³

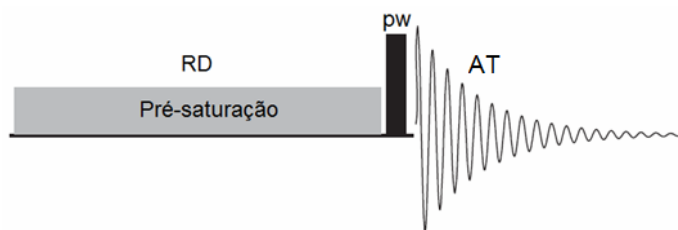


Figura 8. Seqüência de pulsos da pré-saturação, RD= tempo de espera da relaxação, pw= largura do pulso e AT = tempo de aquisição (Adaptado da ref. 21).

Além da saturação do sinal do solvente, os experimentos de pré-saturação podem ser utilizados para quantificação de analitos com diferenças de concentração consideráveis. Primeiramente, obtém-se um espectro para a quantificação do analito majoritário em que o ganho do receptor é definido automaticamente. Posteriormente, saturam-se os sinais de maior intensidade deste analito majoritário e quantifica-se o analito minoritário presente na amostra.²⁹

1.3.3.4 Ganho do receptor

O ganho do receptor (RG) corresponde ao grau em que está ligado o receptor para detecção do decaimento dos sinais.⁴⁴ O valor utilizado deve ser definido inicialmente e mantido constante para todas as análises de todas as amostras do mesmo analito. Valores muito altos podem resultar em distorção da linha de base e valores muito baixos diminuem a razão sinal/ruído e causam perda do sinal do analito.²⁹

Existe uma boa correlação linear entre o aumento da intensidade do sinal e o aumento do valor do ganho do receptor, desta forma o valor deve ser mantido constante para que erros na quantificação sejam evitados.²⁹

1.3.3.5 Temperatura

Alterar a temperatura no momento da aquisição pode gerar melhorias ou problemas no espectro. O aumento da temperatura melhora a resolução do espectro, porém deve-se saber a estabilidade térmica do analito e o ponto de ebulição do solvente utilizado.¹⁶

Utilizar temperaturas mais altas pode deslocar o sinal de água residual do solvente (HOD) para valores menores de deslocamento químico e pode ser uma solução para a sobreposição deste sinal com os sinais de analitos de interesse.¹⁶

Caso sejam utilizados valores de temperatura diferentes da temperatura ambiente deve-se manter seu valor constante, pois variações de temperatura afetam os tempos de relaxação.²⁹ Além disso, gradientes de temperatura geram correntes de convecção que formam gradientes de concentração e conseqüentemente distorções no campo magnético.³⁸

1.3.3.6 Sinal/ruído

Na RMN, os sinais obtidos devido ao ruído acumulam de forma mais lenta que os sinais oriundos dos hidrogênios presentes na molécula.³⁸ Sendo assim o ruído é inevitável e a adição de transientes é uma forma de melhorar a razão sinal/ruído do espectro, a adição infinita de transientes em tese levaria o ruído tender a zero.¹²

Para obter integrações precisas, a razão sinal/ruído (S/R) deve ser observada. Caso seja utilizado o núcleo de ¹H a razão deve ser maior que 250:1, assim garantem-se análises com desvios-padrões menores que 1%.¹⁶ Deve-se escolher preferencialmente um singlete para as quantificações porque a razão sinal/ruído é maior para esta multiplicidade, um multiplete terá um valor menor de razão S/R mesmo que corresponda ao mesmo número de hidrogênios e conseqüentemente tenha a mesma área que um singlete.²⁴

Como citado anteriormente, o aumento do número de transientes (NS) melhora a razão S/R de um espectro. Caso seja obtido um espectro de hidrogênio com S/R de 130:1 e NS = 4, deve-se aumentar o número de transientes de forma que dobre o valor da razão S/R. Para isso o número de transientes deve ser quadruplicado, pois o sinal aumenta com o número total de transientes (NS) e o ruído aumenta \sqrt{NS} .^{38,21}

1.3.4 Processamento dos espectros

Fatores que alteram a precisão na integração de áreas e conseqüentemente a quantificação de um analito devem ser observados. As correções de fase, linha de base, o intervalo de integração e as funções janelas utilizadas devem ser considerados e otimizados para garantir a precisão das quantificações.^{13,25}

Adicionar zeros ao final do decaimento livre de indução (FID) melhora a resolução digital do espectro, geralmente recomenda-se dobrar o valor dos pontos utilizados para obter o espectro e não mais que este valor.^{16,24} As diferenças podem ser visualizadas no espectro sem adição de zeros, Figura 9a, e no espectro com adição de zeros duplicando o número de pontos, Figura 9b.³⁷ Caso o FID tenha decaído até próximo de zero, aumentar o tempo de aquisição (AT) resultaria apenas em acúmulo de ruído. Desta forma, adicionar zeros contribui para reduzir o tempo de aquisição, pois a adição pode ser feita após o término da análise.³⁸

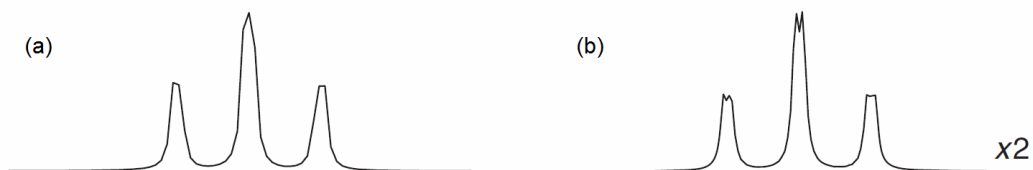


Figura 9. Efeito da adição de zeros ao final do FID, (a) sem adição e (b) número de pontos duplicado pela adição de zeros (Adaptado de 21).

Da mesma forma que a adição de zeros, a predição linear e as funções janela são aplicadas no FID, ou seja, antes da transformada de Fourier. A predição linear tem como objetivo alterar partes danificadas do FID. Caso o interesse seja fazer quantificações, os primeiros pontos dos dados são reconstruídos. Este processamento de dados fundamenta-se no fato de que cada ponto pode ser expresso pela combinação de pontos anteriores.²⁷

Existem várias opções de funções matemáticas que podem ser aplicadas ao FID da amostra antes da transformada de Fourier (FT). Essas funções, também chamadas funções janela podem melhorar o espectro.¹² A primeira parte do FID é onde se encontra a informação dos picos do espectro. Multiplicar o FID por uma função exponencial negativa (*line broadening*) nesta parte implica em melhorar a razão sinal/ruído.^{24,38} Entretanto, a utilização de altos valores para *line broadening* alarga os picos dificultando a integração para o caso de picos muito próximos.¹⁶ Recomenda-se para o processamento de espectros com fins quantitativos que os FIDs sejam multiplicados por valores de *line broadening* de 0,3 a 1,0 Hz.²⁹

Depois de aplicada a transformada de Fourier deve-se considerar as correções de fase e linha de base, bem como a área integrada do sinal selecionado. As correções de fase e de linha de base são importantes para obter um formato de linha adequado e os artefatos presentes no espectro podem ser as maiores fontes de erros para análises

quantitativas.^{12,16} As integrações sofrerão mínimas distorções com o ajuste cuidadoso da fase, e os resultados serão mais reprodutíveis.⁴⁵

O correto ajuste da linha de base melhora o espectro, bem como a precisão da integração dos picos de interesse que são mais sensíveis a esse tipo de falta de ajuste.¹² Pequenos desvios na linha de base resultam em problemas na qualidade dos resultados.²² Com relação à faixa de integração do pico, geralmente o valor utilizado é obtido após multiplicar a largura do pico a meia altura por um valor arbitrário. Alguns autores recomendam 64 vezes essa largura, outros indicam 20 vezes para ambos os lados e ainda há outros que indicam entre 20 e 30 vezes.^{13,29,47}

1.3.5 Quantificação

Para quantificar um fármaco por RMNq é necessário avaliar os sinais do analito que podem ser utilizados para este fim. O sinal do analito deve estar bem separado de outros sinais oriundos de outros componentes presentes no fármaco como citado anteriormente e o hidrogênio escolhido não deve ser lábil.^{26,33}

As áreas (I) dos sinais selecionados são proporcionais ao número de núcleos (N) que originam o sinal e com os dados de área é possível avaliar o analito quantitativamente. Essa relação entre área e núcleos é representada pela Equação 2, onde c_s é a constante do espectrômetro.^{13,16}

$$I = c_s \cdot N$$

Equação 2

A razão molar de uma mistura de componentes pode ser determinada utilizando-se a área integrada dos sinais selecionados. No caso de uma mistura binária de componentes X e Y, os sinais selecionados devem estar bem separados para a determinação e o número de núcleos referentes a esses sinais deve ser conhecida. Desta forma relaciona-se o número de mols de X e Y, n_x e n_y respectivamente, como mostrado na Equação 3 após rearranjo da Equação 2.^{13,23}

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x}$$

Equação 3

Com a equação descrita acima é possível obter as razões dos componentes de interesse. Porém para determinar a quantidade absoluta de um analito (X) presente em

uma amostra, adiciona-se uma quantidade conhecida de um padrão interno, obedecendo a mesma regra de sinais descrito para o caso de misturas. Mantendo-se essa exigência, conhecendo a massa molecular do analito (M_X) e do padrão interno (M_{Std}) e a massa gravimétrica (W) de ambos é possível utilizar a Equação 4 para determinar a concentração absoluta do analito (P_X) sabendo a concentração do padrão (P_{Std}). Caso a massa molecular do analito seja desconhecida, é possível utilizar o método de adição de padrão para obter resultados quantitativos absolutos.¹³

$$P_X = \frac{I_X \cdot N_{std} \cdot M_X \cdot W_{std}}{I_{std} \cdot N_X \cdot M_{std} \cdot W_X} P_{std}$$

Equação 4

Ao optar pelo uso de um padrão interno (PI), a sua concentração deve ser ajustada de forma que as alturas do padrão e do analito sejam comparáveis. Para evitar contaminações do analito é possível utilizar um padrão externo (PE) em tubos capilares coaxiais pré-calibrados.¹⁶

Na escolha do padrão interno algumas propriedades devem ser consideradas, dentre elas: o PI deve ser completamente solúvel no solvente escolhido, não deve interagir/reagir com o analito, o tempo de relaxação longitudinal (T_1) e a massa molecular devem ser comparáveis a do analito. O PI também deve conter outras propriedades já citadas como ideais nos primeiros estudos de RMNq, além de não ser higroscópico ou volátil.¹⁶

As áreas integradas dos sinais selecionados não podem conter sinais referentes a outros compostos, bandas laterais de rotação ou satélites de ^{13}C . Para garantir a pureza do sinal selecionado, experimentos bidimensionais, como COSY, são suficientes para indicar tal pureza.¹³ As bandas laterais de rotação podem interferir na integração dos sinais, e podem ser eliminadas quando os espectros são obtidos sem rotação da amostra.¹⁶ Estes sinais aparecem como múltiplos da velocidade de rotação utilizada para girar o tubo de RMN, geralmente não mais que dois pares de sinais são visíveis em cada lado do sinal principal.³⁸ Em alguns casos tais sinais, considerados artefatos, podem ter alturas comparáveis a sinais referentes aos componentes em baixa concentração.⁴⁶

As bandas de satélites ^{13}C originam-se de acoplamentos de hidrogênios ligados a átomos de carbono. Estes correspondem a 0,55% da área do próton correspondente e suas áreas podem ser subtraídas das áreas dos picos de interesse ou modelos de calibração solucionam o problema.²⁴ Outra forma de eliminar os satélites de ^{13}C é pela

irradiação no centro da faixa do carbono, entre 100–110 ppm, durante o período de aquisição do espectro de RMN de ^1H .⁴⁵

Além das formas de quantificação citadas acima, que envolvem o uso de um padrão interno ou externo, é possível quantificar por RMN construindo uma curva de calibração externa. A curva é construída utilizando a área do sinal escolhido e a concentração do analito. Utilizando a equação obtida pela regressão da curva é possível determinar a concentração desconhecida do analito em amostras reais. Caso a matriz da amostra seja muito complexa, não é possível utilizar a curva de calibração externa. Assim recomenda-se a adição de padrão para estes casos. Neste método a amostra é dopada gradualmente com quantidades conhecidas de analito e a concentração inicial é determinada por extrapolação da curva analítica.⁴⁸

1.3.6 Análise de variância

A partir de dados obtidos em triplicata para uma curva analítica é possível fazer uma análise de variância (ANOVA). Neste tipo de análise assume-se que os erros ocorrem somente em Y. Desta forma a variância total pode ser dividida em: variância devido à regressão ou modelo e variância devido aos resíduos. Por sua vez, os resíduos podem ser divididos em duas partes: uma com origem nos erros aleatórios (Erro Puro) e outra oriunda da falta de ajuste do modelo (Falta de Ajuste). Com as Somas Quadráticas de cada fonte de variação e seus respectivos graus de liberdade, calcula-se a Média Quadrática e completa-se a tabela de ANOVA, utilizando as fórmulas da Tabela 1.⁴⁹

Tabela 1. ; Fórmulas utilizadas nos cálculos da tabela de ANOVA, onde \bar{Y} =média global, \bar{Y}_i =média do nível, \hat{Y}_i =valor estimado, Y_{ij} =valor experimental, p =número de parâmetros do modelo, n =número de replicatas no total e m =número de níveis.

Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (g.l.)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$SQ_R = \sum(\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$p-1$	$MQ_R = SQ_R/p-1$
Resíduos	$SQ_r = \sum(Y_{ij} - \hat{Y}_i)^2$	$n- p$	$MQ_r = SQ_r/n-p$
Falta de Ajuste	$SQ_{Faj} = \sum(\hat{Y}_i - \bar{Y}_i)^2$	$m-p$	$MQ_{Faj} = SQ_{Faj}/m-p$
Erro Puro	$SQ_{EP} = \sum(Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$n-m$	$MQ_{EP} = SQ_{EP}/n-m$
Total	$SQ_T = \sum(Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$n-1$	–

Após a calcular as média quadráticas da tabela de ANOVA, espera-se que a maior parte da variância total seja explicada pela regressão utilizada. Quanto ao restante da variância, essa deve ser atribuída a erros, sejam eles sistemáticos ou aleatórios. Ao desenvolver novos métodos, geralmente deseja-se que os valores de resposta (y) se correlacionem linearmente com os valores de concentração do analito (x). Para isso, testa-se a evidência de uma relação linear entre as variáveis aplicando um teste F que utiliza as Médias Quadráticas de Regressão (MQ_R) e de Resíduos (MQ_r), como indicado na Equação 5.⁴⁹

$$F_{\text{cal}} = \frac{MQ_R}{MQ_r}$$

Equação 5

O valor calculado, F_{cal} , pode então ser comparado com o valor de F_{tab} . Sendo que este último é obtido em uma tabela utilizando os valores de graus de liberdade da MQ_R e MQ_r , respectivamente. Porém o teste F só é válido quando os resíduos não apresentam anormalidades, como mostra a Figura 10. O gráfico de resíduos pode: (a) ser aleatório, (b) mostrar que resíduos aumentam com o aumento de Y indicando dados heteroscedásticos, (c) evidenciar tendências na distribuição dos pontos indicando que o modelo atual não é adequado e (d) auxiliar na identificação de valores discrepantes.

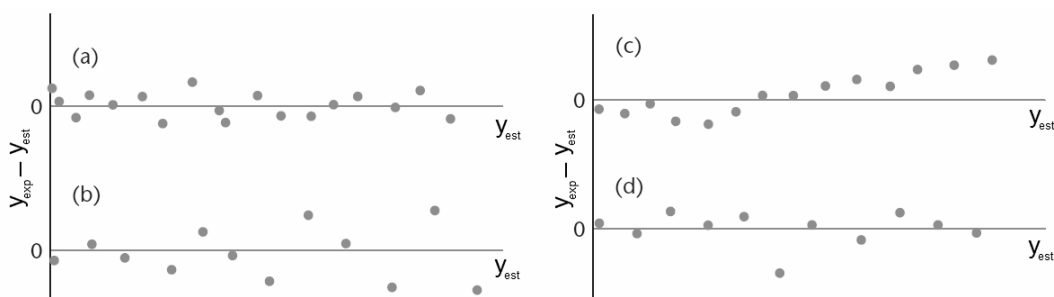


Figura 10. Exemplos de gráficos de resíduos: y_{exp} é o valor medido experimentalmente e y_{est} é o valor estimado (Adaptado da ref. 50).

Similarmente ao teste de F aplicado para a MQ_R e a MQ_r , podemos aplicar novamente o teste F para as médias quadráticas da Falta de Ajuste e do Erro Puro para avaliar o ajuste do modelo aos dados com a Equação 6. A MQ_{Faj} pode ter seu valor reduzido com a melhora do modelo, o mesmo não acontece para a MQ_{EP} .⁴⁹

$$F_{\text{cal}} = \frac{MQ_{\text{Faj}}}{MQ_{\text{EP}}}$$

Equação 6

Através dos dados obtidos em triplicata e utilizados para calcular as somas e médias quadráticas da tabela de ANOVA é possível calcular outros dados importantes para validação e aplicação do método desenvolvido. A inclinação e o intercepto, bem como seus intervalos de confiança são calculados a partir das Equação 7–10.⁴⁹

$$b_1 = \frac{\sum(X_i - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y})}{\sum(X_i - \bar{X})^2}$$

Equação 7

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$$

Equação 8

$$s_{b1} = \frac{\sqrt{MQ_r}}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{Y})^2}}$$

Equação 9

$$s_{b0} = \sqrt{MQ_r} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sqrt{\sum(X_i - \bar{Y})^2}}}$$

Equação 10

1.3.7 Validação

Para validar um novo método é necessário avaliar várias figuras de mérito, como especificidade, seletividade, robustez, exatidão, precisão, linearidade, limites de detecção e quantificação. Algumas dessas figuras de mérito são determinadas em ordem diferente do convencional para a RMNq, outras são definidas em equações similares a equações utilizadas por outras técnicas e há ainda aquelas cuja determinação é questionável.

Segundo a ICH, um método é considerado seletivo quando é possível determinar o analito na presença de outros componentes sem sofrer interferências e, é considerado específico quando é capaz de determinar o mesmo analito na presença de impurezas como produtos de degradação. Diferentemente de outras técnicas, a RMNq requer que a especificidade e seletividade sejam definidas antes do início das análises quantitativas.²⁹ No caso, a avaliação da pureza do sinal escolhido como descrito anteriormente.

Inserindo pequenas modificações no preparo de amostra ou nos parâmetros de aquisição, os resultados obtidos devem ser similares aos dados obtidos sem as modificações. Desta forma avalia-se a robustez de um método, ou seja, sua capacidade de manter o resultado inalterado mesmo após modificações pequenas, porém consideráveis.²⁹

Com a análise de precisão do método, podemos indicar a reprodutibilidade dos resultados através da concordância entre eles. Já a exatidão é definida como o quão próximo o resultado experimental médio (x_m) está do valor tomado como verdadeiro (x_v). Para testar a precisão e a exatidão do método desenvolvido por RMNq pode-se utilizar as recomendações descritas na literatura, como coeficientes de variação menores que 5% para precisão utilizando a Equação 11.^{51,52} Atualmente os espectrômetros de RMN são muito estáveis e é possível obter áreas reprodutíveis com variações menores que 1% para amostras estáveis seladas em tubos de RMN.²⁹ A exatidão do método pode ser obtida em termos de erro relativo em porcentagem, através da Equação 12.⁵²

$$CV = \frac{S}{X_m} 100\%$$

Equação 11

$$E_r = \frac{X_m - X_v}{X_v} 100\%$$

Equação 12

Quando observados os parâmetros de aquisição e processamento de dados, a RMNq é uma técnica linear por natureza. Sua linearidade está relacionada com a habilidade do método em relacionar a concentração do analito com a área integrada de forma linear. Entretanto, é necessário que a linearidade da curva analítica obtida por RMNq seja verificada semestralmente.²⁹

Apesar da RMNq se basear na quantificação de componentes majoritários, os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são determinados para que seja possível quantificar componentes em níveis traço nas amostras quando necessário.⁵³ Ambos os limites citados dependem do campo magnético do espectrômetro utilizado para as quantificações, da razão sinal/ruído, da complexidade do espectro e da largura dos picos.²⁹

Devido ao formato Lorentzianos dos sinais nos espectros de RMN, os limites LOD e LOQ não podem ser definidos através da razão S/R. Após a construção de uma curva analítica é possível expressar ambos os limites em termos de desvio-padrão (σ) e inclinação da curva (S), como mostra a Equação 13 para LOD e para o LOQ substitui-se o valor de 3.3 por 10 como indica a Equação 14.⁵⁴

$$LOD = 3.3 \frac{\sigma}{S}$$

Equação 13

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

Equação 14

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo desenvolver um método de quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas na presença de seus excipientes e quaisquer outras impurezas que estiverem contidas nos medicamentos adquiridos no comércio local, utilizando-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear.

2.2 Objetivos específicos

- Obter parâmetros de aquisição a serem utilizados em método de quantificação de furosemida, utilizando-se a técnica de RMN.
- Construir uma curva analítica com padrão externo.
- Avaliar as figuras de mérito.
- Comparar os resultados obtidos pelo método descrito na Farmacopéia Brasileira e por Ressonância Magnética Nuclear quantitativa.
- Quantificar furosemida em amostras reais de fármacos.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLVENTES

Foram utilizados hidróxido de sódio em lentilhas (NaOH) com pureza de 97%, acetato de sódio (NaAcO.3H₂O) com pureza de 99%, ambos os reagentes são da marca VETEC. Para o preparo das soluções aquosas foi utilizada água destilada e deionizada. No preparo de amostra para robustez foi utilizado acetona grau espectroscópico com pureza de 99,8% da marca MERCK e dimetilsulfóxido com pureza 99,9% da marca Synth. Os solventes deuterados utilizados no preparo de amostra, D₂O, acetona-*d*₆ e dimetilsulfóxido-*d*₆, possuíam 99,9% de deutério da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.).

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

No preparo das amostras foram utilizados: uma balança analítica com quatro casas decimais da Celtac Mod. FA2104N, uma centrífuga da Celm Mod. LS-3PLUS, uma micropipeta de volume variável (10-100 µL) da Digipet, um rotaevaporador da Marconi modelo MA120 e uma bomba de vácuo da Quimis modelo Q214M2.

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em um espectrômetro Varian, modelo Mercury Plus 300 MHz, com tubos de RMN da Norell de 5 mm. Os espectros de UV foram obtidos em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50 Conc.

3.3 PREPARO DE AMOSTRA

Vários preparos de amostra foram testados visando não comprometer a análise de RMN da furosemida devido a sua sensibilidade a luz, temperatura e atmosfera. O preparo de amostra 1, consistia em pesar e macerar 5 comprimidos, cada um contendo 40 mg de furosemida. Todo o pó obtido da maceração foi pesado e dissolvido em aproximadamente 20 mL de acetona. A solução preparada foi filtrada a vácuo e o filtrado recolhido. Em seguida a solução filtrada foi transferida para um balão com auxílio de 20 mL de acetona e evaporou-se o solvente em um rotaevaporador à 45°C. O sólido obtido foi utilizado para análise por RMN, adicionando-se 0,6 mL de acetona

deuterada. Os mesmos procedimentos descritos para o medicamento foram repetidos para a furosemida pura, desta forma determinou-se a ocorrência de degradação da furosemida devido ao preparo de amostra.

No preparo de amostra 2, um comprimido do medicamento foi pesado e em seguida macerado. Pesou-se uma quantidade de sólido de forma que o preparo final continha 10 mg de furosemida. As amostras foram solubilizadas na menor quantidade de acetona deuterada e em seguida filtradas com o auxílio de um filtro de seringa. Novamente o mesmo procedimento foi feito para a furosemida pura a fim de determinar o grau de degradação devido ao preparo de amostra utilizado.

O preparo de amostra 3 incluiu a mistura de solvente não-deuterado e solvente deuterado. Foram pesados, antes e depois de macerados, 3 comprimidos de um medicamento contendo 40 mg de furosemida. Os comprimidos macerados foram solubilizados em acetona e a mistura obtida filtrada diretamente para um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado posteriormente com acetona. Para análise foi retirada uma alíquota de 0,5 mL da solução preparada e transferida para um tubo de RMN contendo 0,1 mL de acetona deuterada. O mesmo procedimento foi repetido utilizando uma solução de NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solvente e água deuterada.

Para o preparo de amostra 4 foram considerados os resultados obtidos para o preparo de amostra 3 e o procedimento descrito na literatura para formulações farmacêuticas.³⁵ Um comprimido contendo 40 mg de furosemida foi pesado e posteriormente macerado. O pó obtido foi pesado e adicionado uma alíquota de 0,2 mL de uma solução aquosa de NaOH a 1 mol L^{-1} . A mistura foi homogeneizada e centrifugada, uma alíquota de 50 μL foi retirada para posterior diluição com água deuterada em um tubo de RMN completando o volume para 0,6 mL.

No preparo de amostra 5 foram considerados o procedimento descrito acima e as modificações necessárias para analisar as formulações farmacêuticas. O procedimento consistia em pesar a furosemida pura nas quantidades necessárias para construção da curva analítica e para validação do método sem tratamento prévio. O medicamento contendo furosemida foi pesado antes de macerado e posteriormente para análise do equivalente a 13,3 mg. Em seguida adicionou-se a mistura de solventes descrita na Tabela 2 para a furosemida pura e para as formulações farmacêuticas testadas. Para as massas de furosemida pura, a mistura foi homogeneizada por simples agitação e o volume total transferido para tubos de RMN. As formulações farmacêuticas foram

agitadas vigorosamente e em seguida centrifugadas por 2 minutos a 3000 rpm. Uma alíquota de 600 μL foi retirada do sobrenadante para posterior análise do fármaco na presença de excipientes solúveis na mistura de solventes.

Tabela 2. Alíquotas dos solventes utilizados no preparo de amostra 5. NaAcO = acetato de sódio.

Solventes	Furosemida pura	Formulações farmacêuticas
D ₂ O com DSS	540 μL	720 μL
NaOH a 1 mol L ⁻¹	50 μL	67 μL
NaAcO a 0,74 mol L ⁻¹	10 μL	13 μL

Para comparação dos resultados obtidos para formulações farmacêuticas em RMNq, também foram preparados amostras com base na descrição da FB 5. Foram pesados 2 comprimidos e posteriormente macerados, do pó formado foram pesados o equivalente a 20 mg de furosemida na formulação farmacêutica. Após a adição de 30 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹, a mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, a mistura de 30 mL foi transferida para um balão de 50 mL e teve seu volume completado. Após homogeneização da solução, contendo componentes não solubilizados, a solução foi filtrada. Do filtrado foi retirado uma alíquota de 0,5 mL e diluído em um balão de 25 mL com NaOH 0,1 mol L⁻¹. As mesmas diluições foram preparadas utilizando 20 mg de furosemida pura, para comparar as absorvâncias medidas em 271 nm em um espectrofotômetro de UV. Utilizou-se como branco, a solução aquosa de NaOH 0,1 mol L⁻¹ preparada para fazer as diluições das soluções.

3.4 DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO

Os tempos de relaxação longitudinal (T_1) da furosemida foram determinados pelo experimento de inversão-recuperação. Neste experimento a magnetização resultante sofre a perturbação de dois pulsos: um correspondendo ao ângulo de 180° e outro de 90°. O tempo entre estes dois pulsos (τ) aumenta gradativamente, e quando este valor é muito longo ($\tau \gg 5T_1$) obtêm-se espectros com o máximo de intensidade do sinal. Através de algoritmos disponíveis no software do espectrômetro e das intensidades dos sinais após cada ciclo de pulsos são determinados os tempos de relaxação (T_1) pelo ajuste à Equação 15, fornecendo uma tabela com os deslocamentos químicos dos sinais, suas intensidades e o T_1 em segundos.²¹

$$M_t = M_0(1 - 2e^{-\tau/T_1})$$

Equação 15

O valor do tempo de espera da relaxação (RD) foi definido com relação ao tempo de relaxação longitudinal mais longo e os sinais de interesse. Após definido o sinal da furosemida que apresenta o tempo de relaxação longitudinal (T_1) mais longo, definiu-se o valor de RD igual a $5.T_1$, ou seja cinco vezes o valor do T_1 mais longo.²⁹

O tempo do pulso de 90° para a amostra foi determinado de acordo com os procedimentos descritos anteriormente; pela sequência de espectros com diferentes valores de tempo de pulso.⁴⁰ Este parâmetro foi determinado após a obtenção dos tempos de relaxação (T_1) dos sinais, para que fosse utilizado o tempo de espera da relaxação (RD) apropriado.

O valor utilizado no ganho do receptor (RG) é definido a partir da concentração mais elevada preparada para a curva analítica. O espectro de hidrogênio da furosemida é obtido com o ganho do receptor em automático para definir o valor que será utilizado para todas as outras aquisições de amostras em concentrações inferiores.

O número de transientes (NS) é definido com relação à razão sinal/ruído e o tempo total de aquisição do espectro. A razão sinal/ruído deve estar acima de 250:1, como descrito na literatura. Um número de transientes elevado pode ocasionar em um tempo de aquisição muito longo quando comparado a melhora obtida na razão sinal/ruído.

3.5 AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO

A faixa de concentração da curva analítica foi determinada pela menor massa de furosemida utilizada para preparar a solução final que apresenta no espectro um valor da razão sinal/ruído acima de 250:1 e pela maior massa completamente solúvel no solvente escolhido. Considerando a literatura, a curva analítica foi obtida de forma a conter no mínimo 5 pontos igualmente espaçados e obtidos em triplicata.¹⁶

As figuras de mérito da validação, seletividade e especificidade, foram testadas antes do desenvolvimento do método através da aquisição de espectros de RMN de ^1H e ^1H - ^1H COSY da furosemida pura e das formulações farmacêuticas. A robustez foi avaliada pela substituição da solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com D_2O e H_2O por acetona e dimetilsulfóxido deuterados. As soluções padrão de furosemida foram

preparadas em triplicata para cada solvente e a proporção de solvente deuterado e não deuterado foi mantida. As soluções padrão de exatidão e precisão foram preparadas seguindo a recomendação da literatura.⁵¹ Os limites de detecção e quantificação foram determinados considerando os cálculos descritos na literatura, ou seja, com base no desvio padrão e na inclinação da curva analítica.⁵⁴

O método desenvolvido foi testado na determinação da quantidade de furosemida em medicamentos de cinco marcas diferentes. Os espectros das formulações farmacêuticas foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros determinados para as soluções padrões da curva analítica e das amostras de validação. Os resultados obtidos por RMNq e pelo método oficial, descrito na Farmacopéia Brasileira, para os medicamentos foram comparados.¹⁷

3.6 PROCESSAMENTO E TRATAMENTO DOS DADOS

Para o processamento dos espectros de RMN de ^1H , optou-se por realizar a transformada de Fourier, o ajuste de fase e linha de base e a integração utilizando o software Mestre-C, outros processamentos como funções matemáticas também foram consideradas caso necessárias. O valor de área obtido através deste software foi utilizado na construção da curva analítica, bem como as análises seguintes pertinentes à validação e aplicação do método. Os espectros bidimensionais foram processados utilizando o software ACD/NMR Processor Academic Edition. A análise das áreas obtidas através dos espectros quantitativos em cada etapa incluiu a utilização de planilhas de Excel. Desta forma, além da curva analítica, foram obtidos os erros, limites de confiança e teste F relacionados aos resultados, bem como a análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos após as análises das soluções de validação e aplicação também foram tratados com auxílio das planilhas de Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATRIBUIÇÃO DE SINAIS

O espectro de RMN de ^1H da furosemida pura foi obtido e seus sinais foram atribuídos como mostra a Figura 11 e Tabela 3. Os hidrogênios de anéis aromáticos ou heteroaromáticos encontram-se entre 6 e 9 ppm segundo a literatura.⁵⁵ Isso corresponde a todos os hidrogênios da furosemida com exceção dos hidrogênios de números 4, 5, 8 e 9. Sabe-se que os hidrogênios do anel aromático 6 e 7 não acoplam com nenhum hidrogênio e por este motivo geram simpletos, observados em 6,94 e 8,34 ppm, respectivamente.

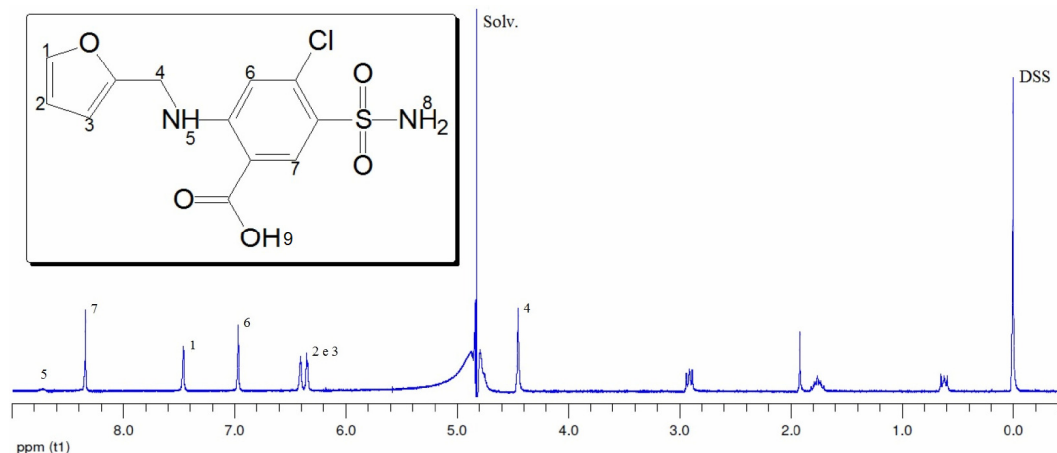


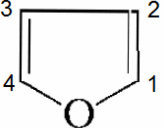
Figura 11. Espectro da furosemida pura em D_2O e NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, acompanhada da sua estrutura molecular com hidrogênios numerados para indicação no espectro. O DSS indica a referência da escala em 0,0 ppm. Solv. = sinal do solvente saturado.

Tabela 3. Resumo dos dados obtidos para atribuição de sinais da furosemida.

Número	δ (ppm)	J (Hz)	Integração	Multiplicidade
1	7,46	0,6 e 1,8	1	Dupleto de dupleto
2	6,40	1,8 e 3,1	1	Dupleto de dupleto
3	6,34	0,6 e 3,1	1	Dupleto de dupleto
4	4,43	-	2	Simpleto
5	8,77	-	$\sim 0,1$	Tripleto
6	6,94	-	1	Simpleto
7	8,34	-	1	Simpleto

Os outros sinais entre 6 e 9 ppm que geram multiplicidades diferentes de simpletos e podem ser atribuídos aos hidrogênios do grupo furano. Na literatura é possível encontrar uma tabela que indica os valores das constantes de acoplamento do anel furano como mostra a Tabela 4.⁵⁵

Tabela 4. Constantes de acoplamento do anel furano (Adaptado da ref. 55).

Tipo	J (Hz)		J típico
	$J(1-2)$	1,3 – 2,0	1,8
	$J(2-3)$	3,1 – 3,8	3,6
	$J(1-3)$	0,0 – 1,0	~0

Tendo como base os valores de J indicados na Tabela 4, foram avaliadas as constantes de acoplamento obtidas e os sinais dos hidrogênios do grupo furano foram atribuídos. Comparando os valores das constantes de acoplamento obtidas para a furosemida pura na Tabela 3 e as faixas apresentadas na Tabela 4 é possível indicar os hidrogênios do grupo furano.

O hidrogênio de número 5 deveria aparecer no espectro como um tripleto e integral referente a um hidrogênio. Entretanto, devido à mistura de solventes utilizada para análise da furosemida, a labilidade desse próton e a sequência de pulsos Pre-Sat, o sinal foi detectado com uma intensidade muito baixa. O hidrogênio 8 e 9 também não são visualizados no espectro obtido. Estes hidrogênios são lábeis e sofrem com a troca do hidrogênio por deutério, assim seus sinais se apresentam com intensidade muito reduzida e outras vezes não podem ser visualizados, como descrito na literatura.⁵⁶

Para complementar a atribuição de sinais e confirmar os acoplamentos do anel furano foi obtido um espectro de ^1H - ^1H COSY da mesma amostra utilizada para atribuição de sinais da furosemida pura que está apresentado na Figura 12. Neste espectro bidimensional, fica evidente que o simpleto em 4,4 ppm é corretamente indicado como hidrogênio 4, pois este sinal mostra um acoplamento com o tripleto de baixa intensidade atribuído ao hidrogênio 5. Também é possível visualizar o acoplamento dos hidrogênios do grupo furano e a ausência de acoplamentos dos hidrogênios 6 e 7, confirmando a atribuição de sinais indicada previamente.

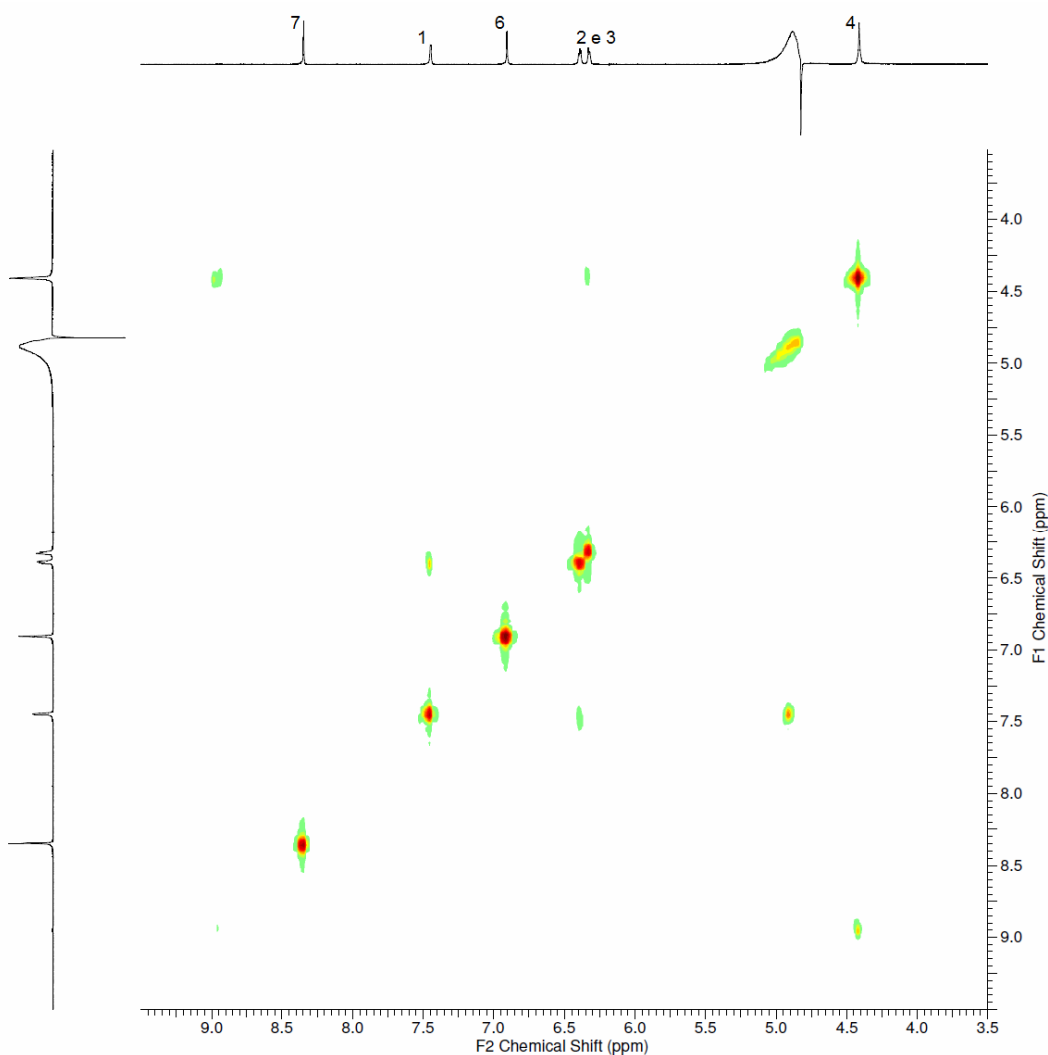


Figura 12. Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY da furosemida pura em D_2O e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.2 PREPARO DE AMOSTRA E PUREZA DE SINAIS

Para que sejam obtidos bons espectros de RMN em solução é necessário que o analito de interesse esteja completamente dissolvido no solvente escolhido. No caso da furosemida, a literatura afirma que esta é muito solúvel em dimetilformamida, acetona e soluções aquosas de hidróxido de metais alcalinos.³ Essas informações foram consideradas para o desenvolvimento dos preparos de amostra 1-5 para quantificação da furosemida, com os resultados descritos a seguir.

O preparo de amostra 1 se mostrou problemático, pois, após os procedimentos, a furosemida não solubilizou completamente na acetona deuterada. Na Figura 13 encontra-se o espectro de RMN referente a este primeiro preparo de amostra, onde é

possível constatar que parte dos 20 mg de furosemida pura foi degradado, pois vários novos sinais podem ser visualizados em: 6,9; 3,8; 3,7; 2,5 e 1,2 ppm.

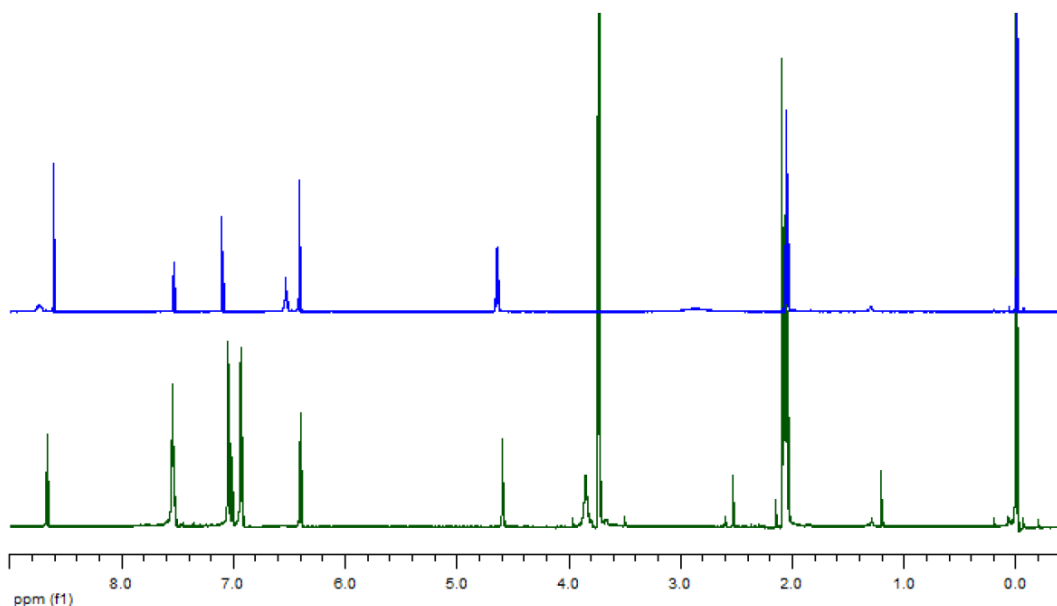


Figura 13. Espectros de RMN de ^1H : furosemida pura (azul) e furosemida após o preparo de amostra 1 (verde), ambos em acetona- d_6 .

Ao testar o preparo de amostra 2, o filtro de seringa apresentou mudança nas características físicas, o objeto transparente se tornou opaco e camadas do filtro se desprenderam do mesmo. Assim foi constatada a incompatibilidade do filtro com o solvente proposto. Por este motivo, o preparo de amostra 2 foi descartado para os testes seguintes com a formulação farmacêutica e a furosemida pura.

Considerando os resultados obtidos com os preparos de amostra 1 e 2, foram propostos os preparos de amostra 3-5 que estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Aliquotas dos solventes utilizados nos preparos de amostra 3-5 das formulações farmacêuticas.

Preparo de Amostra	Solventes comuns	Solventes deuterados
3	0,5 mL de acetona	0,1 mL de acetona- d_6
	0,5 mL de NaOH 0,1 mol L $^{-1}$	0,1 mL de D $_2$ O
4	50 μL de NaOH 1 mol L $^{-1}$ 10 μL de NaAcO 0,74 mol L $^{-1}$	540 μL de D $_2$ O
5	13 μL de NaAcO 0,74 mol L $^{-1}$ 67 μL de NaOH 1 mol L $^{-1}$	720 μL de D $_2$ O

Devido à baixa solubilidade da furosemida em água, algumas adaptações foram necessárias para análises de RMN em solução. A presença de solvente não-deuterado nos preparos de amostra 3 a 5 resultou na escolha de uma sequência de pulsos em que o sinal intenso da água seria reduzido por saturação (Pre-Sat). Os resultados do preparo de amostra 3 indicaram que, após os procedimentos, não houve degradação do fármaco nas amostras de furosemida pura e do medicamento. Entretanto, o espectro obtido apresentou uma baixa razão sinal/ruído, aproximadamente 40:1. Para aumentar este valor de S/R, optou-se por utilizar uma quantidade menor de solvente não-deuterado na nova proposta de preparo de amostra, como demonstrado na Tabela 5.

Considerando a quantidade de solventes deuterados disponíveis, optou-se por testar somente D₂O contendo DSS, referência da escala (0,0 ppm), como descrito pelo preparo de amostra 4. Os espectros obtidos das formulações farmacêuticas foram comparados com os espectros obtidos da furosemida pura, afinal ambas as amostras deveriam conter aproximadamente 10 mg de furosemida. Entretanto as intensidades dos sinais se mostraram muito diferentes, o espectro da formulação farmacêutica indicou, através de cálculos posteriores, que havia apenas metade da quantidade esperada, ou seja, 5 mg de furosemida. Acredita-se que não foi possível solubilizar completamente a quantidade de furosemida presente no fármaco com o preparo de amostra 4.

Por este motivo, optou-se por desenvolver o preparo de amostra 5. As mudanças nos procedimentos visavam garantir a solubilização completa da furosemida presente na formulação farmacêutica. A alíquota retirada da mistura homogeneizada e posteriormente centrifugada continha a proporção de solução aquosa de NaOH e D₂O similar à quantidade do preparo de amostra 4. Quando comparado os preparos de amostra 3 e 5, o último apresentou uma melhora considerável no valor da razão sinal/ruído e solubilização completa da furosemida, sendo escolhido como preparo de amostra definitivo para construção da curva analítica, validação do método e análise de furosemida em formulações farmacêuticas.

Como citado anteriormente, a seletividade e especificidade são figuras de mérito avaliadas durante a validação de um método. Porém, para a RMNq é importante primeiramente garantir a pureza do sinal que será utilizado para quantificação do analito, para posteriormente seguir o desenvolvimento do método.

Neste sentido, uma amostra da formulação farmacêutica foi preparada e o espectro obtido nas mesmas condições da furosemida pura. Na Figura 14 é possível

visualizar os espectros obtidos da furosemida pura em azul e da formulação farmacêutica em verde. Os excipientes presentes no medicamento e solúveis na solução utilizada encontram-se principalmente em valores de deslocamento químico abaixo de 6 ppm. O simpleto atribuído ao hidrogênio 4 da furosemida foi descartado para a quantificação devido à proximidade deste ao sinal que foi saturado, indicado por Solv. na Figura 14. Em geral, os sinais próximos ao sinal saturado sofrem distorções e geram dificuldades na sua integração. Erros na integração devido a tal dificuldade resultam em quantificações errôneas. O segundo motivo para exclusão do sinal para quantificação se deve ao fato do mesmo estar sobreposto com o sinal de um excipiente presente no medicamento.

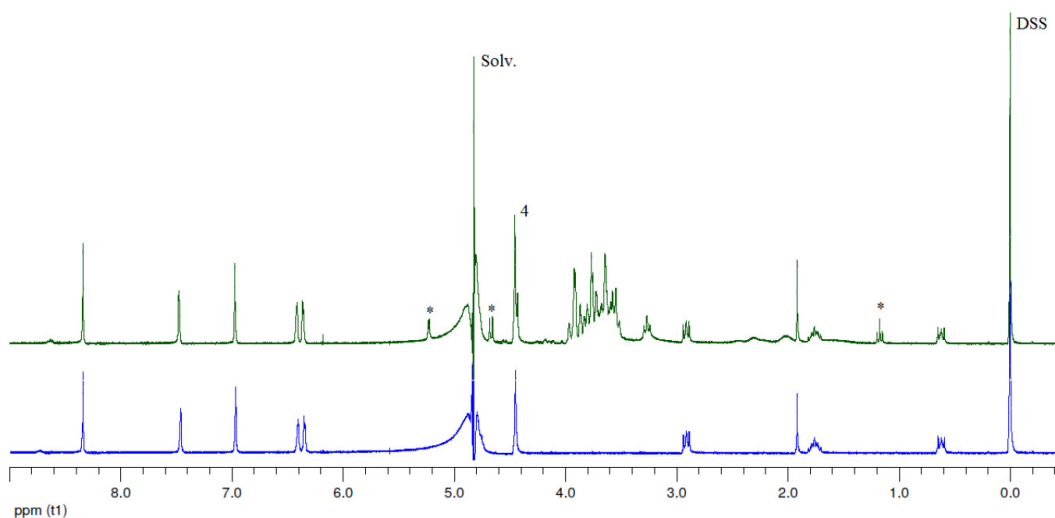


Figura 14. Os Espectros de RMN de ^1H : furosemida pura (azul) e formulação farmacêutica (verde), ambos em solução de NaOH 0,1 mol L $^{-1}$. Os asteriscos indicam os sinais dos excipientes que são solúveis na mistura de solventes, os sinais entre 3 e 4 ppm também são atribuídos aos excipientes.

Assim, os sinais dos hidrogênios 6 e 7 poderiam ser utilizados para a quantificação. A literatura também recomenda a aquisição de um espectro bidimensional para garantir que não há sinais completamente sobrepostos com o sinal escolhido.¹³ Desta forma, a amostra preparada com a formulação farmacêutica para obtenção do espectro de RMN de ^1H mostrado na Figura 14 foi utilizada para obter um espectro de ^1H - ^1H COSY, onde se espera que os simpletos indicados como hidrogênios 6 e 7 não acoplem com nenhum outro sinal, devido à sua localização na estrutura da furosemida e como observado para o espectro de COSY da furosemida pura.

No espectro de COSY obtido para a formulação farmacêutica, apresentado na Figura 15, não é possível visualizar acoplamentos dos hidrogênios 6 e 7. Assim, ambos

os hidrogênios, 6 e 7, tiveram sua pureza garantida por ambos os espectros citados acima. Desta forma, conclui-se que ambos são adequados para quantificação.

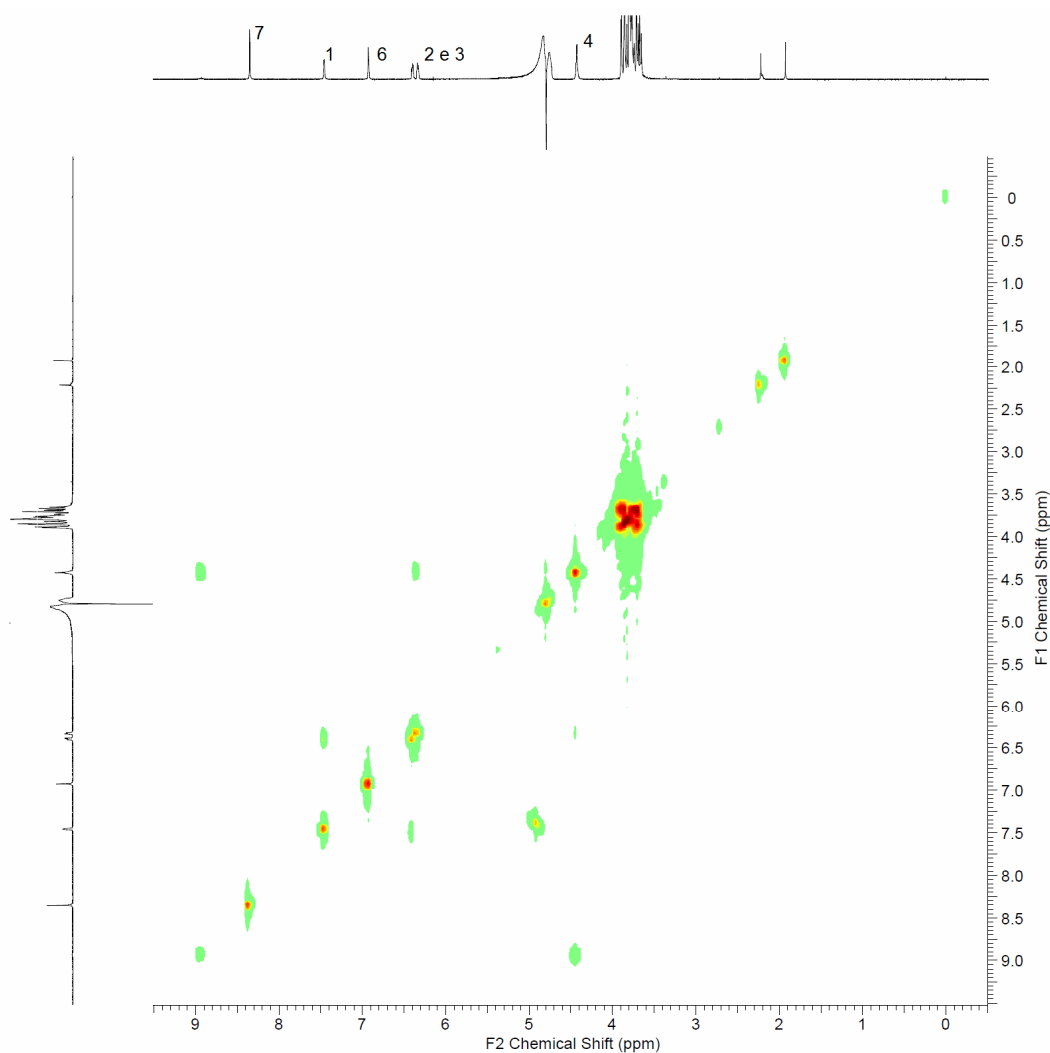


Figura 15. Espectro bidimensional (COSY) da furosemida presente em uma formulação farmacêutica e seus excipientes.

4.3 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DE ESPECTROS

A RMNq requer que alguns parâmetros de aquisição sejam definidos e mantidos constantes durante a obtenção dos espectros. Por este motivo, a mesma amostra preparada para atribuição de sinais foi utilizada para definir os parâmetros de aquisição.

Para determinar o tempo de relaxação longitudinal (T_1) mais longo dentre os sinais de interesse utilizou-se o experimento de inversão-recuperação para obtenção dos tempos dos sinais. Os resultados de tal experimento estão indicados na Tabela 6, onde

os sinais dos hidrogênios 6 e 7, escolhidos para serem utilizados nos experimentos de quantificação, possuem tempos de relaxação T_1 de aproximadamente 1,5 e 7,2 segundos, respectivamente. Desta forma, determinou-se que o tempo de espera da relaxação seja no mínimo 5 vezes o tempo de relaxação T_1 mais longo para garantir o completo retorno da magnetização resultante dos sinais da furosemida.

Tabela 6. Valores dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da furosemida.

Hidrogênios numerados	T_1 (segundos)
1	7,2
2	5,0
3	4,5
4	0,5
6	1,5
7	7,2

Outro parâmetro importante a ser definido é o tempo do pulso de 90° para a amostra. Inicialmente foi obtido um espectro com um tempo de pulso pequeno e sua fase ajustada. Em seguida foram adquiridos 10 espectros com diferentes larguras de pulso e o RD adequado. Desta forma foi possível visualizar o aumento dos sinais bem como seu decaimento até próximo de zero indicando a largura do pulso de 180° e posteriormente os sinais se tornam negativos, como mostra a Figura 16. Obtêm-se o valor do tempo do pulso de 90° a partir da metade do valor do tempo de pulso de 180° , no caso da furosemida o valor foi de $7,8 \mu\text{s}$.

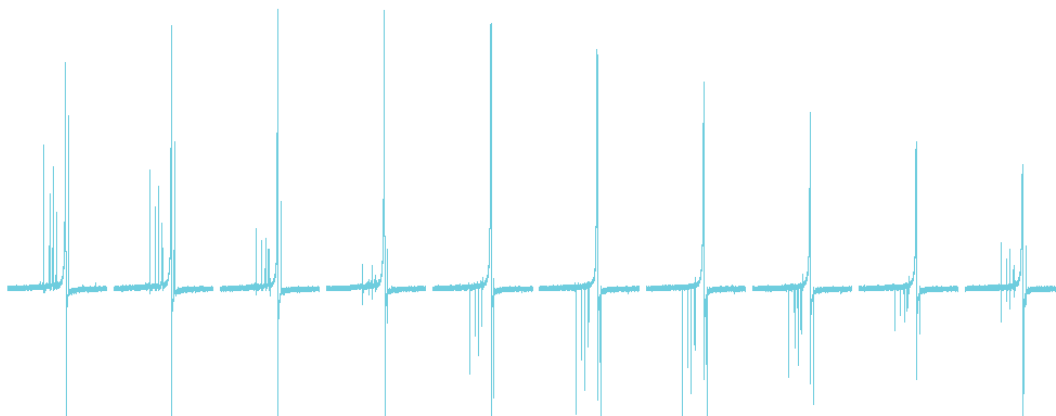


Figura 16. Espectros obtidos no experimento de determinação do tempo do pulso de 90° para furosemida.

De acordo com a literatura sobre RMNq, alterações no valor do ganho do receptor (RG) implicam em alterações na quantificação pela integração da área. Há uma correlação linear entre o aumento da área e o aumento do valor do ganho do receptor. Desta forma um valor ótimo para o ganho do receptor deve ser definido, pois o valor não poderá ser modificado nas aquisições seguintes.

Para o primeiro ponto da curva analítica, menor concentração, os valores de RG são mais altos e há a possibilidade destes mesmos valores não poderem ser utilizados em concentrações mais elevadas devido ao extravasamento do receptor. Neste caso, é orientado que o valor do RG seja definido pela concentração mais elevada da curva analítica, assim o valor do ganho é menor e possível de ser utilizado em qualquer concentração inferior à máxima. A maior concentração de furosemida na curva analítica era de 25 mg mL^{-1} , valor pouco abaixo da concentração máxima. Nessa concentração o software de aquisição do espectro indicou um valor de RG em zero, quando selecionado para definir automaticamente o ganho, valor esse utilizado para todas as amostras.

Outro fator que poderia ter influência nas quantificações seria a sintonia. Na Figura 17 temos dois exemplos de sintonia, um indicando a aparência de uma sintonia correta e outro indicando uma sintonia com problemas em *match* e *tune*. Ao fazer a sintonia das amostras, o ideal é que o resultado final esteja como indica a Figura 17b. As amostras que apresentam problemas na sintonia em *match* e/ou *tune* geram valores de integrações diferenciados como foi possível constatar nos resultados obtidos para as amostras de furosemida.

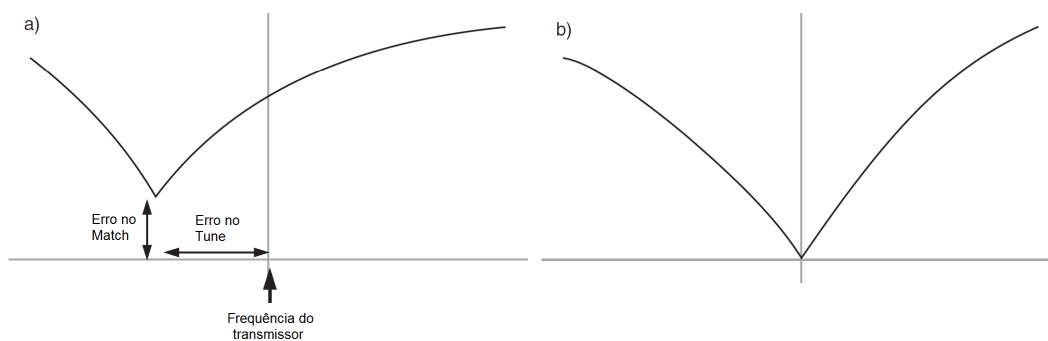


Figura 17. Exemplos de sintonia: (a) sintonia com erros no match e tune e (b) sintonia adequada tanto no match quanto no tune (Adaptado da ref. 21).

Para avaliar a influência da sintonia na integração dos sinais foram obtidos vários espectros da mesma amostra, mantendo-se constantes todos os parâmetros, variando o *tune* de 300 a 301 MHz e mantendo *match* constante. Relacionando a área

integrada do sinal de interesse, hidrogênio 6, e o valor de frequência na sintonia é possível observar uma diminuição do valor da área, como mostra o Figura 18. A razão sinal/ruído também é prejudicada pelas variações no *tune* da sintonia como mostra a Figura 19. Estes resultados indicam que pequenas variações na frequência da sintonia ($\sim 0,2$) são suficientes para causar mais de 10% de erro na integração do sinal de interesse. Para variações na sintonia no sentido de *match*, a variação da área integrada é menos afetada quando comparada às variações de *tune*, porém a razão sinal/ruído também diminui.

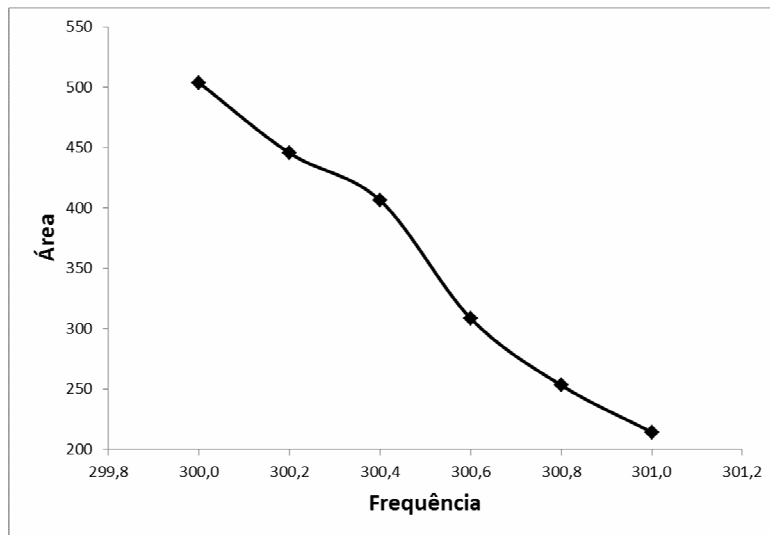


Figura 18. Relação entre a área do sinal de interesse e a frequência no momento da sintonia.

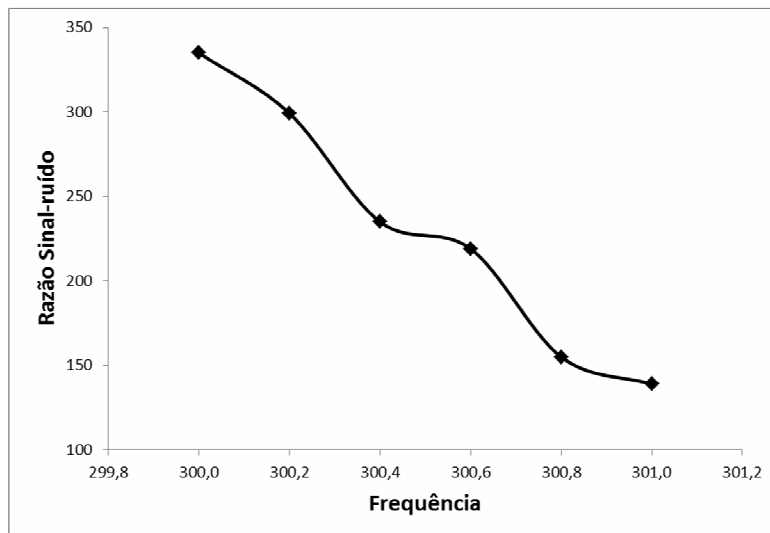


Figura 19. Relação entre a razão sinal/ruído do sinal em 7 ppm e a frequência na sintonia.

Por fim, para cada amostra analisada foram utilizados 16 transientes e 64000 pontos para aquisição dos espectros de RMN de ^1H , totalizando um tempo de análise de aproximadamente 15 minutos, gerando um espectro final com razão S/R acima de 250:1. Nos processamentos de dados foi utilizado o preenchimento com zeros para melhorar a resolução do espectro final, dobrando a quantidade de pontos do FID obtido. Os parâmetros determinados para a aquisição de espectros quantitativos estão resumidos na Tabela 7. Após a transformada de Fourier foram feitos ajustes manuais na fase e na linha de base. Após estes ajustes foi integrado uma faixa constante de 0,15 ppm entorno dos sinais de interesse em 6,94 e 8,34 ppm da furosemida, hidrogênios 6 e 7 respectivamente.

Tabela 7. Valores dos parâmetros de aquisição utilizados para obter os espectros quantitativos.

Parâmetros de aquisição	
Largura de pulso	7,8 μs
Tempo de espera da relaxação	40 s
Ganho do receptor	0
Número de transientes	16
Número de pontos	64000

4.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

A curva analítica foi construída considerando dois fatores: a concentração mínima em que é possível obter uma razão sinal/ruído acima de 250:1 e a concentração máxima em que a furosemida é solúvel na mistura de solventes utilizada.

A primeira concentração mínima testada continha 5 mg (8,3 mg mL⁻¹). Neste caso, duas replicatas apresentaram valores de S/R um pouco menores que o valor sugerido pela literatura. Portanto, concentrações menores apresentariam valores menores S/R. A maior concentração foi preparada contendo 20 mg de furosemida, essa solução estava claramente saturada, sendo possível observar que parte da furosemida não solubilizou. Desta forma foi preparado para concentração máxima uma amostra contendo 15 mg (25 mg mL⁻¹), valor este que permitia igual espaçamento dos outros três pontos presentes na curva analítica: 7,5 mg (12,5 mg mL⁻¹), 10 mg (16,7 mg mL⁻¹) e 12,5 mg (20,8 mg mL⁻¹). Todas as soluções preparadas continham um volume total de 0,6 mL.

Considerando os parâmetros de aquisição, o preparo de amostra e as concentrações mínima e máxima, a 1ª curva analítica foi obtida representada como curva A na Figura 20. A curva A foi obtida através da utilização dos valores de área obtidos pela integração do sinal do hidrogênio 6 em 6,94 ppm e dos valores de concentração das soluções. Entretanto, após a aquisição desta curva o espectrômetro apresentou problemas no detector de sintonia e o mesmo foi substituído.

Devido à troca de um componente eletrônico, as amostras utilizadas para construir a curva A foram analisadas novamente resultando na curva B, como mostra a Figura 20. Desta forma fica evidente a necessidade de checar a curva analítica após a substituição de componentes eletrônicos no espectrômetro. Fator este reforçado pela substituição dos cabos de sintonia e conseqüentemente a diferença observada na construção da curva analítica, indicada como curva C. Todos os pontos de cada curva foram obtidos em triplicata e as curvas ajustadas pelo método dos mínimos quadrados.

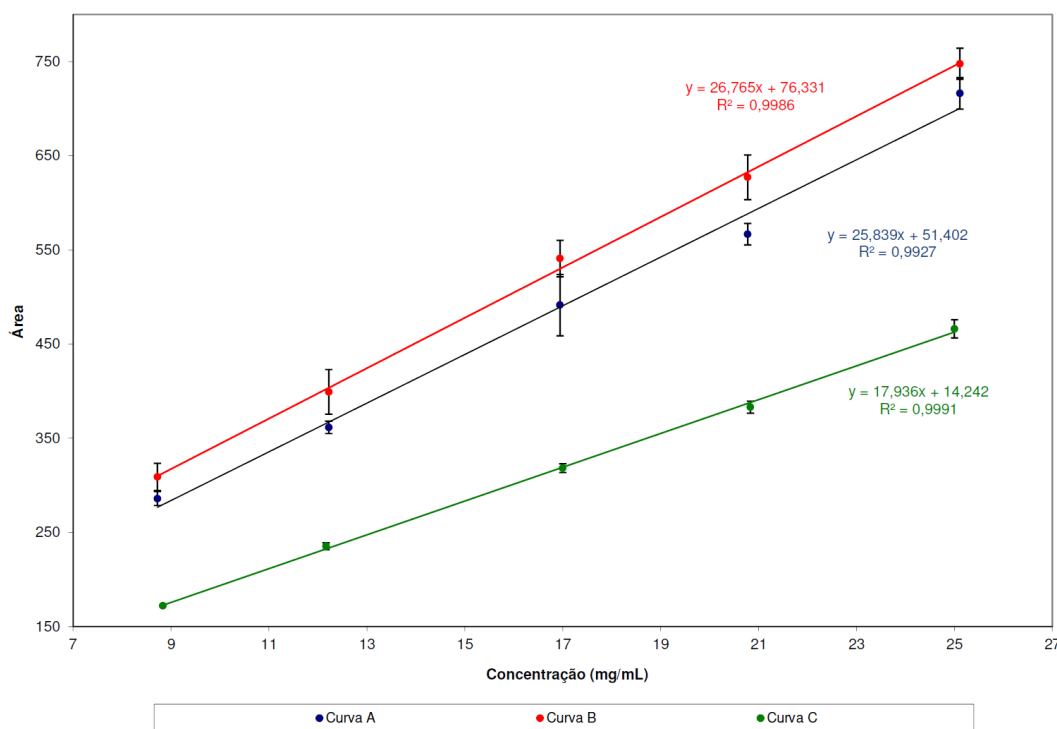


Figura 20. Curvas analíticas obtidas em três momentos diferentes, mostrando o efeito da substituição de componentes eletrônicos. As curvas foram obtidas (A) antes e (B) após a troca de componente eletrônico, e (C) após a troca dos cabos de sintonia.

Na última curva obtida, curva C, seus pontos correspondem a uma média de valores (triplicata). Os valores obtidos em triplicata permitem que seja feito uma análise

de variância (ANOVA).⁴⁹ A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos por RMNq para determinação de furosemida utilizando a área do hidrogênio 6.

Tabela 8. Tabela de ANOVA preenchida a partir dos resultados obtidos para o hidrogênio 6 da furosemida.

Variação	Soma Quadrática (SQ)	g. l.	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$SQ_R = 162605,30$	1	$MQ_R = 162605,30$
Resíduos	$SQ_r = 475,54$	13	$MQ_r = 36,58$
Falta de Ajuste	$SQ_{Faj} = 138,47$	3	$MQ_{Faj} = 46,16$
Erro Puro	$SQ_{EP} = 337,07$	10	$MQ_{EP} = 33,71$
Total	$SQ_T = 163080,84$	14	–

Os mesmos cálculos foram realizados para o hidrogênio 7, cujo sinal também foi indicado como apropriado para quantificação de furosemida por RMN. A Tabela 9 apresenta os dados obtidos para este hidrogênio.

Tabela 9. Tabela de ANOVA preenchida a partir dos resultados obtidos para o hidrogênio 7 da furosemida.

Variação	Soma Quadrática (SQ)	g. l.	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$SQ_R = 170959,44$	1	$MQ_R = 170959,44$
Resíduos	$SQ_r = 598,57$	13	$MQ_r = 46,04$
Falta de Ajuste	$SQ_{Faj} = 215,55$	3	$MQ_{Faj} = 71,85$
Erro Puro	$SQ_{EP} = 383,02$	10	$MQ_{EP} = 38,30$
Total	$SQ_T = 171558,01$	14	–

Em seguida foram calculados os valores de F_{cal} para avaliação da relação linear entre a concentração e a área integrada do sinal, e F_{cal} para indicação de evidências de falta de ajuste do modelo. Os valores de F_{cal} e F_{tab} para os dados do hidrogênio 6 são: 4445,19 e 4,67; respectivamente. Para o hidrogênio 7, os valores de F_{cal} e F_{tab} são: 3712,98 e 4,67, respectivamente. Com $F_{cal} > F_{tab}$ para ambos os sinais, temos evidências estatísticas de que a relação linear entre x e y é significativa no nível de confiança de 95% e a regressão é útil para previsões, pois F_{cal} é 10 vezes maior que o F_{tab} .⁴⁹

Entretanto, os testes F acima somente são válidos quando não há evidências de anormalidade nos gráficos de resíduos. Observando o gráfico de resíduos dos dados

obtidos para o hidrogênio 6 e 7 por RMNq (Figura 21) não é possível constatar a heteroscedasticidade dos dados ou anormalidade. Por este motivo os resultados apresentados acima são válidos.

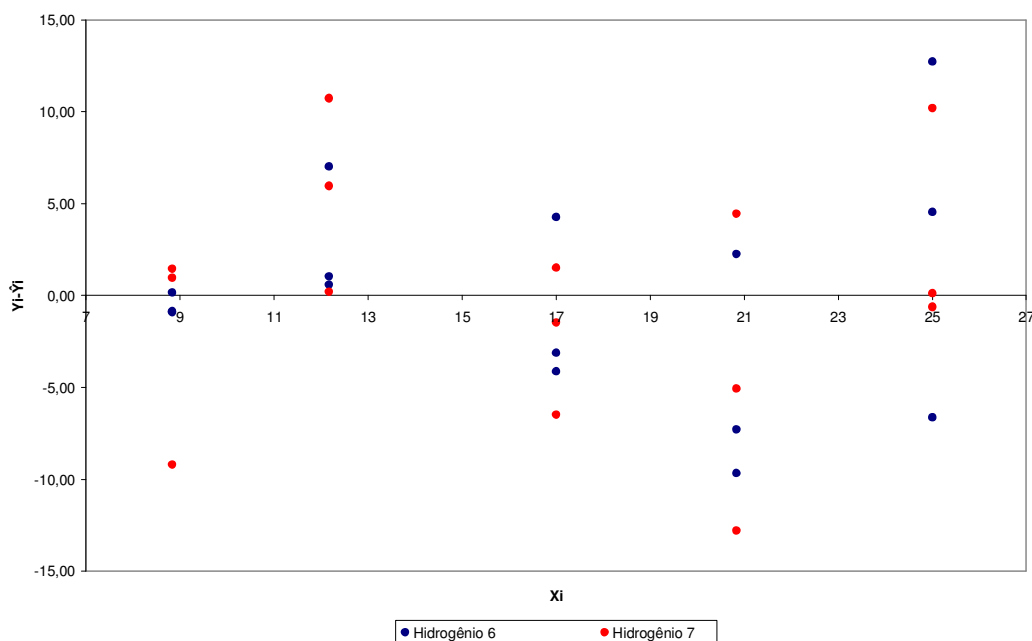


Figura 21. Gráfico de resíduos dos dados obtidos por RMNq para furosemida. Os pontos representam os resíduos do hidrogênio 6 (azul) e hidrogênio 7 (vermelho).

Para constatar evidências de falta de ajuste, foram calculados o F_{cal} para ambos os sinais, hidrogênios 6 e 7. Assim, os valores de F_{cal} para os hidrogênios 6 e 7 são: 1,37 e 1,87, respectivamente. O valor de F_{tab} é o mesmo para ambos os casos: 3,71. O valor de F_{cal} obtido a partir dos dados não é maior que F_{tab} , portanto não há evidências de falta de ajuste para ambos os métodos propostos utilizando os hidrogênios aromáticos da furosemida.

Através dos dados obtidos para os hidrogênios aromáticos da furosemida é possível definir os valores da inclinação (b_1) e intercepto (b_0) da reta, bem como seus intervalos de confiança através das Equações 7-10.⁴⁹ Na Tabela 10 temos a inclinação e o intercepto calculados para ambos os hidrogênios, 6 e 7. Os seus intervalos de confiança também estão indicados. A equação da reta obtida para o hidrogênio 6 foi utilizada para os cálculos de concentração das amostras de validação e aplicação.

Tabela 10. Inclinação e intercepto para ambos os hidrogênios aromáticos da furosemida.

Hidrogênio	Inclinação	Intercepto
6	17,936±0,58	14,242±10,31
7	18,391±0,30	12,747±5,36

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Das diversas figuras de mérito que devem ser testadas na validação, a especificidade e a seletividade foram testadas antes do desenvolvimento do método uma vez que a RMNq exige que o sinal de interesse esteja livre de interferentes para ser considerado nas quantificações. Neste tópico trataremos de outras figuras de mérito como: robustez, precisão, exatidão e os limites de detecção e quantificação. Sendo que todas serão avaliadas com base nos resultados obtidos para o hidrogênio 6 da furosemida.

A robustez foi testada através da substituição do solvente utilizado para acetona ou dimetilsulfóxido deuterado como descrito na literatura.³⁵ A proporção de solventes deuterado (90%) e não-deuterado (10%) foi mantida. Na Figura 22 temos os espectros da furosemida nos três solventes utilizados, com os hidrogênios e sinais numerados.

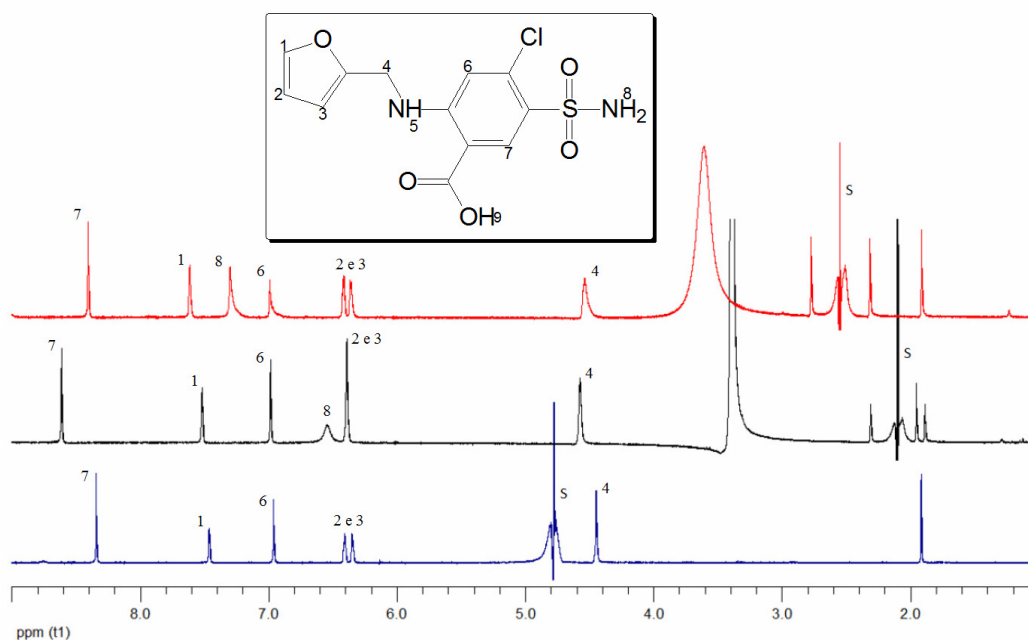


Figura 22. Espectros de RMN de ^1H da furosemida pura em dimetilsulfóxido (vermelho), acetona (preto) e solução NaOH 0,1 mol L $^{-1}$ (azul). s = sinal saturado do solvente.

As amostras foram preparadas em triplicata contendo 10 mg de furosemida pura. Para avaliar somente a mudança do solvente, foram mantidos constantes todos os parâmetros de aquisição definidos para a curva analítica. Apesar da mistura de solventes, os espectros obtidos nos três solventes apresentaram valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento semelhantes aos valores encontrados na literatura, como indicado na Tabela 11.^{57,58,59}

Tabela 11. Deslocamentos químicos obtidos para avaliação de robustez (δ_{exp}) e valores descritos na literatura (δ_{ref}).^{57,58,59}

Nº.	Acetona- <i>d</i> ₆		Dimetilsulfóxido- <i>d</i> ₆		D ₂ O-NaOD	
	δ_{exp}	δ_{ref}	δ_{exp}	δ_{ref}	δ_{exp}	δ_{ref}
1	7,52	7,53	7,63	7,60	7,46	7,48
2	6,54	6,41	6,42	6,41	6,40	6,38
3	6,39	6,50	6,37	6,36	6,34	
4	4,57	4,63	4,59	4,57	4,43	4,38
6	6,99	7,10	7,07	7,05	6,94	6,92
7	8,61	8,61	8,39	8,39	8,34	8,43
5	9,17	8,72	8,63	8,61	8,77	-
8	6,54	7,52	7,36	7,30	-	-

Utilizando a acetona ou dimetilsulfóxido como solvente, o sinal referente ao hidrogênio 6 foi identificado, integrado e a concentração calculada a partir da equação da reta definida pela ANOVA, citado anteriormente: $y = 17,936x + 14,242$. Os resultados indicaram que a substituição da solução aquosa por acetona não apresentou diferenças significativas entre a massa esperada de 10,3 mg ($17,17 \text{ mg mL}^{-1}$) e a massa obtida $10,1 \pm 0,4 \text{ mg}$. Entretanto, o mesmo não é observado quando o solvente é substituído por dimetilsulfóxido, que nos espectros obtidos neste solvente apresentou picos não simétricos. Os resultados indicaram que as amostras de furosemida pura

continham aproximadamente $13,3 \pm 1,6$ mg, ou seja, 3,1 mg acima do valor esperado 10,2 mg (17 mg mL^{-1}).

Sabe-se que uma mesma substância apresenta valores de tempo de pulso de 90° e tempos de relaxação longitudinal (T_1) diferentes para cada solvente utilizado. Por este motivo, estes parâmetros de aquisição foram determinados novamente e dois espectros de cada amostra foram obtidos, um com os parâmetros definidos para o solvente utilizado e outro com os parâmetros definidos para a curva analítica. Os resultados obtidos não apontaram influências significativas da mudança dos valores nos parâmetros de aquisição.

Em seguida foi testada a precisão do método. Para isso, foram utilizadas três soluções padrões em concentrações distintas (5 mg, 10 mg e 15 mg) em triplicata, totalizando nove determinações, conforme descrito na literatura.⁵¹ Para cada concentração foi calculado o seu coeficiente de variação, caso o valor obtido fosse igual ou abaixo de 5% considera-se que os dados apresentaram boa precisão.⁵¹ Desta forma, a Tabela 12 foi construída com os dados obtidos para estas novas amostras de furosemida em concentrações dentro da faixa linear em que foi construída a curva analítica. Os valores de coeficiente de variação (CV) indicam que o método é preciso.

Tabela 12. Coeficientes de variação para avaliação da precisão do método.

Massas (mg)	CV (%)
5,1	0,83
10,3	2,51
15,2	1,03

Outra figura de mérito testada foi a exatidão. Para isso, foram utilizadas 6 amostras preparadas contendo 10,5 mg de furosemida pura cada uma. A média foi calculada a partir dos resultados obtidos para as seis amostras e em seguida seu valor foi comparado utilizando a Equação 12. O resultado de tal cálculo indicou uma exatidão de 99,54%.

Utilizando as equações indicadas na literatura para o cálculo dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), aqui indicada como Equações 13 e 14, foram encontrados os seguintes valores de concentração considerando a curva analítica construída: 0,91 e $2,77 \text{ mg mL}^{-1}$.⁵⁴ Estes cálculos indicam que ao preparar soluções nestas concentrações, teremos condições de detectar 0,5 mg do fármaco e quantificar

com um limite de confiança de 95% apenas acima de 1,7 mg de furosemida. Isto porque as amostras preparadas para análise por RMN possuem volume constante de 0,6 mL.

4.6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Através do método desenvolvido, espera-se quantificar furosemida em formulações farmacêuticas na presença dos excipientes. Assim foram adquiridos medicamentos de cinco marcas contendo 40 mg do fármaco. As amostras foram submetidas a duas análises: o método oficial da FB 5 e o novo método por RMNq.

Na Tabela 13 temos os excipientes presentes em cada uma das cinco marcas das formulações farmacêuticas indicados pela bula e através destes dados e dos espectros de RMN de ^1H foi possível inferir quais os prováveis excipientes solubilizados e alguns dos seus respectivos sinais no espectro de RMN.

Tabela 13. Resumo dos excipientes contidos em cada formulação farmacêutica, indicados pela bula.

Excipientes	Marcas				
	A	B	C	D	E
Lactose	•		•		
Estereato de magnésio	•	•	•	•	•
Celulose microcristalina	•	•	•		
Povidona	•		•		•
Amidoglicolato de sódio	•				
Amido		•		•	•
Manitol		•			
Talco		•		•	•
Água de osmose reversa		•			
Crospovidona			•		
Dióxido de silício			•		
Etanol			•		
Lactose monohidratada				•	•

Na Figura 23 temos os espectros obtidos para cada uma das cinco marcas analisadas por RMNq. Em todos os espectros é possível perceber que os excipientes que solubilizaram apresentam somente sinais abaixo de 6 ppm. As marcas C–E

apresentaram espectros muito semelhantes e podemos atribuir os sinais adicionais aos excipientes comuns a estas marcas: lactose e estereato de magnésio. Todas as marcas, com exceção da marca B contêm lactose como excipiente. O sinal referente a este componente pode ser indicado em 5,2 ppm, afinal apenas o espectro da marca B não apresenta sinais nesta região. A única marca a apresentar amidoglicolato de sódio é também a única que apresentou um espectro com mais sinais sobrepostos na região atribuída aos excipientes.

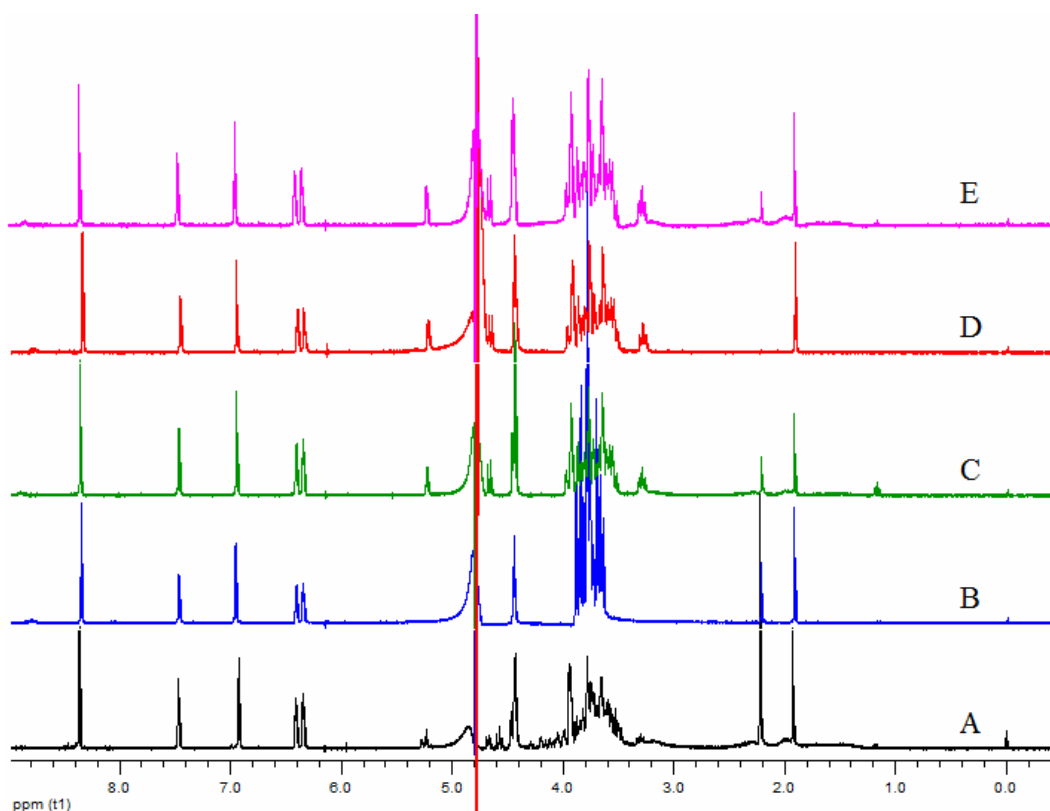


Figura 23. Espectros de RMN – ^1H da furosemida em cinco formulações farmacêuticas com as letras indicando as marcas.

Os espectros de UV obtidos para a furosemida pura e para as cinco marcas diferentes estão representados na Figura 24. Este é o método indicado pela Farmacopéia Brasileira e através destes espectros é possível constatar que todas as amostras apresentaram máximos de absorvância em dois dos três comprimentos de onda descritos na literatura (228, 271 e 333 nm) para a furosemida.¹⁷ Utilizando as absorvâncias obtidas em 271 nm para todas as amostras foi possível calcular a quantidade de furosemida presente nos medicamentos.

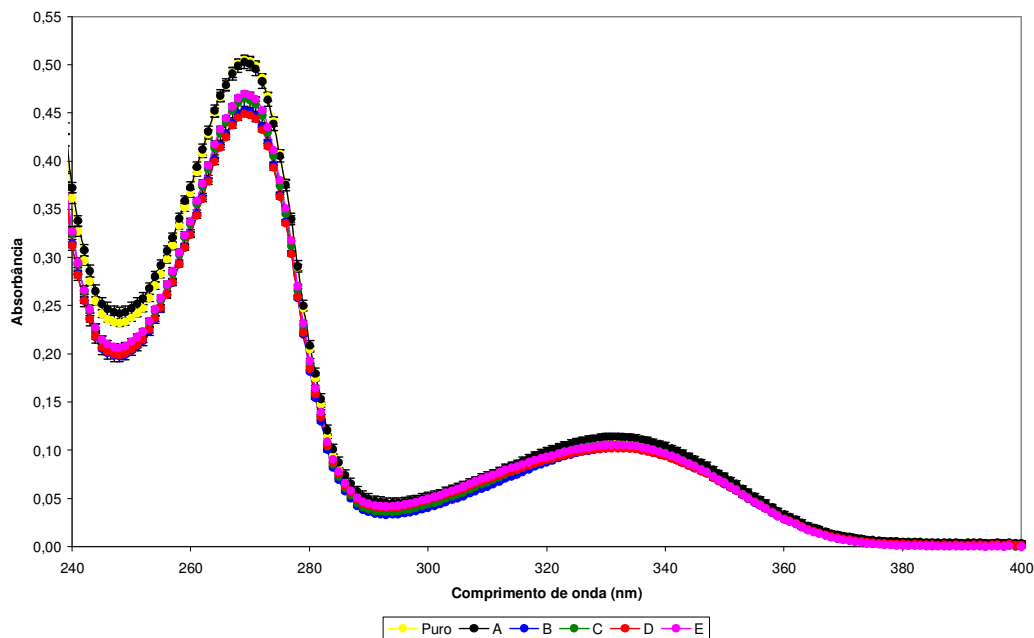


Figura 24. Espectros de absorção molecular no UV da furosemida pura e das cinco formulações farmacêuticas diferentes.

Os resultados obtidos utilizando ambas as técnicas, RMNq e UV, estão descritos na Tabela 14, onde os resultados são apresentados na forma de porcentagem. A faixa de valores exigida pela FB 5 é entre 90 e 110%. Todas as marcas apresentaram resultados de acordo com a Farmacopéia Brasileira, com exceção da marca C que apresentou porcentagem acima da permitida quando quantificada utilizando o método desenvolvido por RMNq.

Tabela 14. Porcentagens de furosemida em cinco marcas de formulações farmacêuticas obtidas por duas técnicas: UV e RMNq.

Marca	UV	RMNq	d
A	101,87 ± 3,8	104,73 ± 1,0	2,86
B	94,30 ± 1,5	105,70 ± 3,3	11,40
C	94,80 ± 4,4	117,26 ± 3,7	22,46
D	100,28 ± 17,1	102,38 ± 6,9	2,10
E	95,19 ± 0,3	104,20 ± 1,8	9,01

Utilizando os dados descritos na Tabela 14, foram calculados os desvios-padrões de ambos os métodos, UV e RMNq. Assim foi possível realizar o teste F para determinação se os desvios são significativamente diferentes. Dividindo a variância do

método por RMNq pela variância do método por UV, encontra-se o valor 2,85. Este valor não é maior que o valor de F_{tab} (9,605), assim conclui-se que os desvios-padrões dos métodos não diferem significativamente no nível de confiança de 95%.

Sabendo que os desvios não diferem significativamente, as médias obtidas por RMNq e UV foram comparadas utilizando a Equação 16.⁵⁰ No caso dos dados descritos acima, t_{cal} é menor (2,60) que t_{tab} (2,78), assim não há evidência estatística de que as médias são significativamente diferentes, também no nível de confiança de 95%.

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{d} \sqrt{n}}{s_d}$$

Equação 16

5 CONCLUSÕES

Para a aquisição de espectros quantitativos de RMN, é necessário definir uma série de parâmetros de aquisição. Dentre eles podemos citar o pulso de 90° e o tempo de relaxação longitudinal como os mais importantes. Para o presente trabalho em que foi proposto o desenvolvimento de um novo método de quantificação de furosemida por RMNq, foi possível determinar tais parâmetros mesmo com a utilização de solvente não deuterado no preparo de amostra. A partir destes, outros parâmetros também importantes como o ganho do receptor, o número de transientes e o tempo de espera da relaxação também foram definidos para a furosemida.

Na construção da curva analítica, fez-se necessário encontrar um sinal da furosemida que estivesse livre de sinais de excipientes que solubilizaram no solvente escolhido, ou seja, livre de interferentes. Assim, a pureza dos sinais, definida antes do desenvolvimento do método foi possível através da obtenção de um espectro COSY com pré-saturação do sinal intenso do solvente não deuterado utilizado no preparo de amostra proposto. A partir dos dois sinais da furosemida, hidrogênios 6 e 7, que não apresentaram interferências dos excipientes foi possível construir duas curvas analíticas com a integração de seus sinais.

Após a construção da curva analítica, obtida mantendo-se constante os parâmetros de aquisição. Foram avaliadas as figuras de méritos indicadas na literatura para RMN: robustez, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Os valores encontrados para exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação encontram-se em concordância com os valores descritos na literatura para quantificações de analitos nos mais diversos tipos de matriz. Apenas para a robustez, o método indicou não ser robusto para a troca de solventes de D₂O-NaOH para DMSO-*d*₆. Entretanto, outras pequenas variações não controladas durante a aquisição dos espectros não acarretaram em diferenças de quantificação significativas.

Ao comparar os resultados obtidos por RMNq e pelo método descrito na Farmacopéia Brasileira, ultravioleta (UV), foi necessário definir se os desvios padrões eram significativamente diferentes. Somente então, seria possível definir estatisticamente se as médias eram diferentes. Após aplicar o teste F para os desvios, as médias foram comparadas e não foram encontradas evidências de que as mesmas são

significativamente diferentes. Assim, o método proposto pode ser utilizado para quantificar furosemida em formulações farmacêuticas.

Os resultados obtidos por ambas as técnicas, RMNq e UV, indicam que todos os medicamentos estão dentro da faixa permitida pela Farmacopéia. Com exceção do resultado obtido para a marca C por RMNq. Apesar dos resultados promissores, a substituição do método descrito na FB5 deve ser feito com cautela. Afinal foram comparados apenas os resultados médios para medicamentos de cinco marcas diferentes.

A utilização de solvente comum no preparo de amostra resultou na decisão em utilizar uma sequência de pulsos de pré-saturação do sinal intenso do solvente utilizado. Considerando que foi possível desenvolver, validar e aplicar o método, conclui-se que uma das vantagens em não utilizar apenas solvente deuterado no preparo de amostra seja reduzir o custo final da análise por RMNq.

Quanto aos excipientes presentes no medicamento, o solvente utilizado (D_2O) propicia uma quantidade maior de excipientes solubilizados na solução final quando comparado a outros solventes orgânicos em que a furosemida possui uma solubilidade alta. Essa quantidade maior de excipientes solubilizados não foi problemática para a quantificação, pois os sinais referentes a estes compostos estavam distantes da maioria dos sinais de interesse da furosemida.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma proposta para a melhoria dos resultados obtidos por RMNq para as formulações farmacêuticas seria utilizar uma calibração com adição de padrão, assim o efeito de matriz que pode estar presente nas análises seria minimizado ou eliminado. Outra proposta para melhora do método desenvolvido seria utilizar um padrão interno. Inicialmente foi proposto utilizar acetato de sódio como padrão interno, entretanto o sinal referente ao hidrogênio do grupo metila está sobreposto com os sinais de excipientes presentes na formulação farmacêutica. Por este motivo, acredita-se que utilizar ácido maleico como padrão interno seja mais adequado, pois seu sinal encontra-se próximo aos sinais do anel aromático da furosemida e distante dos sinais referentes aos excipientes que solubilizaram, bem como o sinal do solvente saturado.

Além das propostas acima, há a possibilidade do método desenvolvido por RMNq não apresentar problemas e a quantidade encontrada de furosemida nas formulações farmacêuticas por este método ser o valor verdadeiro, enquanto que os resultados obtidos pelo método descrito pela Farmacopéia Brasileira apresentam valores distantes deste valor. Para constatar tal possibilidade, uma comparação entre os métodos se faz necessária. Desta forma, seriam comparados além dos resultados, as curvas analíticas e as figuras de mérito do método proposto (RMNq) e do método da Farmacopéia (UV).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bosch, M. E.; Sánchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. *J. Pharm. Anal.* **2008**, *48*, 519-532.
2. Kwakye, J. K. *Talanta* **1985**, *32*, 1069-1071.
3. Sweetman, S. C. *Martindale: the complete drug reference*. 35th ed. London: Pharmaceutical Press, **2007**. Vol. 2.
4. Xi, J.; Ji, X.; Zhang, S.; Ai, X.; He, Z. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *541*, 193-198.
5. Rao, Y.; Zhang, X.; Luo, G.; Baeyens, W. R. G. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *396*, 273-277.
6. Bulik, C. M. *Journal of Substance Abuse* **1992**, *4*, 69-90.
7. www.anvisa.gov.br <Acesso: 07 de julho de 2014.>
8. LIDE, D. R. *Crc handbook of chemistry and physics*. 85th ed. Boca Raton: CRC Press, **2004**. Vol. 1.
9. De Villiers, M. M.; van der Watt, J. G.; Lötter, A. P. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, *88*, 275-283.
10. Dias, I. L. T.; Neto, G. O.; Martins, J. L. S. *Lecta* **2004**, *22*, 19-26.
11. Bundgaard, H.; Nørgaard, T.; Nielsen, N. M. *International Journal of Pharmaceutics* **1988**, *42*, 217-224.
12. McKenzie, J. S.; Donarski, J. A.; Wilson, J. C.; Charlton, A. J. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2011**, *59*, 336-359.
13. Holzgrabe, U.; Malet-Martino, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 579-687.
14. Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel, B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *38*, 806-812.
15. Guideline Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1996. Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
16. Holzgrabe, U. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2010**, *57*, 229-240.
17. *Farmacopéia Brasileira*, ANVISA, Brasília, 5^a ed.; 2010, vol.2, 989-992.
18. Malode, S. J.; Abbar, J. C.; Shetti, N. P.; Nandibewoor, S. T. *Electrochimica Acta* **2012**, *60*, 95-101.

19. Ram, V. R.; Dave, P. N.; Joshi, H. S. *Journal of Chromatographic Science* **2012**, *50*, 721-726.
20. Youm, I.; Youan, B.-B. C. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2013**, *2013*, 9 páginas. Article ID 2070028
21. Claridge, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, **2009**.
22. Grivet, J. -P. *Signal Treatment and Signal Analysis in NMR* **1996**, Chapter 14, 306-329.
23. Jancke, H.; Malz, F.; Haesselbarth, W. *Accred. Qual. Assur.* **2005**, *10*, 421-429.
24. Forshed, J.; Andersson, F. O.; Jacobsson, S. P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, *29*, 495-505.
25. Malet-Martino, M.; Holzgrabe, U. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 1-15.
26. Görog, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *36*, 931-937.
27. Szántay, C. Jr. *Trends in Analytical Chemistry* **1992**, *11*, 332-344.
28. Forshed, J.; Erlandsson, B.; Jacobsson, S. P. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *552*, 160-165.
29. Bharti, S. K.; Roy, R. *Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, *35*, 5-26.
30. Turczan, J. W.; Goldwitz, B. A.; Nelson, J. J. *Talanta* **1972**, *19*, 1549-1554.
31. Eberhart, S. T.; Hatzis, A.; Rothchild, R. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1986**, *4*, 147-154.
32. Casy, A. F.; Dewar, G. H. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1994**, *12*, 855-861.
33. Shamsipur, M.; Talebpour, Z.; Bijanzadeh, H. R.; Tabatabaei, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, *30*, 1075-1085.
34. Beyer, T.; Diehl, B.; Randel, G.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Schollmayer, C.; Holzgrabe, U. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *48*, 13-19.
35. Santos, M. da S.; Colnago, L. A. *Química Nova* **2013**, *36*, 324-330.
36. Beyer, T.; Schollmayer, C.; Holzgrabe, U. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *52*, 51-58.
37. Beyer, T.; Holzgrabe, U. Investigation of Multi-Component Drugs by NMR Spectroscopy, Elsevier, Amsterdam, **2008**, pp.141-155.

38. Derome, A. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*. Oxford: Pergamon Press, **1987**.
39. Malz, F. Quantitative NMR in the solution state NMR, in: U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl (Eds.), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, **2008**, pp.43-62.
40. Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR Spectroscopy: A guide for chemists*. 2nd ed. Oxford: Oxford Univ. Press, **1993**.
41. Malz, F.; Jancke, H. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 38, 813-823.
42. Bagno, A.; Rastrelli, F.; Saielli, G. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2005**, 47, 41-93.
43. Burton, I. W.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3123-3131.
44. Lambert, J. B; Mazzola, E. P. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods*. Uppersaddle River: Pearson Education, **2004**.
45. Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 133-149.
46. Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 589-595.
47. Rizzo, V.; Pincioli, V. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 38, 851-857.
48. Giraudeau, P.; Tea, I.; Remaud, G. S.; Akoka, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 14 páginas. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.020>
49. Barros Neto, B. de; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4^a ed. Porto Alegre: Bookman, **2010**.
50. Miller, J. N. Miller; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th ed. Edinburgh: Pearson, **2010**.
51. Leite, F. *Validação em Análise Química*. 5^a ed. Campinas: Editora Átomo, **2008**.
52. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6^a ed. Porto Alegre: Bookman, **2009**.
53. Maniara, G.; Rajamoorthi, K.; Rajan, S.; Stockton, G. W. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4921-4928.
54. Holzgrabe, U. *qNMR Spectroscopy in Drug Analysis – A General View*, Elsevier, Amsterdam, **2008**, pp.131-137.

55. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. Introduction to spectroscopy. 4th ed. Belmont: Brooks/Cole, **2009**.
56. Silverstein, R. M.; Morrill, T. C.; Bassler, G. C. Spectrometric identification of organic compounds. 5th ed. New York: J Wiley, **2005**.
57. Spamer, E.; Müller, D. G.; Wessels, P. L.; Venter, J. P. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *16*, 247-253.
58. Semaan, F. S.; Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
59. Hanna, G. M.; Lau-Cam, C. A. *Journal of AOAC International* **1993**, *76*, 526-530.