

Reabido em 01/08/98
Fidelis

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**ASPECTOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
PARA DOSEAMENTO DO METRONIDAZOL EM
MEDICAMENTOS**

REGINA CELLI ESPIRES

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. JOÃO FERNANDES MAGALHÃES

**São Paulo
1997**

15324

REGINA CELLI ESPIRES

ASPECTOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DOSEAMENTO

DO METRONIDAZOL EM MEDICAMENTOS

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. João Fernandes Magalhães
Presidente

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
1o. Examinador

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
2o. Examinador

São Paulo, 28 de julho de 1997.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Bibliotecas e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Espires, Regina Celli

E 77 Aspectos da validação de métodos para doseamento do metronidazol em medicamentos / Regina Celli Espires. – São Paulo 1998.
136p.

Disertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Magalhães, João Fernandes

1. Análise de medicamentos 2. Medicamento: Controle de qualidade 3. Fármaco: Controle de qualidade 4. Espectrofotometria : Análise de drogas 1. T. II. Magalhães, João Fernandes, orientador.

614.19015 CDD

***"Dando graças por tudo a Deus Pai, em nome
de nosso Senhor Jesus Cristo".***

(Ef. 5:20)

***"Eu sou o Senhor, o teu Deus que te ensina o
que é útil e te guia pelo caminho em que
deves andar".***

(Is. 48:17)

Aos meus pais Oswaldo e Milena,

" Filho meu, guarda ao mandamento de teu pai e não abandones a instrução de tua mãe; ata-os perpetuamente ao teu coração e pendura-os no teu pescoço. Quando caminhares isso te guiará; quando te deitares, te guardará; quando acordares, falará contigo. Porque o mandamento é uma lâmpada e a instrução uma luz e as repreensões da disciplina são o caminho da vida".

(Pv.6:20-23)

Ao meu marido Luiz Fernando,

***"Qual a macleira entre as árvores do bosque,
tal é o meu amado e com grande alegria
sentei-me à sua sombra; o seu fruto era doce
ao meu paladar e o seu estandarte sobre
mim era o amor."***

(Cantares 2:3-4)

Ao Prof. Dr. João Fernandes Magalhães,

***“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito
bons. Porém, há os que lutam toda a vida.
Estes são os imprescindíveis”.***

Bertold Brecht (1898 - 1956)

À tia Maria Thereza,

***Que com amor e carinho me acolheu e
protegeu.***

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá - UEM representada pelas Sras. Márcia M. Tavares e Elizabeth Biff da Pró-Reitoria de Pós-Graduação;

À Coordenação de Pós-Graduação da FCF-USP representada pela Prof.^a Titular Érika Rosa M. Kedor e pelas funcionárias Elizabeth Claro S. Paiva, Benedita E. Santo de Oliveira e Elaine M. Ychico;

À Fundação para o Remédio Popular do Estado de São Paulo - FURP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES;

Aos Prof.^{os} Dra. Elfriede M. Bachi, Dr. Vicente de Oliveira Ferro e Msc. Dominique C. H. Fisher;

Às funcionárias Iraci de Oliveira, Lígia Maria T. Godoy, Iria R. da Silva e Regina M. Rojas;

Às Prof.^{as} Msc. Izabel C. P. Ferreira e Msc. Maria Lucilia M. Zamuner e a Msc Cecília F. Watanabe do Departamento de Farmácia e Farmacologia - UEM;

Aos Prof.^{os} Dr. Jorge Luiz S. Martins, Dra. Terezinha de Jesus A. Pinto e Dr. Ovandir Alves Silva;

Ao Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares e ao mestrando José Chisté;

Às Dras. Salete Aparecida Beneton e Virgínia Maria Borges,

Às bibliotecárias Moema Rodrigues dos Santos, Adriana de Almeida Barreto e Rosangela de Jesus Belizia representando os demais funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas;

Às colegas de curso Nilza S. Y. Wadt, Akimi Honda, Rosa Fátima O. Rodrigues e Márcia da Silva.

A todos que nas mais diferentes circunstâncias e necessidades, colaboraram com eficiência e amizade para a execução e conclusão deste trabalho.

ÍNDICE ANALÍTICO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - FUNDAMENTOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	4
2.2 - GENERALIDADES SOBRE O METRONIDAZOL.....	8
2.3 - FARMACOLOGIA E APLICAÇÕES CLÍNICAS DO METRONIDAZOL	13
2.4 - METODOLOGIA ANALÍTICA	22
2.4.1 - Métodos volumétricos	22
2.4.2 - Métodos espectrofotométricos	25
2.4.3 - Métodos cromatográficos.....	35
2.4.4 - Outros métodos	37
3 - PROPOSIÇÃO	40
4 - PARTE EXPERIMENTAL	42
4.1 - MATERIAL	42
4.1.1 - Padrões	42
4.1.2 - Amostras.....	42
4.1.3 - Reagentes e equipamentos	43
4.2 - MÉTODOS.....	46
4.2.1 - Titulação em meio não aquoso.....	46
4.2.2 - Método espectrofotométrico com hidrólise alcalina do metronidazol e reação de Bratton-Marshall na análise de comprimidos.....	47
4.2.3 Método espectrofotométrico com hidrólise alcalina do benzoilmetronidazol e reação de Bratton-Marshall na análise de suspensões	55
4.2.4 - Método espectrofotométrico com redução do nitro grupo na presença de zinco em pó e ácido clorídrico, seguida da reação de Bratton-Marshall na análise de comprimidos	60
4.2.5 - Método espectrofotométrico com absorção no UV para determinação do metronidazol em ácido clorídrico 0,1N	64
4.2.6 - Método espectrofotométrico com absorção no UV para determinação de benzoilmetronidazol em HCl 0,1N na análise de suspensões	69
4.2.7- Método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia.....	72
5 - RESULTADOS.....	74
5.1 - TITULAÇÃO EM MEIO NÃO AQUOSO	74
5.2 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM HIDRÓLISE ALCALINA E REAÇÃO DE BRATTON-MARSHALL.....	74
5.2.1 - Para o metronidazol.....	74
5.2.2 - Para o benzoilmetronidazol.....	82
5.3 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM REDUÇÃO DO GRUPO NITRO E REAÇÃO DE BRATTON-MARSHALL.....	85
5.4 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM ABSORÇÃO NO UV	89
5.4.1 - Para o metronidazol.....	89
5.4.2 - Para o benzoilmetronidazol.....	94
5.5 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM NITROPRUS-SIATO DE SÓDIO E CLORETO DE HIDROXILAMÔNIA.....	97

6 - ADENDO.....	100
7 - DISCUSSÃO.....	106
8 - CONCLUSÕES.....	121
RESUMO.....	123
SUMMARY.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

1 - INTRODUÇÃO

A escolha da metodologia adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica. A aplicabilidade dos métodos oficiais na análise de medicamentos nem sempre é possível de ser realizada, considerando a grande diversificação nas formulações farmacêuticas. Ao se validar um método analítico não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo²⁹. Os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores como a estrutura química do fármaco, o nível das doses terapêuticas e as diferenças nas fórmulas de um laboratório para outro. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação.

Na área farmacêutica, a validação de processos, equipamentos, instalações e metodologia analítica está plenamente aceita como atividade necessária e que tem produzido excelentes resultados na melhoria do desempenho industrial e da qualidade dos produtos. A validação é definida como o estabelecimento de evidências experimentais documentadas às quais fornecem um alto grau de segurança de que um processo ou método produzirá consistente e sucessivamente um produto que atenderá às características e especificações de qualidade. Merece destaque a validação de métodos analíticos para o controle da qualidade de medicamentos e insumos farmacêuticos. Pode-se dizer que a falta de metodologia adequada para avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos limitará a eficiência do programa de validação⁶⁹.

A validação se constitui numa exigência quando da implantação de um processo ou método analítico novo. Tratando-se de metodologia, é a etapa essencial e inicial de um programa bem estruturado. Há muitas propostas nesta área descrevendo os parâmetros principais que devem ser considerados para avaliação de desempenho de um método analítico, dentro do programa de validação^{13,23,59}.

Do ponto de vista oficial, a última revisão da Farmacopéia Americana⁸⁷ resume de maneira clara os atributos que o método analítico deve apresentar. São eles: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e intervalo de aceitação. Todos estes atributos são exigidos para os métodos encontrados no código oficial americano e foram avaliados nos laboratórios destinados para este fim específico.

Mesmo para um método já validado freqüentemente há necessidade de novos estudos em função de algumas alterações que podem ocorrer. Estas podem ser exemplificadas com a mudança na composição do medicamento, substituição parcial ou total de equipamentos, variação na escala de produção do lote de medicamentos, substituição do fornecedor de matéria prima, reagentes e equipamentos, uso do método por um longo período e transferência de metodologia entre laboratórios. Com relação a isto, pode-se lembrar que na indústria é comum a transferência do método do laboratório de desenvolvimento farmacêutico para o de controle de qualidade^{13,69}.

Considerando estes fatores que interferem no desempenho dos métodos analíticos, a adoção de um novo método ou procedimento revisado envolve a garantia de que além da validação, existem evidências que justificam as vantagens do método em relação a outros já existentes. É fácil compreender que há discrepâncias no julgamento do mérito de cada método,

uma vez que este pode ser influenciado por fatores subjetivos e circunstanciais. Nota-se no entanto que 3 parâmetros são obrigatoriamente necessários em qualquer caso de validação da metodologia, que são: exatidão, precisão e linearidade. Isto não quer dizer que os outros parâmetros não representem importante contribuição no contexto da validação.

O presente trabalho visou estudar os principais aspectos da validação de métodos analíticos. Para tanto, foi selecionado o metronidazol como protótipo para este estudo levando em conta que é um fármaco de grande aplicação terapêutica, faz parte da linha CEME e há variada metodologia analítica descrita na literatura.

Para o desenvolvimento do trabalho e considerando as informações obtidas com o levantamento bibliográfico, foram selecionados alguns métodos. Ao aplicá-los ao metronidazol, procedeu-se ao estudo analítico sistematizado não descartando a possibilidade de eventuais modificações dos procedimentos. Com os resultados obtidos, procurou-se avaliar o desempenho de cada método de maneira crítica, indicando aqueles que poderiam ser aplicados nos diferentes laboratórios de controle de qualidade, em particular naqueles com limites de equipamentos e instalações.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – FUNDAMENTOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os programas de qualidade total são elaborados por pessoal voltado especificamente para obtenção da qualidade de um bem ou processo objetivando satisfazer aos usuários.

Para a produção de qualquer bem ou produto, há obrigatoriamente o envolvimento de diferentes setores de uma empresa ou indústria como engenharia, desenvolvimento, produção, controle de qualidade entre outros o que permite uma integração entre estes. Considerando este entrosamento tão abrangente e que direta ou indiretamente pode comprometer a qualidade do produto final, recomenda-se que pessoal, instalações físicas, equipamentos, sistemas de abastecimento, matérias primas, materiais de embalagem e métodos analíticos sejam validados.

Com relação à metodologia analítica, a última revisão da Farmacopéia Americana⁸⁷ reconhece a importância da validação dos métodos analíticos na indústria farmacêutica visando o adequado controle de qualidade de medicamentos e insumos farmacêuticos. Os usuários destes não são obrigados a participar da validação da metodologia, mas devem verificar se são apropriados para emprego nas condições de uso de cada laboratório. Segundo PASTEELNICK⁵⁹, pode-se dizer que se não houver um método ou série de métodos devidamente adequados para avaliação da qualidade dos produtos, o programa de validação terá valor limitado.

GARFIELD²⁹ afirmou que apesar de se validar uma metodologia não significa que possa ser usada indiscriminadamente para a determinação de um mesmo princípio ativo em diferentes medicamentos de

diferentes laboratórios. O autor afirmou ainda que para cada caso, há necessidade de resultados experimentais e respectiva análise estatística, assim como o estabelecimento de critérios de aceitação para garantir o emprego seguro da metodologia em questão.

Ao se decidir por um método novo ou procedimento, deve-se ter a garantia que este foi devidamente validado e documentado com evidências que justifiquem seu emprego com vantagens em relação a outros métodos já existentes. Há de se lembrar que fatores como instalações, nível de resolução de equipamentos, capacidade técnica, fator econômico, níveis de aceitação adequados, facilidade de fornecimento de reagentes e outros materiais influem quando da escolha por um determinado método.

Validação de métodos pode ser definida como o processo pelo qual atributos ou figuras de mérito são determinados e avaliados, e é uma importante parte de um programa de garantia de qualidade²⁹. Exatidão, precisão, especificidade (ou seletividade), limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez são os atributos normalmente recomendados nos programas de validação de métodos analíticos⁸⁷.

Ao se analisar uma amostra de medicamento, é desejável a compreensão da relação entre alguns valores obtidos. Ao se fabricar um produto farmacêutico segundo uma fórmula, o teor do princípio ativo rotulado pode ser considerado ou chamado de média declarada ou teórica. Independente de como foi fabricado, embalado, acondicionado, analisado e conservado, o medicamento apresentará um teor exato ou verdadeiro do princípio ativo, que é denominado média real. Quando da análise propriamente dita, o resultado encontrado no doseamento representa a média experimental que é a média da análise de n alíquotas nas mesmas condições experimentais.

A exatidão pode ser definida como a proximidade da média aritmética de uma série de resultados, com a média esperada ou aceita. Considerando isto, a média experimental deve ser a medida que melhor expressa o valor verdadeiro definindo assim a exatidão do método⁶⁹.

A precisão também expressa como concordância de uma série de resultados obtidos nas mesmas condições, se constitui num importante atributo para a validação de métodos. Refletirá a dispersão dos vários resultados individuais do doseamento em relação ao valor médio, estando ou não próximo do valor verdadeiro⁶⁹. Não há portanto como desvincular a precisão da exatidão. A partir dos valores obtidos, o desvio padrão é calculado, e este expresso em termos de porcentagem é denominado de coeficiente de variação (CV), logo quanto menor for o valor deste, melhor será a precisão do método.

A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade ou repetibilidade. A primeira é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, em diferentes dias por diferentes analistas em diferentes equipamentos. A repetibilidade por sua vez é medida em função dos valores encontrados após análise de uma única amostra em um laboratório por um único analista num mesmo equipamento⁶⁷.

São vários os fatores que podem comprometer estes dois atributos no processo da validação. Calibração de instrumentos, interferência causada por outros componentes da amostra, habilidade e capacitação do analista, temperatura irregular no laboratório, umidade, instabilidade de alguns reagentes na presença de luz natural ou UV, oscilações na capacidade elétrica comprometendo o desempenho dos equipamentos podem exemplificar circunstâncias geradoras de erros, que podem ser sistemáticos ou casuais. Com relação especificamente a aparelhos,

pequenas variações no dia a dia muitas vezes são negligenciados pois na maioria dos casos a comparação de resultados é feita entre amostra e padrão. Com certeza, se estas oscilações quase imperceptíveis não forem monitoradas, os problemas a médio e longo prazo aparecerão²⁹.

A robustez ou severidade dos métodos é o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos na análise de uma mesma amostra submetida às mais variadas condições experimentais. Constitui-se num teste importante para aqueles métodos sensíveis à pequenas variações na técnica analítica seja por conta do analista, reagentes ou condições ambientais⁸⁷.

Outro parâmetro que deve ser considerado é a linearidade que representa a habilidade do método de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração do princípio ativo na amostra, num determinado intervalo. Pode ser determinada graficamente onde quantidades acrescentadas do princípio ativo são confrontadas com quantidade teóricas, ou pelo cálculo da regressão linear⁸⁷.

Os termos seletividade e especificidade tem sido usados como sinônimos. CARTWRIGHT & MATTHEWS¹³ no entanto fizeram uma pequena diferenciação. Especificidade foi considerada como um procedimento que mede quantitativamente um parâmetro físico-químico ou grupo funcional de um ou mais componentes da amostra. A seletividade por sua vez trata do procedimento que detecta quantitativamente o fármaco na presença dos outros compostos. Já a USP XXIII⁸⁷ determina que a especificidade é a capacidade de medir exata e especificamente o fármaco na presença dos outros constituintes da amostra. Pode ser determinada comparando-se resultados obtidos de uma amostra contendo impurezas ou produtos de degradação, ou pelo placebo, com valores encontrados após análise da amostra sem os interferentes.

Outro atributo objetivando a validação analítica, refere-se ao limite de detecção, que está relacionado com a menor concentração do

princípio ativo que pode ser detectado na amostra sem ser quantificado. Sua determinação pode ser feita através de instrumentos ou simplesmente pela análise da amostra cuja concentração do fármaco é conhecida, estabelecendo um nível realmente detectável⁸⁷. Merecendo atenção, o outro atributo denominado limite de quantificação está relacionado a determinação exata e precisa da menor concentração do princípio ativo. Estes dois parâmetros para serem determinados requerem equipamentos que apresentem máxima sensibilidade¹³.

De acordo com PASTEELNICK⁵⁹ dentre as exigências da Federal Drugs Administration (FDA), para a validação de um método destacam-se a exatidão, precisão e linearidade num determinado intervalo de concentração em torno do valor declarado. A maneira de determinar estes atributos pode variar e a mais efetiva faz uso do placebo, ao qual são adicionadas quantidades do fármaco a ser analisado; e numa série de experimentos os resultados são avaliados e calculados.

2.2 - GENERALIDADES SOBRE O METRONIDAZOL

Historicamente, a origem do metronidazol (MTD) está relacionada com a descoberta por Nakamura em 1955, de um antibiótico nitroimidazol denominado azomicina. Sua propriedade tricomonocida foi então explorada na síntese de novos compostos nitroimidazóis³¹. Entre estes fármacos, são citados metronidazol, tinidazol, nimorazol e ornidazol⁹².

O metronidazol (I) recebe o nome químico de 1-(2 hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, sua fórmula química é $C_6H_9N_3O_3$ com peso molecular igual a 171,12 e apresenta a seguinte estrutura química:

As primeiras experiências farmacológicas com o metronidazol foram por volta de 1961, e relataram a aplicação em ratos com amebíase intestinal e em hamster com amebíase hepática. Em humanos, foi utilizado com sucesso no tratamento da amebíase na África em 1966³¹.

Segundo *Index nominum*³⁹ atualmente existem mais de 86 marcas registradas de medicamentos contendo metronidazol de diferentes laboratórios nos países considerados de primeiro mundo. No Brasil, o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas 96-97²¹ apresenta mais de 30 medicamentos em diferentes formulações contendo o metronidazol isolado ou em associações conforme quadro 1.

O metronidazol é utilizado na preparação de comprimidos, creme, gel e óvulos de aplicação vaginal. Já as suspensões são preparadas com o seu éster, o benzoilmetronidazol (BMTD) com peso molecular igual a 276,16 e cada grama equivale a 0,620 g de metronidazol⁵². Para uso injetável, o metronidazol está disponível em soluções prontas para uso (500 mg/mL) e existe também na forma de dose simples liofilizada contendo 500 mg de MTD na forma de cloridrato e 415 mg de manitol. Para o preparo da solução, são adicionados 4,4 mL de um diluente que pode ser água ou cloreto de sódio 0,9% estéreis; o volume obtido é então reconstituído em soluções como as de Ringer, cloreto de sódio 0,9%, ou dextrose 5% em água. Para a administração endovenosa, esta solução obrigatoriamente deve ter ser pH neutralizado, utilizando-se bicarbonato de sódio e a reconstituição não deve ser feita em contato com alumínio. Esta ressalva é feita uma vez que este elemento promove na solução preparada a descoloração não implicando na perda da atividade⁸³.

Com referência à estrutura do metronidazol, no anel imidazólico que apresenta substituintes em 3 posições, chama a atenção a posição 5 onde se encontra ligado diretamente o grupo nitro. A ocorrência

deste grupo em produtos naturais é rara sendo no entanto encontrado em muitos fármacos sintéticos com as mais variadas aplicações terapêuticas. Segundo KOROLKOVAS & BURCKHALTER⁴⁴, parece que sua presença é imprescindível para a atividade parasitária exercendo efeitos em 3 aspectos. Primeiramente por alterar propriedades físico-químicas como fatores de massa e volumes moleculares, solubilidade na água, momento dipolar entre outros, influenciando o metabolismo possibilitando a permanência no organismo por mais tempo. O segundo aspecto abordado é o relacionado ao bioquimismo celular, ficando evidente que a ação quimioterápica do metronidazol é resultado de sua redução a amina. Por último, o grupo nitro pelo seu efeito indutivo na atração de elétrons, pode promover a formação de quelato ou modificar algum já existente e ainda alterar a polarização da molécula.

QUADRO 1 - Relação dos laboratórios nacionais que fabricam medicamentos contendo metronidazol com suas respectivas apresentações.

Laboratório	apresentação
Aché	óvulos e creme vaginais
Akzo	creme vaginal
Ativus Farmacêutica	creme vaginal
B. Braun	injetável
Bunker	gel vaginal
Delta	comprimido, suspensão e creme vaginal
Donak Flama	creme vaginal
Ducto	comprimido, suspensão e creme vaginal
Elofar	comprimido, suspensão, drágea e creme vaginal
Farmacoquímica	drágea e creme vaginal
Fresenius	injetável
Honorterápica	gel e óvulos vaginais
INAF	suspensão
IQC	gel vaginal e pó
J.P.	injetável
Laborsil	comprimido e suspensão
Legrand	comprimido
Leofarma	comprimido e suspensão
Neoquímica	comprimido, suspensão e creme vaginal
Opofarm	comprimido e suspensão
Prodotti	comprimido e creme vaginal
Profarb	comprimido, suspensão e creme vaginal
Q.I.F.	comprimido e suspensão
Rhodia	comprimido, suspensão e injetável
Riedel Zainka	cápsulas (associação com nistatina)
Sanval	comprimido, suspensão e gel vaginal
Teuto Brasileiro	comprimido, suspensão e creme vaginal
União Química	comprimido, suspensão e creme vaginal
Vital Brasil	comprimido e suspensão

As doses terapêuticas são: comprimido de 250 mg e 400 mg; suspensão com 40 mg/mL; creme vaginal 250 mg/ 4g; gel vaginal 500 mg/ 5g; óvulos; injetável a 0,5%. As formas farmacêuticas de uso oral podem apresentar associações com dissulfiram, complexo B, espiramicina e nistatina. As formas de aplicação vaginal na sua maioria apresentam a nistatina associada.

2.3 - FARMACOLOGIA E APLICAÇÕES CLÍNICAS DO METRONIDAZOL

Tanto o metronidazol como seu éster apresentam atividades amebicida, tricomonicida e flagelícida.

As entamebas, em grande número de portadores vivem como comensais e não determinam nenhuma lesão intestinal. Esta forma biológica é denominada *minuta* e sobrevive nutrindo-se de bactérias e detritos diversos encontrados na luz intestinal. Por circunstâncias ainda não determinadas, transformam-se na forma *magna*, podendo penetrar a parede intestinal levando ao aparecimento de lesões ulcerosas. O intestino grosso é preferencialmente agredido, e clinicamente são comprometidos a região próxima a válvula íleocecal e reto. A *Entamoeba histolytica* pode invadir vísceras como fígado, baço, cérebro e pulmões determinando necrose^{62,82,92}.

O termo amebíase é generalizado para os quadros desenvolvidos tanto pela *E. histolytica* como para a *E. hartmanni*, espécie muito comum nos países temperados onde prevalecem altas porcentagens de portadores assintomáticos e raros casos clínicos. Caracteriza-se por não ser invasora e sem ação histolítica, razão pela qual muitos autores não a enquadram como uma infecção⁶².

São numerosas as drogas usadas para o tratamento da *E. histolytica* e a indicação deve considerar o local de ação, a capacidade de absorção e mecanismo de ação. Em função disto, existem os amebicidas que agem essencialmente sobre parasitas que se encontram na luz intestinal. Este grupo é representado pelos derivados halogenados do 8-quinolínol, arsenicais pentavalentes, fenantronílicos, derivados da dicloroacetamida e antibióticos. O segundo grupo tem ação exclusivamente sobre os parasitas localizados em outros órgãos, já descritos acima. O medicamento de primeira escolha é a cloroquina, uma vez que tem

absorção quase completa pelo trato intestinal alcançando assim, outros tecidos em concentrações terapêuticas. O metronidazol faz parte do terceiro grupo de medicamentos que agem de maneira eficaz frente as duas formas de amebíase. Esta propriedade de ação - intestinal e extraintestinal, preconizada para um bom amebicida, é reforçada pelo baixo custo, facilidade de administração e baixa toxicidade⁸².

WEBSTER⁹² recomendou que os pacientes recebam 750 mg de MTD, 3 vezes ao dia durante 5 a 10 dias. Para crianças, a dose diária indicada é de 35 a 50 mg/kg fracionada em 3 doses por 10 dias. Consideram-se também a área geográfica e as formas da entameba existentes.

TEIXEIRA⁸² indicou para os casos de colite amebiana desintérica, doses de 500 a 700 mg a cada 8 horas durante 5 dias. Em casos de amebíase extraintestinal, o tratamento deve ser prolongado para 10 dias.

A tricomoníase desenvolvida pelo *Trichomonas vaginalis*, é caracterizada pela secreção vaginal abundante e amarelada, espessa, de pH ácido e com aspecto espumoso em função de bolhas de gás. Nos homens, a freqüência é semelhante à das mulheres com um agravante. A evolução se apresenta de forma latente sem sintomatologia externa o que leva a negligenciar a doença. Prostatites em decorrência de tricomoníase são mais freqüentes que se imagina e é de difícil cura⁸².

Outros dois protozoários deste gênero são identificados e encontrados no homem. O *T. tenax*, não é patogênico e faz parte da flora bucal; já o *T. hominis* parece estar relacionado a diarréias, desconforto abdominal e cólicas e vem sendo objeto de estudos para determinação de sua patogenicidade ou não⁸².

A evolução da tricomoníase obedece geralmente a 3 estágios. A fase aguda é de curta duração com os mesmos sintomas descritos acima

e no esfregaço, encontram-se ainda bacilos de Doderlein. Na segunda etapa, o corrimento é mais evidente e pode, se não houver tratamento, permanecer por períodos de semanas a anos, e o exame citológico revela a ausência dos bacilos da flora vaginal. A tricomoníase crônica apresenta uma secreção atípica onde podem ser encontrados fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus* e *Torulopsis* implicando no tratamento diferenciado para estes microrganismos com o uso de medicação antifúngica. PESSOA & MARTINS⁶² ao considerarem o maior comprometimento tecidual, afirmaram que muitas vezes o tratamento tópico traz resultados temporários havendo a necessidade de medicação oral conseguindo-se assim efeitos sistêmicos desejados. Para tanto, são indicados o metronidazol, nitrimidazina e aminotrazol.

O esquema terapêutico indicado por WEBSTER⁹² sugeriu 3 comprimidos de 250 mg ao dia por 7 dias, ou dose única de 2 g. O mesmo tratamento é recomendado aos parceiros uma vez se tratar de doença sexualmente transmissível⁶⁴.

As primeiras microscopias para diagnóstico parasitológico de fezes, identificaram um protozoário do gênero *Giardia*. Com a implantação de serviços públicos de saúde e o conseqüente desaparecimento de doenças epidêmicas, o conceito de doença para a giardiase vem sendo motivo de discussão entre vários autores⁴¹.

Descartados outros agentes causadores de quadros gastrointestinais indesejáveis, o aparecimento de fezes diarreicas moles, esverdeadas, muito fétidas, aparência gordurosa, dores no hipocôndrio direito indicando alguma disfunção biliar, é indicativo com grande chance de acerto de uma infestação por *Giardia lamblia*⁸². Esta sintomatologia é cíclica, sem reações febris permitindo que a maioria das pessoas considerem apenas uma indisposição passageira.

O quadro descrito está diretamente relacionado com a ação mecânica dos protozoários, quando da sua fixação pelas ventosas à parede intestinal. Como um revestimento, estes parasitas impedem a absorção de gorduras levando o indivíduo a deficiências nutricionais, em especial as vitaminas lipossolúveis. Um certo comprometimento dos movimentos peristálticos e a grande quantidade de gordura na luz intestinal levam a um quadro de diarreia persistente⁶². Por não se tratar de um parasita com propriedades invasoras, muitos não consideram a giardíase um quadro patogênico. No entanto, a descrição clínica mencionada acima, permitiu reconsiderar o conceito de doença não patogênica ainda mais nos países onde sistemas de saneamento básico, saúde e nutrição são deficientes.

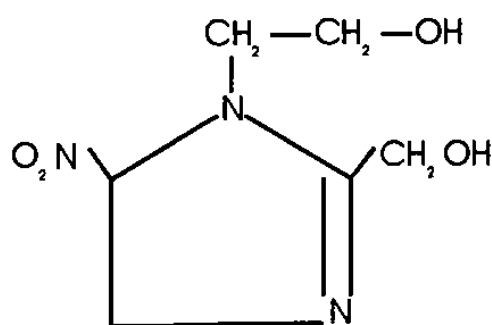
O tratamento segue o mesmo esquema adotado para tricomoníase e amebíase, sugerindo apenas que a dose única de 2 g se prolongue por 3 dias^{82,92}. PESSOA & MARTINS⁶² recomendam 15 a 20 mg/kg de peso durante 7 a 10 dias tomando o cuidado na repetição deste esquema após 1 ou 2 semanas.

A atividade antiparasitária do metronidazol afirmada anteriormente, parece ser da responsabilidade do grupo nitro. A reação de redução ocorre no interior da célula alvo onde o nitro grupo recebe elétrons provenientes de substratos endógenos como fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH). As proteínas transportadoras de elétrons envolvidas no carreamento destes são as flavoproteínas em mamíferos, e as feridoxinas em microrganismos; estas reações são catalisadas respectivamente, por uma nitroreductase e um complexo ferro-enxofre⁹². As formas reduzidas da droga promovem a formação de produtos secundários tóxicos que assim, tanto podem alterar como destruir a estrutura helicoidal do DNA. A reação de redução tem lugar em ambiente anaeróbico e logicamente revertida na presença de oxigênio. Considerando isto, JOKIPII e colaboradores⁴¹ explicaram sobre a toxicidade seletiva do metronidazol frente a protozoários

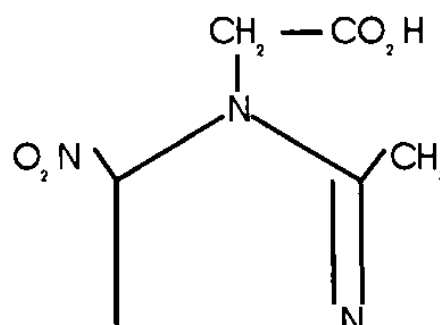
com metabolismo anaeróbico como *Tricomonas*, *Giardia* e *Entamoeba* e bactérias anaeróbicas como *Bacteroides fragillis* e *Clostridium difficille*. Em células humanas normais onde há oxigênio, a reação de redução não ocorre. WEBSTER⁹² incluiu os microaerofílicos e células anóxicas ou hipóxicas. DOLLERY²² mencionou a ação do metronidazol também a outras bactérias anaeróbicas como *Fusobacterium*, *Peptococcus* e *Peptoestreptococcus*. A maioria destes microrganismos são inibidos com concentrações de até 6,0 mg/L deste fármaco. O metronidazol apresenta uma certa atividade contra anaeróbicos facultativos como *Gardenerella vaginalis* e *Campylobacter fetus*.

A absorção do metronidazol quando da administração oral é quase completa sendo que após uma hora da ingestão de 500 mg, detecta-se cerca de 10 µg/mL no sangue²². A meia vida no plasma é de 8 horas e a ligação à proteínas plasmáticas é de 10%. Alcança facilmente tecidos e fluidos biológicos podendo ser encontrado na saliva, leite, líquido seminal, secreção vaginal e líquido cefalorraquidiano⁹².

Sua metabolização é hepática e os seus dois principais metabólitos são resultantes da oxidação de suas cadeias laterais⁹¹. O metabólito maior do metronidazol é o 1-(2-hidroxi-etil)-2-hidroxi-metil-5-nitroimidazol (IV), e o menor trata-se de um metabólito ácido, denominado 1-ácido acético-2-metil-5-nitroimidazol (V). O metabólito maior é mais ativo que o próprio metronidazol para o casos de infecção desenvolvidos por *Gardenerella vaginalis*.



IV



V

A eliminação do metronidazol e seus metabólitos é renal. Após 48 horas da administração, cerca de 15% da dose total de fármaco, 35% do seu metabólito maior e 15% do metabólito ácido podem ser detectados na urina²². A urina dos pacientes pode apresentar-se com coloração acastanhada em consequência de pigmentos originados na decomposição do fármaco.

Em termos de toxicidade e efeitos colaterais, os sintomas mais comuns relatados são cefaléia, náusea, boca seca e gosto metálico, podendo eventualmente aparecer vômito, diarreia e desconforto abdominal. Vertigens, convulsões, má coordenação podem ser observados o que exige interrupção no uso do medicamento⁹².

Além das aplicações clínicas consideradas clássicas e já descritas, outras pesquisas vem sendo desenvolvidas e os resultados tem se mostrado promissores.

A propriedade de condicionar reflexo de aversão ao álcool, faz do metronidazol um medicamento de auxílio no tratamento de alcoólatras crônicos^{22,82,92}.

Considerando sua capacidade de causar mutagenicidade pela alteração no código genético e de atuar preferencialmente em ambientes isentos de oxigênio, vem sendo utilizado para potencializar os efeitos da radioterapia em células hipóxicas ou anóxicas de tumores^{22,66,92}.

A eficácia do fármaco sobre bactérias como *Bacteroides fragillis* e *Clostridium difficile* já é conhecida como apontou WEBSTER⁹². Com referência ao *C. difficile*, bacilo gram negativo anaeróbico, RYAN⁷⁰ descreveu-o como o mais comum patógeno entérico responsável por cerca de 20% das diarreias pós-antibioticoterapia e pelos casos de colite pseudomembranosa. A ação inflamatória no cólon é consequência de 2

potentes toxinas, produzidas pelos microrganismos que podem desenvolver desde um simples quadro diarreico até perfuração intestinal. Outros fatores como radioterapia e uso de agentes neoplásicos com conseqüente comprometimento da flora intestinal, predispõe a colonização deste bacilo. Segundo o autor, um paciente internado por qualquer outra razão se constitui em alvo fácil podendo desenvolver o quadro, implicando na permanência por tempo maior no hospital além do custo e risco. Os medicamentos de escolha são a vancomicina e metronidazol sendo preferencialmente este, em função de custos e efeitos colaterais menores.

STEVENS e colaboradores⁸⁰ verificaram a eficácia de alguns antibióticos e metronidazol na prevenção da gangrena gasosa em ratos, desenvolvida por *Clostridium perfringes*, e compararam os resultados com aqueles obtidos com a aplicação de penicilina. Este teve por base outro trabalho onde empregou-se tetraciclina associada ao metronidazol na profilaxia de infecção causada por *C. perfringes* e *C. tetani* em ratos. As respostas referentes ao imidazol foram eficazes e proporcionais às doses empregadas, com a devida atenção quanto a dose tóxica.

O trabalho de McNULTY e colaboradores⁵³ objetivou avaliar a susceptibilidade do *Campilobacter pyloridis* frente a 11 agentes antimicrobianos, entre eles o metronidazol. Pacientes portadores de gastrite comprovada histologicamente, apresentaram este microrganismo na mucosa gástrica, protegidos da acidez pela camada de muco própria do estômago. Após retirada de material por endoscopia e o ensaio microbiológico, foi detectada uma concentração inibitória mínima para o metronidazol, igual a 1 µg/mL conseguindo atingir a 80 % das cepas do microrganismo.

Na revisão da literatura, muitos trabalhos relacionaram aos casos de gastrite e úlcera gástrica, a presença de uma bactéria microaerófila denominada *Helicobacter pylori*. WASH & PETERSON⁸⁹ apontaram que 95%

de portadores de úlcera duodenal e 80% daqueles com úlcera gástrica, estavam infectados com este microrganismo. O diagnóstico foi possível pela endoscopia, biópsia da mucosa gástrica e por uma metodologia não invasiva. Este método denominado breath urea test, baseia-se em reações químicas com a decomposição de uréia marcada (com radioisótopos ou C₁₃) pela urease. Esta enzima é encontrada em grande quantidade nos locais onde existe colonização da bactéria. Os produtos formados, amônia e dióxido de carbono, são então rapidamente absorvidos e detectados no ar expirado. COELHO e colaboradores¹⁸ utilizaram-se deste teste para detectar a bactéria e com a repetição em diferentes tempos, avaliou-se a erradicação ou não da mesma. Quando da escolha da droga ideal, há de se considerar a formulação e o sal uma vez que o microrganismo está protegido pelo muco gástrico. Ressaltam-se ainda, a importância da frequência e duração do tratamento além do alerta sobre a inativação de algumas drogas frente ao pH do estômago e por alimentos^{3,18,35}. Há unanimidade entre os autores estudados quanto ao esquema terapêutico. Apesar de contarem com mono e dupla terapia, a combinação de sais de bismuto, amoxicilina ou tetraciclina, e metronidazol é a que vem trazendo os melhores resultados. HARRIS & MISIEWICZ³⁵ relataram também o emprego da quadrupla terapia que associa sais de bismuto, tetraciclina, metronidazol e omeprazole, um inibidor de secreção ácida. No trabalho são descritos cerca de 100 esquemas terapêuticos com seus respectivos resultados. Mesmo com estes dados, afirmaram não haver um programa ideal para erradicação do *Helicobacter pylori*, considerando que nas mais diferentes partes do mundo onde este foi pesquisado, os microrganismos apresentaram comportamentos distintos além de terem utilizado outros antibióticos que não aqueles das experiências. Nos países onde os sais de bismuto não são permitidos, foi sugerida a substituição pela furazolidona¹⁸. A duração do tratamento variou de 10 a 15 dias com erradicação do *H. pylori* em cerca de 90% dos casos^{3,89}. Pelo fato da monoterapia com metronidazol induzir a alta resistência à bactéria, naqueles

países onde giardíase e amebíase são endêmicas o uso deste fármaco deve ter atenção redobrada. A associação de antiácidos e bloqueadores H₂ como ranitidina, também foi comentada^{18,89}. PATCHETT e colaboradores⁶⁰ fizeram estudos prospectivos para examinar os efeitos da erradicação do microrganismo nos sintomas e histologia do antro gástrico em pacientes com dispepsia não ulcerosa. O tratamento adotado foi a tripla terapia.

A necessidade na adoção de terapia associada a 1 ou 2 outros fármacos, na maioria antibióticos, como cefalosporinas, penicilinas, tetraciclina e cloranfenicol levou TRISSEL⁸³ a relacionar as principais associações e alguns aspectos da estabilidade destas soluções. O trabalho de BELLIVEAU⁷ procurou avaliar a estabilidade da cefotaxima sódica associada ao metronidazol em solução fisiológica. REIMUND e colaboradores⁶⁵ relataram o tratamento de septicemia com metronidazol associado à amicacina e cefmenoxima.

O tratamento de periodontites onde o metronidazol é empregado considerando sua eficácia contra bactérias anaeróbicas foi descrita por SRIDEVI⁷⁹ e PEDRAZOLLI e colaboradores⁶¹. Estes últimos, descreveram a aplicação tópica na forma de gel dental com 25% de metronidazol e os resultados foram mais efetivos que aqueles encontrados no tratamento convencional. Com isto ficou evidente a ausência dos efeitos colaterais comuns quando se faz a administração por outras vias.

Vários trabalhos vem apresentando outras aplicações para o metronidazol como no tratamento de blefarites⁵¹, controle da halitose⁹⁰ e na preparação de formas farmacêuticas alternativas para aplicação tópica do fármaco em periodontia⁹⁴.

2.4 - METODOLOGIA ANALÍTICA

Considerando o interesse na aplicação clínica do metronidazol, sua importância no que se refere à saúde pública aliada ao grande número de medicamentos encontrados no Brasil, procurou-se levantar diferentes métodos analíticos para este fármaco.

2.4.1 - Métodos volumétricos

A baixa basicidade do metronidazol impossibilitando seu doseamento em meio aquoso, aliada às vantagens do doseamento em meio não aquoso como rapidez, exatidão e a análise sem a necessidade de um tratamento prévio da amostra, permitem a perfeita aplicação da titulação com ácido perclórico em ácido acético na determinação deste fármaco. Nesta metodologia, a característica química da amostra a ser analisada é importante para a escolha adequada do solvente, da solução titulante e do indicador^{33,46}.

Já foi estabelecido que propriedades básicas são realçadas na presença de um ácido, e vice-versa. Se uma substância com basicidade fraca é solubilizada em um determinado solvente, este terá que apresentar caráter básico inferior para que a reação preferencialmente ocorra entre a solução titulante e a amostra a ser titulada. Para o metronidazol, a solução de ácido perclórico em ácido acético glacial é a indicada uma vez que, esta associação propicia a formação de um agente doador de prótons mais forte, no caso o íon acetônio ($\text{CH}_3\text{COOH}_2^+$). Normalmente no controle de qualidade de medicamentos, as bases orgânicas nitrogenadas que constituem a quase totalidade dos fármacos, são doseadas em meio não aquoso usando-se ácido acético glacial como solvente. Entretanto, pode ser empregado um solvente inerte desde que se faça adequado tratamento para garantir a viragem nítida do indicador. Para o doseamento do metronidazol a acetona adicionada de anidrido acético é o solvente mais indicado e apresenta ainda a vantagem, quando da análise de

comprimidos, não dissolver o estearato de magnésio presente na formulação. Este tem a capacidade de consumir ácido perclórico alterando assim o resultado na determinação de metronidazol^{33,45,46}.

Tanto as Farmacopéias Britânicas de 1980⁹ e 1988¹⁰ como a Farmacopéia Brasileira IV edição²⁶ indicam a titulação em meio não aquoso como metodologia oficial para a determinação de metronidazol na forma de matéria prima. A British Pharmacopoeia 1993¹¹ e a última edição da Farmacopéia Brasileira²⁶ adotam a mesma técnica para análise de comprimidos e supositórios de metronidazol. As revisões da USP XX⁸⁵, XXII⁸⁶ e XXIII⁸⁷ adotam a titulação em meio não aquoso para o fármaco em estudo na forma de matéria prima alterando apenas o indicador utilizado. Em se tratando de formas farmacêuticas, a metodologia recomendada é a cromatografia líquida de alta eficiência. A determinação de metronidazol através da titulometria com ácido perclórico e ácido acético glacial na presença de verde malaquita também foi indicada por WEARLEY & ANTHONY⁹¹.

Na Farmacopéia Britânica de 1964 há a descrição para titulação em meio não aquoso com ácido perclórico, tendo como indicador naftolbenzeína. Em 1969, TUCKERMAN & BICAN FISTER⁸⁴ procuraram avaliar comprimidos e supositórios contendo metronidazol pela técnica descrita neste código oficial. Prepararam as experiências sob condições diferentes em relação aos solventes e alteraram também o indicador pelo verde malaquita. Na primeira análise, o fármaco foi dissolvido em anidrido acético levemente aquecido; na segunda experiência o metronidazol foi tratado com acetona quente e adicionado de anidrido acético. Como terceiro ensaio, comprimidos e supositórios foram submetidos à extração com acetona quente seguida de uma filtração por sucção. Aos filtrados reunidos, adicionou-se anidrido acético e para as 3 experiências, procedeu-se à titulação com ácido

perclórico em ácido acético glacial na presença de verde malaquita. Os resultados obtidos com a troca de indicador não foram significativos e perceberam a formação de algum precipitado antes do ponto final da reação. A visualização do ponto final de reação para a solução contendo anidrido acético ficou de acordo com aqueles obtidos quando da aplicação da potenciometria. A solubilização do metronidazol em acetona à temperatura ambiente é pequena, daí a sugestão do aquecimento pelos autores. A não evaporação da acetona e a utilização de funil de vidro sinterizado levou a ganho no tempo de realização da análise. A metodologia analítica adotada pela USP 1990⁸⁶ não indica a extração com acetona quente mas determina o uso de verde malaquita como indicador. Para comprimidos, tanto a British Pharmacopoeia 1993¹¹ como Farmacopéia Brasileira IV²⁶ recomendam a extração com acetona aquecida e filtração. Diferem no indicador sendo recomendado para a técnica inglesa o verde malaquita e para a brasileira, o naftolbenzeína.

Outro método volumétrico sugerido para determinação de metronidazol foi relatado por PARIMOO⁵⁷. A titulação baseada na oxirredução foi precedida da redução do grupo nitro utilizando uma solução contendo tricloreto de titânio, ácido clorídrico reagente e fluoreto de hidrogênio. O excesso de tricloreto de titânio foi titulado com solução de sulfato férrico amoniacal 0,2N na presença de tiocianato de amônia 10%. A amostra de comprimidos foi devidamente tratada eliminando-se os excipientes. Após comparação com os resultados obtidos pelo método oficial, o método descrito mostrou-se de fácil execução não requerendo equipamentos sofisticados nem a preparação de solução de ácido perclórico com as suas implicações técnicas.

2.4.2 - Métodos espectrofotométricos

No levantamento bibliográfico alguns trabalhos foram encontrados apresentando a aplicação da espectrofotometria no visível, no ultravioleta e espectrofotometria derivada para determinação de metronidazol, como matéria prima ou em formulações.

2.4.2.1 - Espectrofotometria no visível

Em 1968, POPULAIRE e colaboradores⁶³ propuseram um método colorimétrico para a determinação do metronidazol e seu derivado carboxílico em fluidos biológicos como soro e urina. O método teve por base a redução do nitro grupo com tricloreto de titânio originando uma amina que condensada com p-dimetilaminobenzaldeído formou um composto alaranjado. O máximo de absorção ocorreu em $494 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. Várias condições experimentais foram estudadas como a influência das variáveis tempo e temperatura para a redução e volume ideal da solução de tricloreto de titânio frente a quantidade do nitroimidazol a ser analisada. O trabalho estabeleceu como limite inferior de sensibilidade $0,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ do fármaco fixando em 15 minutos o tempo para a redução a uma temperatura de $20^\circ - 22^\circ\text{C}$. Para quantidades entre 100,0 e 200,0 mg de metronidazol recomendaram 0,1 mL de solução de tricloreto de titânio e observaram após aplicação da metodologia ao derivado nitroimidazólico, apenas coloração ligeiramente mais fraca.

A determinação colorimétrica de alguns nitroimidazóis com substituintes em N1 e N5 foi estudada por LAU e colaboradores⁴⁸. O composto após ser submetido à hidrólise alcalina, promoveu a liberação de íons nitrito que em contato com sulfanilamida formou um sal de diazônio. Este ao reagir com N-1-naftiletilenodiamina (ou reativo de Bratton-Marshall) desenvolveu coloração rósea que foi avaliada espectrofotometricamente. Os autores afirmaram que

solução de hidróxido de sódio 0,1N e banho maria fervente com aquecimento por 2 horas seriam as condições ideais para a hidrólise quantitativa dos compostos estudados. O método foi considerado simples, rápido, seletivo e sensível uma vez que uma concentração de 0,1 µg/mL foi detectada.

O trabalho de SANYAL⁷² apresentou um breve comentário dos métodos até então existentes para as diferentes formas farmacêuticas contendo metronidazol, ressaltando a inviabilidade nas aplicações. Na proposição do autor, amostras de comprimidos foram inicialmente tratadas com acetona quente. Em seguida procedeu-se a hidrólise com solução de hidróxido de sódio 2N e aquecimento em banho maria por 15 minutos após o qual foram acrescentadas, sulfanilamida e reativo de Bratton-Marshall. O composto colorido teve as absorvâncias determinadas a 538 nm. Considerou também a dificuldade de doseamento do benzoilmetronidazol pelo método oficial (titulação em meio não aquoso) e sugeriu para este a técnica por ele apresentada. Nas conclusões são confirmadas duas características do método: a seletividade uma vez que a formação de íons nitrito formados durante a hidrólise não ocorre com outros componentes geralmente empregados na formulação; e a sensibilidade porque foi possível trabalhar com concentrações da amostra suficientemente reduzidas a ponto de outros compostos não interferirem na análise. Segundo o autor, esta metodologia pode ser aplicada a injetáveis.

Na análise de 2 nitroimidazóis presentes em comprimidos, metronidazol e tinidazol, DEVANI e colaboradores²⁰ sugeriram a espectrofotometria baseada na reação destes fármacos com o pentacianoaminoferrato de sódio originando produto colorido róseo-amarelado, com leitura a 510 nm. A coloração foi estável por cerca de 1 hora e a lei de Lambert-Beer foi atendida no intervalo de 40,0 a 160,0 µg/mL de metronidazol.

BHATKAR & CHODANKAR⁶ propuseram análise colorimétrica rápida para o metronidazol em produtos farmacêuticos. Após extração, a solução clorofórmica contendo o princípio ativo foi tamponada a pH 4,4. Em seguida acrescentou-se solução de azul de bromotimol 0,04% e o produto colorido resultante apresentou máximo de absorção a 440 nm. Foram avaliados comprimidos, xaropes e cápsulas. O teste de recuperação aplicado demonstrou bons resultados e o método foi considerado rápido, sensível e exato com a vantagem dos outros constituintes das fórmulas não interferirem nos resultados por esta metodologia.

Amostras de comprimidos e xarope de contendo metronidazol foram analisadas por 2 técnicas descritas por SANGHAVI & CHANDRAMOHAN⁷¹. O primeiro experimento iniciou-se com a adição de uma solução de hidróxido de sódio a 20% à solução de metronidazol. O produto colorido formado foi estável por 12 minutos com absorção no visível a 499 nm. Com relação ao outro método, a solução contendo o fármaco foi submetida a redução na presença de zinco e ácido clorídrico reagente. Ao composto reduzido acrescentou-se solução de vanilina. O complexo colorido formado apresentou-se estável e a leitura espectrofotométrica revelou como máximo de absorção 412 nm. Com os resultados, os autores concluíram que o segundo método baseado na formação de uma base de Schiff é mais estável, sensível e preciso. No entanto, os valores encontrados com a aplicação dos dois métodos mostraram-se concordantes com aqueles declarados. A precisão da análise e as quantidades recuperadas apontaram para o aproveitamento dos métodos.

A partir do composto obtido com a redução do metronidazol na presença de zinco em meio clorídrico, MOUSSA⁵⁶ propôs a reação com dimetilaminocinamaldeído e o produto formado apresentou absorção máxima a 510 nm. Ficaram estabelecidas algumas condições ideais de reação como volume de 4,0 mL do reagente cromogênico, aquecimento da solução em

análise por 20 minutos a 70°-80°C, estabilidade da coloração por 2 horas e concentração no intervalo de 50,0 a 400,0 µg/mL de metronidazol a que obedece a lei de Lambert-Beer. Comparado a outros métodos, este mostrou-se mais sensível e foi aplicado a suspensão e comprimidos vaginais.

Comprimidos, xaropes e injetáveis preparados com metronidazol foram analisados segundo o método espectrofotométrico com redução do nitro grupo na presença de zinco e meio ácido seguida da reação de diazotação e acoplamento. Para estas foram usadas soluções de nitrito de sódio, ácido sulfâmico e β - naftol . GANDHI e colaboradores²⁸ procederam a leitura do produto colorido formado em 480 nm e o intervalo de concentração ideal ficou entre 10,0 e 80,0 µg/mL.

KAMALAPURKAR & PRIOLKAR⁴² sugeriram a redução do metronidazol também com zinco e ácido clorídrico, e subsequente reação de acoplamento com furfuraldeído 1%. O produto amarelo formado mostrou-se estável por 2 horas com λ máximo de 395 nm e obediência a lei de Lambert-Beer no intervalo de 10,0 a 160,0 µg/mL. O método apresentado foi aplicado a comprimidos e suspensões e segundo os autores, os outros componentes das amostras não demonstraram interferência na determinação do princípio ativo.

Em 1988, SASTRY & ARUNA⁷⁶ relataram uma experiência que objetivou determinar alguns agentes antihelmínticos e amebicidas. Dentre estes últimos, foram avaliados os nitroimidazóis mais utilizados: metronidazol, benzoilmetronidazol e tinidazol. Após a redução, também com zinco em meio clorídrico, utilizaram a benzotiazolinona hidrazona (MBTH) como reagente cromogênico. O produto colorido formado apresentou λ máximo a 420 nm e estabilidade de 15 minutos. Em se tratando de benzoilmetronidazol, houve a necessidade de extração precedendo a análise propriamente dita. O método foi considerado pelos

autores de simples execução e sensível com razoáveis precisão e exatidão, quando comparados a outros métodos.

SASTRY e colaboradores⁷⁵ reagiram a amina primária formada a partir do metronidazol após sua redução com zinco e ácido clorídrico, com solução de metol 0,2% (sulfato de 4-metilamino fenol) e dicromato de potássio 0,01M. Foram avaliados por este método metronidazol, benzoilmetronidazol, tinidazole e niclosamida, na forma de matéria prima e medicamentos. Condições experimentais como reação de redução à temperatura ambiente por 20 minutos e leitura do produto formado a 720 nm até 10 minutos foram estabelecidas. Como agente oxidante foi escolhido o dicromato de potássio que apresentou, maior sensibilidade frente a outros agentes testados. De acordo com os autores, o método mostrou-se simples, sensível e livre da interferência dos outros compostos geralmente presentes em medicamentos associados.

HASSAN e colaboradores³⁶ num estudo para determinação geral de nitrocompostos propuseram método espectrofotométrico baseado na diferença entre as absorbâncias do composto íntegro e do seu derivado reduzido. A redução neste caso, tanto pode ser feita com zinco em meio clorídrico formando uma amina primária, como com solução de cloreto de amônia 10% originando hidroxilamina. Para análise de metronidazol os autores sugeriram como solvente a água e um tempo de redução para qualquer dos agentes empregados de 10 minutos. O máximo de absorção encontrado para um intervalo de concentração entre 0,2 a 10,0 mg/ 100 mL foi de 320 nm e os resultados obtidos, comparando-se os dois agentes redutores, não revelaram diferenças significativas.

SASTRY e colaboradores⁷⁷ propuseram após a redução do metronidazol e seu éster com zinco, a reação com N-N-dimetilfenilenodiamino 0,05% e cloramina 0,4% na presença de tampão. Os espectros de absorção

revelaram como máximo de absorção 540 nm e os intervalos entre 3,0 a 24,0 µg/mL de metronidazol e 6,0 a 50,0 µg/mL de benzoilmetronidazol mostraram-se como os que obedecem a lei de Lambert-Beer. As amostras foram previamente tratadas com acetona quente e dos oxidantes experimentados a cloramina propiciou a formação de compostos mais estáveis e sensíveis. Ao afirmarem que o método é simples, rápido e sensível consideraram que o método titulométrico em meio não aquoso não oferece seletividade aliado a baixa sensibilidade; e que a espectrofotometria no UV compromete a exatidão em função da interferência dos excipientes presentes em comprimidos e xaropes.

Considerando a existência de formulações farmacêuticas onde o metronidazol é associado a outros princípios ativos como fosfato de cloroquina, iodohidroxiquinolina, extrato de beladona e furazolidona, SETHI⁷⁸ adotou para análise do nitroimidazol o princípio da redução com zinco e ácido clorídrico, originando uma amina primária. Esta foi então submetida à reação de diazotação na presença de nitrito de sódio 1% e sulfamato de amônia 0,5%. O sal de diazônio formado foi acoplado ao reativo de Bratton-Marshall originando um composto róseo. O λ máximo determinado foi igual a 550 nm podendo o método ser aplicado a comprimidos e suspensões.

A determinação espectrofotométrica de alguns antihelmínticos e nitroimidazóis baseada na capacidade destes compostos em formarem complexos coloridos solúveis em água, após reação com nitroprussiato de sódio e cloreto e hidroxilamônia em meio alcalino foi proposta por SASTRY e colaboradores⁷⁴. As soluções das amostras de comprimidos e xarope tiveram as absorbâncias determinadas a 660 nm e o produto colorido mostrou-se estável por 2 horas. Não requereu nenhum tratamento preliminar e os resultados obtidos foram concordantes com aqueles obtidos através da metodologia descrita na USP de 1980. De acordo com os autores os outros componentes não interferiram no ensaio.

2.4.2.2 - Espectrofotometria com absorção no UV

Métodos espectrofotométricos no UV vem sendo estudados e adaptados para determinação de metronidazol em formulações farmacêuticas, assim como o comportamento dos adjuvantes presentes. FABAYO & GRUDZINSKI²⁵ teceram considerações preliminares sobre a titulação em meio não aquoso e a espectrofluorimetria. Foi objeto de estudo, a determinação do comprimento de onda ideal para soluções padrão do nitroimidazol preparadas em diferentes intervalos de pH visando aplicação posterior na análise de comprimidos. Foram preparadas 3 soluções contendo metronidazol; uma aquosa, outra em ácido clorídrico 0,1N e a terceira em hidróxido de sódio 0,1N. A concentração das soluções de leitura foi igual a 100,0 µg/mL do fármaco. O máximo de absorção observado para a primeira solução foi de 319 nm, enquanto que para a solução ácida, 277 nm. Em solução alcalina com pH igual a 12,2 o anel imidazólico parece ser rompido inviabilizando a análise nesta faixa de pH. A faixa de concentração que atende a lei de Lambert-Beer foi de 5,0 a 20,0 µg/mL de metronidazol. Com o repouso das suspensões formadas pelo pó dos comprimidos e solução de ácido clorídrico 0,1N e a conseqüente obtenção do sobrenadante límpido, os autores observaram nos valores obtidos, a não interferência dos adjuvantes no ensaio. Após avaliação estatística dos resultados das diferentes amostras de comprimidos e a comparação através da metodologia oficial, os autores afirmaram a alta precisão do método proposto.

O comportamento do metronidazol quando em solução de ácido clorídrico 0,1N com leitura espectrofotométrica a 277 nm também é um procedimento auxiliar na sua identificação em produtos farmacêuticos^{11,17,26}.

WEARLY & ANTHONY⁹¹ sugeriram para análise espectrofotométrica no UV do metronidazol, uma solução de ácido sulfúrico 0,1N em metanol com leitura a 274 nm.

Um método espectrofotométrico no UV usando simultaneamente 2 comprimentos de onda para a análise de metronidazol associado ao furoato de diloxanida em comprimidos, foi proposto por CHATTERJEE e colaboradores¹⁴. As amostras não requereram tratamento prévio e foram preparadas em metanol. O espectro de absorção revelou como λ máximo 311 nm para o metronidazol e 259 nm para o outro fármaco. O trabalho constou ainda da avaliação dos dois princípios ativos pela espectroscopia diferencial onde os mesmos foram preparados em soluções ácida e alcalina. A solução alcalina de metronidazol apresentou máximo de absorção a 267 nm enquanto que a solução ácida, 322 nm. Após aplicação em amostras, os autores consideraram os resultados dos dois métodos precisos e reprodutíveis.

A associação de metronidazol e furazolidona em comprimidos e suspensões tem sido comum para ação antiprotozoária. CHATTERJEE, JAIN & SETHI¹⁵ estudaram a espectrofotometria simultânea destes fármacos sem a necessidade de separação prévia e solubilização em solução aquosa de dimetilformamida. O espectro obtido no UV determinou λ máximos de 320 nm e 367 nm para MTD e furazoliona, respectivamente. Os resultados foram calculados pela resolução de um sistema de equação de 2 incógnitas revelando precisão e reprodutibilidade, além da facilidade na execução da análise.

Baseados nos mesmos princípios descritos acima, CHATTERJEE e colaboradores¹⁶ propuseram a análise de metronidazol, benzoilmetronidazol e di-iodohidroxiquinolina presentes em comprimidos e suspensões. As soluções de leitura foram preparadas em dimetilformamida,

metanol e hidróxido de sódio 0,02N. Para o metronidazol e seu éster, o λ máximo determinado no espectro foi igual a 320 nm. Os dados analíticos encontrados afirmaram ser o método preciso e reprodutível não sofrendo interferência dos excipientes e adjuvantes.

Ainda atendendo ao princípio da determinação simultânea de fármacos através da espectroscopia no UV, TALWAR e colaboradores⁸¹ propuseram método simples e barato para análise de comprimidos contendo metronidazol e furoato de diloxanida. As amostras solubilizadas em uma solução contendo metanol, água e hidróxido de sódio 0,01N apresentaram máximo de absorção em 247 nm para o furoato e 320 nm para o metronidazol. O teste de recuperação para o nitroimidazol apontou após 5 análises, uma média de 101 %.

DAS, DAS & RAY¹⁹ ao considerarem a determinação do metronidazol associado à furazolidona afirmaram que os métodos espectrofotométricos disponíveis para a quantificação dos 2 fármacos quando em associação, eram trabalhosos exigindo maior tempo na análise. A proposta dos autores foi um método na região do UV, simples, sensível e preciso para determinação dos dois fármacos sem que houvesse a necessidade de prévia separação. Especificamente ao nitroimidazol, este foi solubilizado em solução aquosa de dimetilformamida de maneira a apresentar uma concentração igual a 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida foi feita uma varredura no intervalo de 200 a 400 nm ficando evidente a absorção máxima em 320 nm. O intervalo de concentração onde se observou a linearidade foi entre 0 e 40,0 $\mu\text{g/mL}$ de metronidazol. Foram analisados comprimidos e suspensões contendo os 2 fármacos e com a avaliação estatística dos resultados foram confirmados a precisão e reprodutibilidade. A utilização de reagentes simples vem reforçar a indicação deste método para análise rotineira de formulações contendo os 2 fármacos.

Relacionando a importância da posição 5 na estrutura imidazólica com a liberação de íons nitrito após hidrólise, SANYAL⁷³ sugeriu metodologia para análise de metronidazol e benzoilmetronidazol. A hidrólise alcalina promoveu a formação de um produto com leitura no espectro UV a 276 nm. O autor afirmou ao comentar o método descrito por WEARLY & ANTHONY⁹¹, que os excipientes usados em comprimidos freqüentemente influenciam a análise pelo método na região do UV. Tanto a solução padrão de benzoilmetronidazol como das suspensões foram submetidas à hidrólise na presença de hidróxido de sódio 4N em banho maria por 15 minutos. Foram preparadas outras soluções sem submetê-las à hidrólise. Todas as soluções preparadas foram posteriormente acidificadas com ácido clorídrico 5N. As absorbâncias das soluções contendo tanto o fármaco íntegro como hidrolizado foram determinadas a 276 nm. O espectro de absorção revelou que o pico neste comprimento de onda desapareceu quando se analisou as soluções hidrolizadas. Ficou estabelecido o intervalo de concentração entre 3,0 a 18,0 µg/mL como o que obedece a lei de Lambert-Beer. Os resultados obtidos por este ensaio foram semelhantes aos encontrados com a análise das amostras segundo método colorimétrico proposto pelo próprio autor⁷². Ficou evidente com as experiências realizadas, a não interferência na região do UV dos compostos fenólicos como parabenos e vanilina, compostos comumente presentes em suspensões.

Comprimidos e cremes contendo cetoconazol e metronidazol foram analisados pelo método sugerido por AKPINAR, GÜNDEN GÖGER & ORBEY². O metronidazol foi preparado em metanol e analisado em 3 comprimentos de onda: 313 e 330 nm na espectrofotometria convencional e 323 nm para a derivada. Os resultados obtidos com a análise de comprimidos não revelaram diferenças significativas em função da mudança no comprimentos de onda.

2.4.2.3 - Espectrofotometria derivada

Excipientes comumente usados na preparação de suspensões e xaropes apresentam interferência quando de uma análise espectrofotométrica. Constitui-se no tratamento mais comum, a extração da droga implicando em maior tempo para execução da análise possibilitando comprometimento na quantificação do fármaco. O método de espectrofotometria derivada proposto por EBOKA & ADESANYA²⁴ visou resolver os problemas de sobreposições e interferências observados nos espectros destas formas farmacêuticas. As amostras foram avaliadas pela espectrofotometria convencional, de primeira e segunda derivadas e os resultados apresentados, após teste da adição do padrão, revelaram que o melhor procedimento foi aquele obtido com a segunda derivada.

GALAL, BEDAIR & EL-SAYED²⁷ sugeriram a aplicação da espectrofotometria derivada para comprimidos de metronidazol e furoato de diloxanida uma vez que o espectro convencional apresentou sobreposições comprometendo seletividade e sensibilidade. Com relação ao nitroimidazol, foi necessário proceder a extração com clorofórmio para a análise da D1 contornando alterações do espectro. Para a análise da segunda derivada, a amostra foi submetida a duas condições: à mesma extração descrita anteriormente e à leitura direta, e os resultados não apontaram diferenças significativas. As soluções de análise foram preparadas em ácido clorídrico 0,1N e o valores de λ máximo encontrados para o metronidazol na primeira e segunda derivadas foram respectivamente, 288 e 236 nm. Os autores recomendaram a análise na segunda derivada para comprimido contendo os dois fármacos e o coeficiente de variação obtido foi inferior a 2%.

2.4.3 - Métodos cromatográficos

PARIMOO e colaboradores⁵⁸ empregaram a cromatografia em

camada delgada para análise qualitativa do metronidazol associado à di-iodohidroxiquinolina em comprimidos. O método envolveu a separação dos dois compostos com dimetilformamida e centrifugação. Com o cromatograma revelado procedeu-se a extração do metronidazol com ácido clorídrico 0,1N e leitura no UV a 280 nm. Os coeficientes de variação encontrados foram inferiores a 1%.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada por GUPTA³² para determinação de metronidazol em comprimidos. Para a análise utilizou-se coluna semipolar Bondapak com partículas de 10 μm e o eluente escolhido foi fosfato de potássio 0,02M com pH igual a 4,2. O método mostrou-se exato e a precisão encontrada foi igual a 0,68% calculada sobre 6 ensaios. Como padrão interno foram sugeridos acetoaminofen ou fenilpropanolamina. Na análise do pó dos comprimidos, não houve necessidade de extração prévia e os excipientes não mostraram interferência. Uma solução contendo o fármaco e submetida a aquecimento em banho maria fervente por 25 minutos apresentou um cromatograma onde a potência ficou próxima de 0%. Ao constatar isto, o autor sugeriu o método como indicador de estabilidade podendo ser usado também no teste de uniformidade de comprimidos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é o método preconizado na última revisão da USP⁸⁷. Esta técnica é empregada para a análise de gel, injetável e comprimidos contendo metronidazol. Para o gel, são indicados uma fase móvel constituída de tampão fosfato, água e metanol; um detector a 245 nm e coluna de 4,6 mm X 25 cm com partículas de 5 μm (L7). Para os injetáveis utiliza-se a mesma fase móvel tomando o cuidado na correção do pH à 4,0 com ácido fosfórico; a coluna indicada é a mesma da descrição anterior com partículas de 1 μm (L1) e detector a 320 nm. Para comprimidos a fase móvel constitui-se na mistura água-metanol

(80:20); detector a 245 nm e coluna de 4,6 mm X 15 cm e partículas L7.

A importância clínica do metronidazol estimulou a pesquisa de metodologias para sua determinação em amostras de origem biológica. Para estes casos, a HPLC vem sendo o método que reúne as maiores possibilidades. Vários autores estudaram o emprego desta técnica em diferentes circunstâncias aplicando-a em amostras de soro^{68,93} plasma e fezes⁴⁷, plasma e urina^{40,50}, plasma³⁴, soro e urina¹ e tecido vaginal⁸⁸.

A técnica da cromatografia gasosa por detecção de captura de elétrons, foi utilizada por BHATIA & SHANDBHAG⁵ na análise de nitroimidazóis como metronidazol, ornidazol, secnidazol, tinidazol e satranidazol. Em função das diferenças estruturais, condições cromatográficas distintas foram aplicadas utilizando padrões internos convencionais sem a necessidade de extrações mais trabalhosas.

2.4.4 - Outros métodos

Métodos polarográficos foram introduzidos para proporcionar análises mais específicas para muitas substâncias orgânicas, principalmente quando existe a interferência de excipientes comumente usados em formulações. São vários os grupos de substâncias químicas de interesse farmacêutico susceptíveis à redução polarográfica. Entre estes encontram-se aldeídos, cetonas e nitrocompostos. A característica que chama a atenção nesta técnica é a redução de caráter quase irreversível no nitro grupo da amostra em análise³⁰.

WEARLEY & ANTHONY⁸¹ sugeriram a análise polarográfica do metronidazol a partir de uma solução padrão contendo 5,0 µg/mL preparada em tampão 4; o pico máximo foi de aproximadamente -0,23 volts frente a eletródos saturados de calomelano.

A atividade polarográfica de compostos nitroimidazólicos é atribuída à redução de seus nitro grupos. Os picos são dependentes do pH no qual trocam mais potencial negativo com a diminuição da acidez. Com estas considerações, BROOKS e colaboradores¹² desenvolveram metodologia para análise de alguns nitroimidazóis entre eles o metronidazol em plasma e urina. Neste trabalho os autores reviram a necessidade de precipitar as proteínas plasmáticas uma vez que estas interferem na análise, assim como foi necessário tamponar a amostra de urina para pH próximo a 7. Como etapa seguinte, extraíram os nitrocompostos com acetato de etila procedendo em seguida, a separação por cromatografia em camada delgada para assegurar especificidade. Os resíduos foram então solubilizados em hidróxido de sódio 0,1N e analisados pela polarografia de pulso diferencial. Os resultados apresentados foram considerados satisfatórios.

INAMDAR & MODY³⁸ propuseram no trabalho um método baseado na gravimetria, onde ácido túngstico forma com o metronidazol um complexo insolúvel em mistura de álcool:clorofórmio (1:5) com estrutura igual a $\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 4\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$. A quantidade de ácido túngstico necessária para obtenção de resultados quantitativos foi a proporção de 5,0 mL do reagente para cada 50,0 mg de metronidazol. As amostras de comprimidos foram avaliadas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos segundo metodologia descrita na Farmacopéia Britânica de 1973. As suspensões também foram submetidas ao método proposto. Os valores encontrados com a aplicação do teste de recuperação para as duas formas farmacêuticas ficaram próximos a 99%. Em conjunto, os valores apresentados significaram um método exato e reprodutível sem exigir equipamentos caros e sofisticados.

HIRSCHL, HIRSCHL & ROTTER³⁷ fizeram comparação de 3 métodos microbiológicos para determinar a sensibilidade do *Helicobacter pylori* frente ao metronidazol. Foram avaliados os métodos em ágar diluído,

difusão de disco e teste Epsilonometer (E-test) utilizando-se 86 cepas da bactéria, sendo destas 16 com comprovada resistência ao fármaco. O meio de cultura utilizado para os três testes foi o de Mueller-Hinton enriquecido com 5% de sangue de carneiro. Os resultados encontrados para os dois últimos testes, após avaliação estatística foram sensivelmente significativos., quando comparados ao método do ágar diluído tomado como referência. Os autores recomendaram para a rotina laboratorial visando a determinação da sensibilidade da bactéria frente ao metronidazol, o E-test em função da exatidão, precisão e simplicidade na realização da análise.

3 - PROPOSIÇÃO

Foi realizada uma análise crítica de alguns métodos analíticos para doseamento do metronidazol em medicamentos. Após algumas experiências preliminares e considerando os parâmetros normalmente exigidos num programa de validação de métodos analíticos no controle de qualidade de medicamentos, o trabalho a ser desenvolvido foi planejado de maneira a cumprir as seguintes etapas:

- a) preparação de uma amostra padronizada de comprimidos contendo metronidazol simulando amostras comerciais, e o seu respectivo placebo;
- b) levantamento das especialidades farmacêuticas existentes no mercado de medicamentos objetivando selecionar amostras para submetê-las aos métodos em estudo;
- c) doseamento do metronidazol presente nas amostras padronizada e comerciais pelo método oficial estabelecido na British Pharmacopoeia 1993¹¹ com ácido perclórico, e do placebo;
- d) estudo do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall avaliando o melhor tempo de hidrólise, os parâmetros espectrofotométricos e analíticos e a sua aplicação nas amostras padronizada e comerciais de comprimidos e suspensões;
- e) estudo do método espectrofotométrico com redução do grupo nitro e reação de Bratton-Marshall avaliando parâmetros espectrofotométricos e analíticos e posterior aplicação em todas as amostras;

- f) estudo do método espectrofotométrico com absorção no ultra violeta, com a avaliação dos parâmetros espectrofotométricos e analíticos com a aplicação nas amostras;

- g) estudo do método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e hidroxilamônia com a avaliação dos parâmetros descritos acima e sua aplicação às amostras padronizada e comerciais de comprimidos e suspensões.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Padrões

As substâncias químicas de referência - metronidazol (MTD) e benzoilmetronidazol (BMTD) identificadas como lotes 17708/1 e 169949/0, respectivamente e apresentando um grau de pureza igual a 99%, foram gentilmente cedidas pela Fundação do Remédio Popular do Estado de São Paulo - FURP.

4.1.2 - Amostras

A partir do padrão de metronidazol e de substâncias de grau farmacêutico, procedentes das distribuidoras Delaware e Galena, preparou-se uma amostra padronizada de comprimidos, simulando formulações encontradas no comércio e a fórmula é descrita abaixo.

metronidazol (MTD)	250,0 mg
lactose.....	50,0 mg
amido	53,0 mg
goma arábica	12,0 mg
estearato de magnésio.....	15,0 mg
total	380,0 mg

Foi preparado também um placebo da amostra padronizada de comprimidos (Ap) nas mesmas proporções estabelecidas na fórmula descrita acima.

Tanto as amostras de comprimidos contendo 250,0 mg de metronidazol como as de suspensões contendo 4% de benzoilmetronidazol, foram adquiridas em farmácias de São Paulo e Maringá. Estão assim discriminadas para comprimidos (A) e suspensões (S):

A1 - data de fabricação 09/95	validade até 09/99	laboratório A
A2 - data de fabricação 02/95	validade até 02/98	laboratório B
A3 - data de fabricação 02/95	validade até 02/98	laboratório C
A4 - data de fabricação 06/93	validade até 06/96	laboratório D
A5 - data de fabricação 07/94	validade até 07/97	laboratório E
A6 - data de fabricação 11/94	validade até 11/97	laboratório F
A7 - data de fabricação 02/95	validade até 02/98	laboratório G

S1 - data de fabricação 11/95	validade até 11/98	laboratório G
S2 - data de fabricação 08/95	validade até 08/98	laboratório A
S3 - data de fabricação 11/94	validade até 11/97	laboratório C
S4 - data de fabricação 04/94	validade até 04/96	laboratório H
S5 - data de fabricação 12/95	validade até 12/97	laboratório F
S6 - data de fabricação 11/94	validade até 11/97	laboratório I

4.1.3 - Reagentes e equipamentos

4.1.3.1 - Método titulométrico em meio não aquoso

- solução de ácido perclórico 0,1N SV
- acetona
- anidrido acético
- solução de verde de malaquita SI
- ácido acético glacial
- biftalato de potássio
- solução de cloreto de metilrosanilina SI
- bureta de 50,0 mL
- erlenmeyer de 250,0 mL
- funil de placa sinterizada
- agitador magnético *Fisatom 702*

4.1.3.2 - Método espectrofotométrico com hidrólise alcalina seguida da reação de Bratton-Marshall

- solução de ácido clorídrico 1N
- solução de hidróxido de sódio 2N
- solução de sulfanilamida 0,35%
- solução de N-1-naftiletilenodiamina a 0,1%
- balões volumétricos de 50,0 e 100,0 mL
- bureta de 50,0 mL
- ampolas de vidro para injetáveis de 5,0 mL
- funil de vidro
- banho maria de 6 bocas *Quimis*
- estufa termorregulável *Fabbe*
- espectrofotômetros *Beckman DB-G; Varian série 634 e Varian Cary I* e cubetas de 1 cm.

4.1.3.3 - Método espectrofotométrico com absorção no UV

- solução de ácido clorídrico 1N
- soluções tampão com pHs variáveis de 1 a 6
- solução de ácido clorídrico 0,1N
- balões volumétricos de 50,0; 100,0 e 200,0 mL
- bureta de 50,0 mL
- espectrofotômetro *Varian Cary I* e cubetas de 1 cm.

4.1.3.4 - Método espectrofotométrico com redução do grupo nitro com zinco em meio ácido e reação de Bratton-Marshall

- ácido clorídrico R
- zinco em pó
- solução de sulfamato de amônia a 0,5%
- solução de N-1-naftiletilenodiamina 0,1%

- solução de nitrito de sódio 0,1M
- balões volumétricos de 50,0 e 100,0 mL
- bureta de 50,0 mL
- banho maria de 6 bocas *Quimis*
- funil de vidro
- espectrofotômetro *Beckman DB-G* e cubetas de 1 cm

4.1.3.5 - Método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia

- nitroprussiato de sódio 2%
 - cloreto de hidroxilamônia 5%
 - hidróxido de sódio 1N
 - balões volumétricos de 10,0; 50,0 e 100,
 - bureta de 50,0 mL
 - espectrofotômetro *Beckman DB-G* e cubetas de 1 cm.
- ***Todos os reagentes e matérias primas utilizados nos métodos de análise descritos acima foram de grau analítico.***

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Titulação em meio não aquoso

O procedimento analítico para as amostras padronizada e comerciais de comprimidos de metronidazol foi semelhante àqueles descritos nas Farmacopéias Britânica¹¹, Brasileira²⁶ e Americana⁸⁷.

4.2.1.1 - Procedimento

A solução de ácido perclórico 0,1N foi preparada em ácido acético e padronizada com biftalato de potássio na presença da solução de cloreto de metirosanilina, como indicador. Após a determinação do peso médio de cada amostra, pesaram-se 10 alíquotas do pó dos comprimidos equivalente a 200,0 mg de MTD. Cada tomada de ensaio foi transferida para um funil de placa sinterizada e tratada sucessivamente com 6 porções de acetona aquecida; os filtrados foram reunidos em erlenmeyer de 250,0 mL e resfriados; adicionaram-se 50,0 mL de anidrido acético e cerca de 0,1 mL de verde de malaquita SI; procedeu-se a titulação com solução de ácido perclórico 0,1N SV.

De MTD padrão, foram pesadas 3 alíquotas iguais a 200,0 mg e também tituladas.

Foi efetuada ainda a titulação do branco (solventes) nas mesmas condições experimentais.

Para avaliação do placebo, foram pesadas 2 alíquotas do pó com peso equivalente às tomadas de ensaio do pó dos comprimidos da amostra padronizada, descontando-se as 200,0 mg de MTD; a seguir, foram submetidas às mesmas condições da análise anterior.

O cálculo foi efetuado considerando que cada mL de ácido perclórico 0,1N equivale a 17,12 mg de MTD.

4.2.2 - Método espectrofotométrico com hidrólise alcalina do metronidazol e reação de Bratton-Marshall na análise de comprimidos

No trabalho original de SANYAL⁷², o método foi desenvolvido considerando o tratamento inicial com hidróxido de sódio 2N em banho maria por 15 minutos. O tratamento resulta na liberação do grupo nitro, que em seguida reage com os componentes do método de Bratton-Marshall originando um produto colorido que apresenta máximo de absorbância a 538 nm. Foi então planejada uma série de experiências, para melhor observação do comportamento do metronidazol por este método.

4.2.2.1 - Avaliação do melhor tempo de hidrólise

4.2.2.1.1 - Hidrólise em banho maria

4.2.2.1.1.1 - Procedimento

Pesaram-se 250,0 mg de MTD padrão que foram transferidas para um balão volumétrico de 100,0 mL e q.s. de HCl 1N; transferiu-se uma alíquota de 20,0 mL para um balão volumétrico de 100,0 mL ajustando-se o volume com água destilada. Esta solução apresenta uma concentração de 25,0 µg/mL de MTD; transferiram-se 5 alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 50,0 mL aos quais foram adicionados 5,0 mL de NaOH 2N; os mesmos foram aquecidos em banho maria em tempos variáveis de 15, 30, 45, 60 e 75 minutos; no intervalo de tempo estabelecido cada solução foi resfriada adicionando-se a seguir 5,0 mL de solução de sulfanilamida 0,35%, 2,0 mL de solução de N-1-naftiletilenodiamina e q.s. de água destilada. A leitura das absorbâncias foi realizada a 539 nm contra branco preparado nas mesmas condições.

4.2.2.1.2 - Hidrólise em ampolas de vidro fechadas

Visando observar o comportamento da reação de hidrólise em alta pressão, foi realizado um ensaio em que a solução de MTD adicionada de base foi acondicionada em ampolas de vidro para injetáveis e aquecidas a cerca de 100° C em estufa.

4.2.2.1.2.1 - Procedimento

Alíquotas de 2,0 mL de uma solução padrão contendo 50,0 µg/mL de MTD, preparada nas mesmas condições do item 4.2.2.1.1.1, foram transferidas para uma série de 5 ampolas de vidro de 5,0 mL; adicionaram-se 2,0 mL de NaOH 2N fechando-as a fogo; foram colocadas na estufa regulada a 100° C ± 2° C e a intervalos de 15 minutos uma ampola foi retirada; após o resfriamento o conteúdo foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL; adicionaram-se os demais reagentes conforme o item 4.2.2.1.1.1. A concentração final das soluções contendo o produto colorido correspondeu a 2,0 µg/mL de MTD e as leituras das absorbâncias foram realizadas a 539 nm contra o branco.

4.2.2.2 - Espectros de absorção

Baseado na experiência precedente, foi realizado um ensaio para obtenção do espectro de absorção. Foram preparadas soluções padrão de MTD em 5 concentrações diferentes com o objetivo de avaliar a proporcionalidade da resposta espectrofotométrica do produto colorido formado em função do teor de metronidazol.

4.2.2.2.1 - Procedimento

Para uma série de 5 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidos sucessivamente 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL da solução padrão contendo 25,0 µg/mL de MTD; adicionaram-se 5,0 mL de NaOH 2N

mantendo-se os mesmos aquecidos no banho maria por 30 minutos; a reação colorimétrica foi conduzida conforme descrição no item 4.2.2.1.1.1. As concentrações finais de leitura corresponderam a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as absorvâncias das soluções coloridas foram determinadas a intervalos regulares entre 400 e 600 nm contra o branco.

4.2.2.3 - Curva de Ringbom

4.2.2.3.1 - Procedimento

Para uma série de 20 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas alíquotas que variaram de 0,5 a 10,0 mL da solução padrão contendo 25,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD; os volumes foram ajustados para 10,0 mL com água destilada; após a adição de NaOH 2N, os balões foram mantidos no banho maria por 30 minutos; os balões foram resfriados e os demais reagentes acrescentados conforme item 4.2.2.1.1.1. As concentrações finais de leitura variaram de 0,25 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as transmitâncias foram determinadas a 539 nm contra o branco.

4.2.2.4 - Reta de calibração

Com base na experiência descrita acima, foi realizado o ensaio para determinação da reta de calibração.

4.2.2.4.1 - Procedimento

Para uma série de 10 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas alíquotas variáveis de 2,0 a 6,5 mL da solução padrão contendo 25,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD. O ensaio foi desenvolvido atendendo às mesmas condições experimentais descritas no item 4.2.2.1.1.1 e após, foram calculados a equação da reta teórica, precisão e coeficiente de correlação.

4.2.2.5 - Aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina, seguida da reação de Bratton-Marshall para comprimidos de metronidazol

Tanto a amostra padronizada como as amostras comerciais de comprimidos de metronidazol foram submetidas à análise pelo método proposto, nas condições experimentais descritas e estudadas anteriormente.

4.2.2.5.1 - Procedimento

4.2.2.5.1.1 - Preparação da solução padrão de MTD: foram preparadas 3 alíquotas contendo 2,5 µg/mL de MTD conforme item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.5.1.2 - Preparação das amostras: determinado o peso médio de cada amostra de comprimidos, 1 alíquota de pó correspondente a 250,0 mg de MTD foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e diluída com cerca de 25,0 mL de HCl 1N; o balão foi agitado por 5 minutos e o volume foi ajustado com a solução ácida; após a homogeneização procedeu-se a filtração da solução tomando o cuidado de rejeitar os primeiros 20,0 mL; do filtrado foi transferida 1 alíquota de 20,0 mL para balão volumétrico de 100,0 mL e q.s. de água destilada; foram preparados 10 balões volumétricos de 50,0 mL para os quais foram transferidas alíquotas de 5,0 mL; a estas foram adicionados 5,0 mL de NaOH 2N desenvolvendo assim a hidrólise em banho maria por 30 minutos; o experimento desenvolveu-se nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.5.1.3 - Ensaio: as absorbâncias das soluções padrão e das amostras foram determinadas a 539 nm contra o branco. O teor de MTD foi calculado comparando-se as absorbâncias das amostras com a do padrão.

4.2.2.6 - Teste de recuperação

4.2.2.6.1 - Procedimento

4.2.2.6.1.1 - Preparação da solução padrão de MTD: prepararam-se 3 soluções contendo 2,5 µg/mL de MTD padrão conforme item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.6.1.2 - Preparação da solução da amostra padronizada acrescida de MTD padrão: pesaram-se 125,0 mg de MTD padrão e a esta acrescentou-se uma alíquota do pó do comprimido equivalente a 125,0 mg de MTD; foram transferidas para um balão volumétrico de 100,0 mL ao qual foram adicionados cerca de 20,0 mL de HCl 1N; o balão foi agitado por 5 minutos e o volume foi então ajustado com esta solução ácida; após a homogeneização a solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 20,0 mL; foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL uma alíquota de 20,0 mL do filtrado e o volume completado com água destilada; desta solução uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL ao qual foi acrescentado 5,0 mL de NaOH 2N; a hidrólise processou-se em banho maria por 30 minutos; decorrido o tempo de aquecimento a solução foi resfriada e o volume ajustado com água destilada; para uma série de 10 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL aos quais foram acrescentados os demais reagentes conforme item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.6.1.3 - Preparação das soluções comerciais acrescidas de padrão de MTD: a partir do peso médio de cada amostra, pesou-se do pó do comprimido o equivalente a 125,0 mg de MTD e acrescentaram-se 125,0 mg de MTD padrão. Foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL e adicionaram-se cerca de 20,0 mL de HCl 1N; procedeu-se a agitação por 5 minutos, ajuste do volume com a solução

ácida e posterior filtração; os primeiros 20,0 mL foram rejeitados e uma alíquota de 20,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100,0 mL e q.s. de água destilada; uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL acrescentando-se 5,0 mL de NaOH 2N; este foi então aquecido em banho maria por 30 minutos; resfriou-se a solução e o volume foi completado com água destilada; 10 alíquotas de 5,0 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 50,0 mL e prosseguiu-se a reação colorimétrica já descrita no item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.6.1.4 - Ensaio: as absorvâncias foram determinadas a 539 nm contra o branco. Para cálculo dos resultados de cada análise foi usada a seguinte expressão:

$$\%R = \frac{F - \frac{1}{2}O}{S}$$

F = teor de MTD encontrado na análise da amostra adicionada de padrão

O = teor de MTD encontrado na amostra original (sem adição de padrão)

S = quantidade de MTD padrão adicionada

Com os 10 valores obtidos para recuperação, determinou-se a porcentagem média de recuperação para cada amostra de comprimidos.

4.2.2.7- Determinação da linearidade

Para melhor observação sobre a eficiência do método, realizaram-se experiências nas quais foram utilizadas as amostras padronizada, comerciais e um placebo da amostra padronizada.

4.2.2.7.1 - Procedimento

4.2.2.7.1.1 - Preparação da solução padrão: foi preparada uma solução nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.1.1.1 contendo 2,5 µg/mL de MTD padrão.

4.2.2.7.1.2 - Preparação da solução do placebo da amostra padronizada acrescida de padrão de MTD: considerando o peso médio da amostra padronizada (380,0 mg) menos a quantidade de MTD presente (250,0 mg), foram pesadas 10 alíquotas iguais a 130,0 mg do pó do placebo; estas foram transferidas para uma série de 10 balões volumétricos de 100,0 mL aos quais foram acrescentados sucessivamente quantidades de MTD padrão correspondentes a 100,0; 125,0; 150,0; 175,0; 200,0; 225,0; 250,0; 275,0; 300,0 e 325,0 mg; os volumes foram ajustados com q.s. de HCL 1N e após homogeneização, as soluções foram filtradas rejeitando-se os primeiros 20,0 mL; para balões volumétricos de 100,0 mL foram transferidas sucessivamente alíquotas de 20,0 mL completando-se os volumes com água destilada; de cada solução uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL ao qual adicionaram-se 5,0 mL de NaOH 2N procedendo-se ao aquecimento em banho maria por 30 minutos; após o resfriamento de cada balão os volumes foram ajustados com água destilada; de cada solução preparada transferiram-se 3 alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 50,0 mL; o procedimento analítico desenvolveu-se conforme item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.7.1.3 - Preparação da solução do placebo da amostra padronizada: do pó do placebo pesaram-se 130,0 mg transferindo-as para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 1N; os primeiros 20,0 mL filtrados foram rejeitados; outra alíquota de 20,0 mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL completando-se o volume com água destilada; para balão volumétrico de 100,0 mL foram

transferidos 5,0 mL desta solução e adicionados 5,0 mL de NaOH 2N deixando em banho maria por 30 minutos; o experimento desenvolveu-se nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.1.1.1.

4.2.2.7.1.4 - Preparação das soluções dos produtos terminados acrescidas de MTD padrão: com base no peso médio das amostras padronizada e comerciais, o ensaio foi realizado partindo-se de 10 alíquotas do pó dos comprimidos de cada amostra, correspondentes a diferença do peso médio e a 250,0 mg de MTD (quantidade declarada). Sucessivamente adicionaram-se às alíquotas, 100,0; 125,0; 150,0; 175,0; 200,0; 225,0; 250,0; 275,0; 300,0 e 325,0 mg de MTD padrão e o experimento teve prosseguimento nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.7.1.2.

4.2.2.7.1.5 - Preparação das soluções dos placebos das amostras comerciais: não se conhecendo as fórmulas completas destas amostras, considerou-se como placebo a quantidade de pó dos comprimidos igual a diferença entre o peso médio determinado e a quantidade declarada de MTD. A partir do pó dos comprimidos, o valor obtido foi pesado e submetido às mesmas condições experimentais descritas no item 4.2.2.7.1.3.

4.2.2.7.1.6. - Ensaio: de cada solução foram feitas 3 determinações e as absorbâncias determinadas a 539 nm contra o branco. A concentração encontrada para cada amostra foi obtida segundo os cálculos abaixo e estes valores juntamente com os teóricos, foram usados para construção de um gráfico onde a linearidade do método pode ser avaliada.

$$C_a = \frac{A_a}{A_p} C_p$$

onde C_p = concentração do padrão

A_p = absorvância média das 3 leituras do padrão

A_a = absorvância média das 3 leituras da amostra

C_a = concentração prática da amostra

No caso das amostras comerciais e padronizada, a absorvância obtida foi subtraída da absorvância do respectivo placebo.

4.2.3 Método espectrofotométrico com hidrólise alcalina do benzoilmetronidazol e reação de Bratton-Marshall na análise de suspensões

4.2.3.1 - Espectros de absorção

Para avaliar a proporcionalidade da resposta espectrofotométrica ao teor de BMTD, foram preparadas cinco amostras com diferentes concentrações.

4.2.3.1 - Procedimento

Pesaram-se 80,67 mg de BMTD padrão (que correspondem a 50,0 mg de MTD); foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 1N; transferiram-se 5,0 mL desta para um balão volumétrico de 100,0 mL ajustando-se o volume com água destilada; para uma série de 5 balões volumétricos de 50,0 mL transferiram-se sucessivamente 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL ajustando-se o volume para 10,0 mL com água destilada; a estes acrescentaram-se 5,0 mL de NaOH 2N levando-os a seguir ao banho maria por 30 minutos; após o resfriamento das soluções foram adicionados 5,0 mL de solução de sulfanilamida 0,35%; 2,0 mL de N-1-naftiletlenodiamina 0.1% e q.s. de água destilada. As concentrações finais de leitura corresponderam a 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 e 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD e as absorvâncias das soluções coloridas foram

determinadas a intervalos regulares entre 400 e 600 nm contra o branco, preparado nas mesmas condições experimentais.

4.2.3.2 - Reta de calibração

4.2.3.2.1 - Procedimento

Pesaram-se 403,3 mg de BMTD padrão (equivalentes a 250,0 mg de MTD) e foram solubilizadas em q.s. de HCl 1N em balão volumétrico de 100,0 mL; uma alíquota de 20,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL com volume suficiente de água destilada; transferiram-se 5,0 mL para outro balão volumétrico de 100,0 mL aos quais adicionaram-se 5,0 mL de NaOH 2N procedendo assim o aquecimento em banho maria por 30 minutos; após o resfriamento da solução, completou-se o volume com água destilada ficando esta com uma concentração de 40,33 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD; para uma série de 10 balões volumétricos de 50,0 mL transferiram-se sucessivamente alíquotas entre 2,0 a 6,5 mL da solução padrão. A reação colorimétrica desenvolveu-se nas mesmas condições experimentais descritas em 4.2.3.1.1 e as absorbâncias foram determinadas a 539 nm contra o branco. As concentrações das soluções finais de leitura ficaram entre 1,6 a 5,2 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD e calcularam-se a equação da reta teórica, precisão e coeficiente de correlação.

4.2.3.3 - Aplicação do método na análise de suspensões comerciais

As seis amostras comerciais de suspensão foram submetidas à análise pelo método proposto atendendo às condições experimentais já estudadas.

4.2.3.3.1 - Procedimento

4.2.3.3.1.1 - Preparação da solução padrão: foi preparada uma solução padrão de BMTD de concentração igual a 40,33 $\mu\text{g/mL}$; desta solução foram transferidas 3 alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 50,0 mL aos quais foram adicionados os demais reagentes como no item 4.2.3.1.1. Esta solução apresentou uma concentração final de leitura igual a 4,03 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD.

4.2.3.3.1.2 - Preparação das soluções das suspensões comerciais: após agitação manual de cada amostra por cerca de 10 minutos, transferiram-se 10,0 mL da suspensão (correspondente a 403,3mg de BMTD) para balão volumétrico de 100,0 mL com o cuidado na lavagem interna da pipeta com HCl 1N; deste solvente adicionaram-se cerca de 20,0 mL agitando-se manualmente o balão por 5 minutos; o volume foi então ajustado com q.s. de HCl 1N e deixado em repouso por 10 minutos; para balão volumétrico de 100,0 mL uma alíquota de 20,0 mL do sobrenadante límpido foi transferida completando-se o volume com água destilada; uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100,0 mL ao qual foram adicionados 5,0 mL de NaOH 2N; a solução foi aquecida em banho maria por 30 minutos e em seguida resfriada; o volume foi completado com água destilada e 10 alíquotas de 5,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50, 0 mL; os demais reagentes foram acrescentados como descrição do item 4.2.3.1.1.

4.2.3.3.1.3 - Ensaio: as absorvâncias das soluções foram determinadas a 539 nm contra o branco e o teor de BMTD em cada solução foi calculado comparando-se as absorvâncias obtidas com a absorvância média do padrão.

4.2.3.4 - Teste de recuperação

4.2.3.4.1 - Procedimento

4.2.3.4.1.1 - Preparação da solução padrão: a partir de 403,3 mg de BMTD padrão foi preparada uma solução nas mesmas condições descritas no item 4.2.3.1.1.

4.2.3.4.1.2 - Preparação da solução da amostra comercial com adição do padrão: pesaram-se 201,6 mg de BMTD padrão transferindo-as para um balão volumétrico de 100,0 mL; foi adicionado cerca de 10,0 mL de HCl 1N homogeneizando-se a solução; após agitação da amostra de suspensão, transferiram-se 5,0 mL desta para o balão lavando-se a pipeta com HCL 1N; o volume foi completado com a solução ácida e após agitação manual por 5 minutos, a solução foi deixada em repouso por 10 minutos; do sobrenadante límpido uma alíquota de 20,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de água destilada; uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL ao qual foram acrescentados 5,0 mL de NaOH 2N; com o aquecimento nas condições já descritas e o resfriamento da solução, o volume foi ajustado com água e 10 alíquotas de 5,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50,0 mL; os demais reagentes foram adicionados e os volumes ajustados conforme item 4.2.3.1.1.

4.2.3.4.1.3 - Ensaio: as absorbâncias foram determinadas a 539 nm contra o branco e a recuperação para cada amostra de suspensão foi calculada como descrição no item 4.2.2.6.1.4.

4.2.3.5 - Determinação da linearidade

4.2.3.5.1 - Procedimento

4.2.3.5.1.1 - Preparação da solução padrão: uma solução padrão de BMTD foi preparada nas mesmas condições descritas no item 4.2.3.3.1.1.

4.2.3.5.1.2 - Preparação das soluções das amostras comerciais acrescidas de BMTD padrão: foram pesadas quantidades iguais a 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg de BMTD padrão; foram transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL aos quais adicionaram-se cerca de 10,0 mL de HCl 1N; após agitação da amostra de suspensão, 5 alíquotas de 5,0 mL foram transferidas para os balões volumétricos tomando o cuidado na lavagem das pipetas com HCl 1N; os volumes foram ajustados com HCl 1N; após agitação manual das soluções por 5 minutos e repouso de 10 minutos, alíquotas de 20,0 mL de cada sobrenadante foram tomadas e transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL com q.s. de água destilada; de cada solução uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL ao qual acrescentaram-se 5,0 mL de NaOH 2N; procedeu-se ao aquecimento, resfriamento e ajuste de volume das soluções; para análise, foram tomadas de cada solução 3 alíquotas de 5,0 mL e transferidas para balões volumétricos de 50,0 mL; a adição dos demais reagentes obedeceu às condições descritas anteriormente.

4.2.3.5.1.3 - Preparação das soluções das amostras comerciais: a partir de 5,0 mL de suspensão (correspondentes a 201,6 mg de BMTD) o experimento procedeu-se nas mesmas condições descritas no item 4.2.3.3.1.2.

4.2.3.5.1.4 - Ensaio: as absorvâncias das soluções contendo o produto colorido foram determinadas a 539 nm contra o branco. Para os cálculos, seguiu-se o mesmo esquema descrito no item 4.2.2.7.1.6.

4.2.4 - Método espectrofotométrico com redução do nitro grupo na presença de zinco em pó e ácido clorídrico, seguida da reação de Bratton-Marshall na análise de comprimidos

O metronidazol quando tratado com zinco e ácido clorídrico sob aquecimento, tem o grupo nitro reduzido a amino grupo. O produto resultante submetido à reação de diazotação e acoplamento com N-1-naftiletilenodiamina, desenvolve uma coloração rósea. Algumas experiências foram feitas para reproduzir o trabalho original de SETHI⁷⁸ e eventualmente complementá-lo, ao se conhecer as condições ideais da reação colorimétrica.

As primeiras experiências foram realizadas com soluções padrão de MTD em diferentes concentrações, submetidas a varredura entre 350 e 620 nm para determinação do ponto de máxima absorção.

Procurou-se avaliar também a proporcionalidade entre os reagentes fixando-se o volume de solução padrão e variando-se os volumes das soluções de nitrito de sódio e sulfamato de amônia.

Outra experiência desenvolvida objetivando determinar a quantidade ideal de zinco para a adequada redução foi feita submetendo uma solução padrão de MTD ao aquecimento com 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 g do agente redutor.

Como a reação processa-se sob aquecimento, uma solução padrão foi aquecida em banho maria por diferentes tempos, visando determinar o melhor tempo de redução.

Procurou-se também conhecer a importância da agitação ou não no desenvolvimento da reação de redução do nitro grupo. As soluções

aqui preparadas foram submetidas posteriormente a uma varredura entre 420 e 600 nm.

Como tentativa, optou-se por sintetizar o composto reduzido do MTD para verificar o seu comportamento em relação à reação colorimétrica. Estabelecidas as condições como temperatura, tempo de aquecimento, quantidade de zinco, poderia-se conhecer, ao ter o composto isolado e disponível, a provável influência deste no desenvolvimento da reação colorimétrica.

4.2.4.1 - Espectros de absorção

Realizou-se um ensaio para acerto final das condições de reação com variação tanto da concentração de MTD como do volume do reativo N-1-naftiletilenodiamina.

4.2.4.1.1 - Procedimento

Pesaram-se 200,0 mg de MTD padrão que foram transferidas para erlenmeyer de 250,0 mL; adicionaram-se 25,0 mL de água destilada, 10,0 mL de HCl R e 3,0 g de zinco em pó; procedeu-se ao aquecimento em banho maria fervente por 15 minutos; a solução foi resfriada, filtrada para balão volumétrico de 100,0 mL, o resíduo lavado com cerca de 20,0 mL de água destilada e o volume completado com este solvente; para 4 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas alíquotas na seguinte seqüência: 5,0; 10,0; 5,0 e 10,0 mL às quais adicionaram-se 2,0 mL de nitrito de sódio 0,1M e 5,0 mL de sulfamato de amônia 0,5. Aos 2 primeiros balões adicionaram-se 5,0 mL de N-1-naftiletilenodiamina e aos outros dois, 10,0 mL deste reativo; o intervalo de tempo de 3 minutos na adição de cada reagente foi respeitada e o volume ajustado com água destilada. As absorbâncias das 4 soluções foram determinadas contra o branco preparado nas mesmas condições, a intervalos regulares entre 400 e 600 nm.

4.2.4.2 - Curva de Ringbom

4.2.4.2.1 - Procedimento

Para erlenmeyer de 250,0 mL foram transferidos na seguinte ordem 500,0 mg de MTD padrão, 62,5 mL de água destilada, 25,0 mL de ácido clorídrico reagente e 7,5 g de zinco em pó; a solução foi submetida à aquecimento em banho maria fervente por 15 minutos e após o resfriamento foi filtrada; os resíduos foram lavados com cerca de 20,0 mL de água destilada recolhendo-se o filtrado em balão volumétrico de 250,0 mL; o volume foi ajustado com água destilada e esta solução apresentou uma concentração igual a 2000,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD; foram transferidas para uma série de 20 balões volumétricos de 50,0 mL alíquotas de 0,5 a 17,0 mL desta solução; os volumes foram ajustados a 17,0 mL com HCl 10%; adicionaram-se 2,0 mL de nitrito de sódio 0,1M; 5,0 mL de sulfamato de amônia 0,5% e 5,0 mL de N-1-naftiletilenodiamina; a adição destes reagentes obedeceu ao intervalo de 3 minutos e os volumes foram completados com água destilada. As concentrações das soluções finais de leitura ficaram entre 20,0 e 680,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as transmitâncias foram determinadas a 530 nm contra o branco.

4.2.4.3 - Reta de calibração

4.2.4.3.1 - Procedimento

A partir de uma solução padrão contendo 2000,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD, prepararam-se 10 balões volumétricos aos quais foram adicionados sucessivamente 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 mL ajustando-se os volumes para 9,0 mL com HCl 10%; os demais reagentes foram acrescentados conforme descrição no item 4.2.4.2 e o volume foi completado com água destilada. As concentrações das soluções contendo o produto colorido ficaram entre 60,0 e 360,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as

absorbâncias foram determinadas a 530 nm contra o branco. Foram calculados a equação da reta teórica, precisão e o coeficiente de correlação.

4.2.4.4 - Aplicação do método na amostra padronizada de comprimidos de MTD

4.2.4.4.1 - Procedimento

4.2.4.4.1.1 - Preparação da solução padrão de MTD: de uma solução contendo 2000,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD foram transferidas 3 alíquotas de 5,0 mL e submetidas as mesmas condições experimentais descritas no item 4.2.4.2. A concentração de leitura destas soluções foi de 200 $\mu\text{g/mL}$ de MTD.

4.2.4.4.1.2 - Preparação da solução da amostra padronizada: considerando o peso médio, pesou-se do pó dos comprimidos o equivalente a 500,0 mg de MTD transferindo-as para erlenmeyer de 250,0 mL; preparou-se à parte uma solução ácida com 62,5 mL de água e 25,0 mL de HCl R; desta solução cerca de 50,0 mL foram transferidos para o erlenmeyer agitando-o por 5 minutos; acrescentaram-se 7,5 g de zinco em pó levando ao aquecimento em banho maria fervente por 15 minutos; resfriou-se a solução e esta foi filtrada não se esquecendo de lavar o resíduo com o restante da solução ácida; o filtrado foi recebido em balão volumétrico de 250,0 mL e o volume completado com água destilada; 10 alíquotas de 5,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50,0 mL e o experimento prosseguiu nas mesmas condições descritas no item 4.2.4.2

4.2.4.4.1.3 - Ensaio: as soluções coloridas tiveram suas absorbâncias determinadas a 530 nm contra o branco. Estas foram comparadas com a absorbância média do padrão, calculando-se o teor de MTD na amostra padronizada.

4.2.4.5 - Teste de recuperação

4.2.4.5.1 - Procedimento

4.2.4.5.1.1 - Preparação da solução padrão: foi preparada uma solução padrão contendo 200,0 µg/mL de MTD da mesma maneira descrita no item 4.2.4.4.1.1.

4.2.4.5.1.2 - Preparação da solução da amostra padronizada acrescida de MTD padrão: conhecido o peso médio, pesou-se do pó dos comprimidos o equivalente a 100,0 mg de MTD; foram adicionadas 100,0 mg de MTD padrão e estas foram transferidas para erlenmeyer de 250,0 mL; foram acrescentados 40,0 mL de água destilada, 10,0 mL de HCl R e 4,0 g de zinco em pó; o experimento desenvolveu-se nas mesmas condições estabelecidas no item 4.2.4.4.1.2.

4.2.4.5.1.3 - Ensaio: as soluções coloridas tiveram as absorbâncias determinadas a 530 nm contra o branco e os resultados obtidos foram usados no esquema de cálculo para determinação da recuperação conforme item 4.2.2.6.1.4.

4.2.5 - Método espectrofotométrico com absorção no UV para determinação do metronidazol em ácido clorídrico 0,1N

Várias experiências foram realizadas com base no trabalho original de FABAYO e colaboradores²⁵ onde o MTD é analisado na presença de HCl 0,1N e com comprimento de onda estabelecido em 277 nm.

4.2.5.1 - Espectros de absorção

4.2.5.1.1 - Procedimento

Pesaram-se 6 alíquotas de 100,0 mg de MTD padrão e foram solubilizadas em balões volumétricos de 100,0 mL com q.s. de HCL 0,1N;

para outra série de 6 balões volumétricos de 100,0 mL foram transferidas alíquotas de 10,0 mL e os volumes ajustados com as 6 soluções tampão de pH 1 a 6. Os valores de pH foram aferidos após cada diluição. A concentração destas foi de 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD. As absorvâncias das 6 soluções padrão foram determinadas a intervalos regulares entre 200 e 400 nm contra o branco (HCl 0,1N). Uma segunda experiência foi realizada com soluções padrão contendo 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD preparadas em soluções tampão de pH iguais a 4; 4,5; 5; 5,5; 6 e 6,5 e submetidas a mesma varredura.

4.2.5.2 - Curva de Ringbom

4.2.5.2.1 - Procedimento

Pesaram-se 250,0 mg de MTD padrão e foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 250,0 mL e o volume ajustado com HCl 0,1N; para uma série de 20 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas sucessivamente alíquotas variando de 1,0 a 10,5 mL e q.s. de HCl 0,1N; as soluções finais de leitura apresentaram concentrações entre 2,0 a 21,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as absorvâncias foram determinadas contra o branco a 277 nm.

4.2.5.3 - Reta de calibração

4.2.5.3.1 - Procedimento

A partir de uma solução padrão contendo 200,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD, prepararam-se 10 balões volumétricos de 50,0 mL para os quais foram transferidas alíquotas variando de 1,0 a 5,5 mL e q.s. de HCl 0,1N; as soluções finais de leitura apresentaram concentrações de 4,0 a 22,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as absorvâncias foram determinadas a 277 nm contra o branco.

Calcularam-se a equação da reta teórica, precisão e coeficiente de correlação.

4.2.5.4 - Aplicação do método espectrofotométrico com absorção no UV na análise de comprimidos de MTD

4.2.5.4.1 - Procedimento

4.2.5.4.1.1 - Preparação da solução padrão: pesaram-se 150,0 mg de MTD padrão e foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL com volume suficiente de HCl 0,1N; foram preparados 3 balões volumétricos de 50,0 mL aos quais transferiram-se alíquotas de 5,0 mL; estas após o ajuste de volume com HCl 0,1N apresentaram concentração de 15,0 µg/mL de MTD.

4.2.5.4.1.2 - Preparação das amostras padronizada e comerciais de comprimidos: conhecido o valor do peso médio, transferiu-se uma alíquota do pó do comprimido correspondente a 150,0 mg de MTD para balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com HCl 0,1N; após agitação a solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 20,0 mL; do filtrado uma alíquota de 20,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; para uma série de 10 balões volumétricos de 100,0 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL e os volumes ajustados com HCl 0,1N.

4.2.5.4.1.3 - Ensaio: as absorbâncias foram determinadas a 277 nm contra o branco e os resultados obtidos foram usados para cálculo do teor de MTD presente em cada análise. O resultado final de cada amostra de comprimido representa a média destas 10 análises.

4.2.5.5 - Teste de recuperação

4.2.5.5.1 - Procedimento

4.2.5.5.1.1 - Preparação da solução padrão: 250,0 mg de MTD padrão foram pesadas, transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL e diluídas com q.s. de HCl 0,1N; uma alíquota de 20,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume ajustado com HCl 0,1N; para 3 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas alíquotas de 1,0 mL com q.s. da solução ácida; esta solução ficou com uma concentração de 10,0 µg/mL de MTD.

4.2.5.5.1.2 - Preparação das amostras padronizada e comerciais: a partir do pó dos comprimidos, pesaram-se o correspondente a 125,0 mg de MTD e adicionaram-se 125,0 mg de MTD padrão; estas foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; após agitação, filtração e rejeição dos primeiros 20,0 mL, uma alíquota de 20,0 mL do filtrado foi transferida para outro balão volumétrico de 100,0 mL e o volume ajustado com HCl 0,1N; foram preparados 10 balões volumétricos de 50,0 mL aos quais foram transferidas alíquotas de 1,0 mL e o volume foi completado com a solução ácida.

4.2.5.5.1.3 - Ensaio: as soluções tiveram suas absorvâncias determinadas a 277 nm contra o branco e através destas, calcularam-se as 10 concentrações práticas da amostra. O cálculo da recuperação obedeceu ao descrito no item 4.2.2.6.1.4.

4.2.5.6 - Determinação da linearidade

4.2.5.6.1 - Procedimento

4.2.5.6.1.1 - Preparação da solução padrão: foi preparada uma solução padrão contendo 15,0 µg/mL de MTD nas mesmas condições experimentais descritas em 4.2.5.4.1.1.

4.2.5.6.1.2 - Preparação da solução do placebo da amostra padronizada acrescida de padrão: a partir do peso médio subtraiu-se o valor declarado de MTD (250,0 mg) resultando em 130,0 mg que representa a quantidade de placebo; foram pesadas 5 alíquotas do pó do placebo iguais a 130,0 mg e transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL; a estas foram acrescentadas sucessivamente, quantidades iguais a 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg de MTD padrão e os volumes ajustados com HCl 0,1N; após agitação, filtração e rejeição dos primeiros 20,0 mL da solução, uma alíquota de 10,0 mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; para cada solução, foram preparados 3 balões volumétricos de 50,0 mL aos quais foram transferidas alíquotas de 5,0 mL e os volumes ajustados com HCl 0,1N.

4.2.5.6.1.3 - Preparação da solução do placebo da amostra padronizada: o equivalente a 130,0 mg de placebo foi pesado e transferido para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; após homogeneização, filtração e rejeição dos primeiros 20,0 mL da solução, uma alíquota de 10,0 mL foi submetida às mesmas condições experimentais descritas no item acima.

4.2.5.6.1.4 - Preparação das soluções dos produtos terminados acrescidas de MTD padrão: conhecidos os pesos médios das amostras padronizada e comerciais, pesaram-se 5 alíquotas do pó dos comprimidos correspondentes à diferença entre o peso médio e 250,0 mg de MTD presente. A estas foram acrescentadas sucessivamente 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg de MTD padrão conduzindo o experimento dentro das mesmas condições experimentais descritas no item 4.2.5.6.1.2.

4.2.5.6.1.5 - Preparação das soluções dos placebos das amostras comerciais: por não se conhecer a fórmula completa destas amostras, considerou-se como placebo a quantidade de pó dos

comprimidos igual a diferença entre o peso médio e o valor declarado de MTD. O valor obtido foi pesado a partir do pó dos comprimidos e submetido às mesmas condições descritas no item 4.2.5.6.1.3

4.2.5.6.1.6 - Ensaio: as absorvâncias foram determinadas a 277 nm contra o branco. A absorvância média de cada solução foi encontrada após 3 análises e os resultados obtidos foram usados para os cálculos da linearidade conforme descrição no item 4.2.2.7.1.6.

4.2.6 - Método espectrofotométrico com absorção no UV para determinação de benzoilmetronidazol em HCl 0,1N na análise de suspensões

4.2.6.1 - Espectros de absorção

4.2.6.1.1 - Procedimento

Pesaram-se 6 alíquotas de 100,0 mg de BMTD padrão; foram transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL com volume suficiente de HCl 1N; 6 alíquotas de 10,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL e os volumes foram ajustados com as soluções tampão de pH de 1 a 6, atentando-se para a aferição dos pHs após as diluições. Os espectros foram determinados em intervalos regulares entre 200 e 400 nm contra o branco.

4.2.6.2 - Curva de Ringbom

4.2.6.2.1 - Procedimento

Foram pesadas 403,3 mg de BMTD padrão e transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de HCl 1N; uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume ajustado com HCl 0,1N; para um balão volumétrico de 100,0 mL foram transferidos 25,0 mL

e q.s. de HCl 0,1N ficando esta solução com uma concentração de 50,4 µg/mL de BMTD; para 20 balões volumétricos de 50,0 mL transferiram-se alíquotas variando de 1,0 a 14,5 mL aos quais adicionaram quantidade suficiente de HCl 0,1N. As concentrações finais variaram de 1,0 a 14,6 µg/mL de BMTD e as absorvâncias determinadas a 277 nm contra o branco (HCl 0,1N)

4.2.6.3 - Reta de calibração

4.2.6.3.1 - Procedimento

A partir de uma solução padrão contendo 50,4 µg/mL de BMTD, prepararam-se 10 balões volumétricos de 50,0 mL aos quais transferiram-se volumes de 7,0 a 16,0 mL e q.s. de HCl 0,1N; as concentrações variaram de 7,0 a 16,1 µg/mL de BMTD e as absorvâncias determinadas a 277 nm contra o branco. Foram calculados a equação da reta teórica, precisão e coeficiente de correlação.

4.2.6.4 - Aplicação do método espectrofotométrico no UV e HCl 0,1N na análise de suspensões comerciais

4.2.6.4.1 - Procedimento

4.2.6.4.1.1 - Preparação da solução padrão:

pesaram-se 403,3 mg de BMTD padrão, foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi ajustado com HCl 1N; uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 200,0 mL e q.s. de HCl 0,1N; para 3 balões volumétricos de 50,0 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL e q.s. de HCl 0,1N; a concentração destas foi de 10,08 µg/mL de BMTD.

4.2.6.4.1.2 - Preparação das soluções das amostras comerciais:

após agitação da amostra, foram tomados 10,0 mL da suspensão correspondentes a 403,3 mg de BMTD; foram transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL lavando-se a pipeta com HCl 1N e

completando-se o volume com este solvente; homogeneizou-se a solução que foi deixada em repouso por 10 minutos; do sobrenadante límpido uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 200,0 mL com q.s. de HCl 0,1N; uma série de 10 balões volumétricos de 50,0 mL foi preparada para receber alíquotas de 5,0 mL e volume suficiente de HCl 0,1N.

4.2.6.4.1.3 - Ensaio: as soluções tiveram as absorbâncias determinadas a 277 nm contra o branco. Para o cálculo do teor de BMTD, compararam-se as absorbâncias obtidas com a absorbância média do padrão e o valor encontrado de cada amostra é resultado da média das 10 análises.

4.2.6.5 - Teste de recuperação

4.2.6.5.1 - Procedimento

4.2.6.5.1.1 - Preparação da solução padrão: foi preparada uma solução contendo 10,08 µg/mL de BMTD de acordo com o item 4.2.6.4.1.1.

4.2.6.5.1.2 - Preparação das soluções das amostras comerciais com a adição de padrão: para um balão volumétrico de 100,0 mL transferiram-se 201,6 mg de BMTD padrão e adicionaram-se cerca de 10,0 mL de HCl 1N; após agitação da solução, uma alíquota de 5,0 mL de suspensão equivalente a 201,6 mg de BMTD foi adicionada tomando o cuidado na lavagem da pipeta com HCl 1N; o volume do balão foi ajustado com HCl 1N e a solução em análise homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos; uma alíquota de 5,0 mL do sobrenadante foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e q.s. de HCl 0,1N; prepararam-se 10 balões volumétricos de 50,0 mL aos quais foram transferidas alíquotas de 5,0 mL e volume ajustado com HCl 0,1N.

4.2.6.5.1.3 - Ensaio: as absorbâncias foram determinadas a 277 nm contra branco. Para o cálculo da porcentagem de recuperação foi usado o mesmo esquema descrito em 4.2.2.6.1.4.

4.2.7- Método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia

O método proposto por SASTRY e colaboradores⁷⁴ baseia-se na capacidade do metronidazol e seu éster de reagirem com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia em meio alcalino, formando composto colorido. O máximo de absorção indicado é de 660 nm.

4.2.7.1 - Espectros de absorção

4.2.7.1.1 - Procedimento

Pesaram-se 50,0 mg de MTD padrão e foram transferidas para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de água destilada; após agitação uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100,0 mL completando-se o volume com água destilada; prepararam-se 5 balões volumétricos de 10,0 mL aos quais foram sucessivamente transferidos 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL; adicionaram-se a cada balão 1,0 mL de nitroprussiato de sódio 2% e 1,0 mL de cloreto de hidroxilamônia 5%; os balões foram agitados por 2 minutos; após, 0,5 mL de NaOH 1N foi acrescentado; os balões foram agitados por cerca de 10 minutos e os volumes foram ajustados com água destilada. As concentrações foram iguais a 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL e os espectros determinados a intervalos regulares entre 400 e 720 nm, contra o branco preparado nas mesmas condições.

4.2.7.2 - Curva de Ringbom

4.2.7.2.1 - Procedimento

Para balão volumétrico de 100,0 mL foram transferidas 250,0 mg de MTD padrão e o volume foi completado com água destilada; após agitação uma alíquota de 20,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL com q.s. de água destilada; foram preparados 20 balões volumétricos de 50,0 mL aos quais foram transferidos volumes variáveis entre 0,2 e 4,0 mL; os demais reagentes foram acrescentados conforme descrição do item anterior e as absorvâncias determinadas a 560 nm contra o branco.

4.2.7.3 - Reta de calibração

4.2.7.3.1 - Procedimento

De uma solução padrão contendo 500,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD, transferiram-se para balões volumétricos de 50,0 mL, volumes variáveis entre 1,0 e 3,0 mL; após a adição dos demais reagentes de acordo com as condições estabelecidas no item 4.2.7.1, as concentrações das soluções de leitura ficaram entre 10,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD. As absorvâncias foram determinadas a 560 nm contra o branco e calcularam-se a equação da reta teórica, precisão e coeficiente de correlação.

5 - RESULTADOS

5.1 - TITULAÇÃO EM MEIO NÃO AQUOSO

A titulação do metronidazol padrão com ácido perclórico 0,1 N forneceu resultados compatíveis com os limites de aceitação farmacopeicos. A média das 3 titulações foi de 101,5 %. Os resultados da titulação do placebo da amostra padronizada foram praticamente iguais àqueles obtidos com a titulação do branco dos solventes.

Os resultados obtidos com a titulação em meio não aquoso das amostras padronizada e comerciais de comprimidos de MTD estão na tabela I.

TABELA I Resultados obtidos na análise de comprimidos de MTD, após titulação em meio não aquoso. A tomada de ensaio correspondeu a 200,0 mg de MTD e os valores apresentados significam a média de 10 determinações.

amostra	teor (mg)	%	DP	CV
A1	184,7	92,35	2,24	2,23
A2	211,1	107,23	2,51	2,74
A3	179,5	89,75	2,67	2,95
A4	193,2	96,63	2,78	3,07
A5	193,2	96,63	2,83	2,94
A6	182,6	91,32	4,00	3,75
A7	195,8	97,94	1,23	1,28
Ap	202,3	101,15	0,86	0,89

DP = desvio padrão CV = coeficiente de variação

5.2 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM HIDRÓLISE ALCALINA E REAÇÃO DE BRATTON-MARSHALL

5.2.1 - Para o metronidazol

Na experiência para verificação do melhor período de tempo para o desenvolvimento da reação de hidrólise, foi verificado que a liberação do

grupo nitro é rápida atingindo o máximo após 15 minutos. Não foram considerados os resultados até este tempo em função das variações nas absorvâncias decorrentes das operações analíticas. As observações tiveram prosseguimento a intervalos de 15 minutos cujos resultados estão na tabela II.

TABELA II Resultados das absorvâncias obtidas do produto colorido formado a partir de uma solução padrão contendo 2,5 µg/mL de MTD, após hidrólise alcalina em banho maria e em diferentes tempos, seguida da reação de Bratton-Marshall.

balão	tempo	Absorvância
1	15 min	0,516
2	30 min	0,509
3	45 min	0,502
4	60 min	0,509
5	75 min	0,516

Para a observação da influência do tempo de aquecimento em ampolas fechadas, verificou-se que a hidrólise total ocorre após 45 minutos, conforme o demonstrado na tabela III.

TABELA III Resultados das absorvâncias obtidas do produto colorido formado a partir de uma solução padrão contendo 2,0 µg/mL de MTD, após hidrólise alcalina e aquecida a 100°± 2° em ampolas de vidro e em diferentes tempos, seguida da reação de Bratton-Marshall.

ampola	tempo	Absorvância
1	15 min	0,229
2	30 min	0,387
3	45 min	0,432
4	60 min	0,483
5	75 min	0,438

O espectro de absorção do produto colorido formado, em diferentes concentrações após a hidrólise alcalina do metronidazol seguida da reação de Bratton-Marshall esta ilustrada na figura 1.

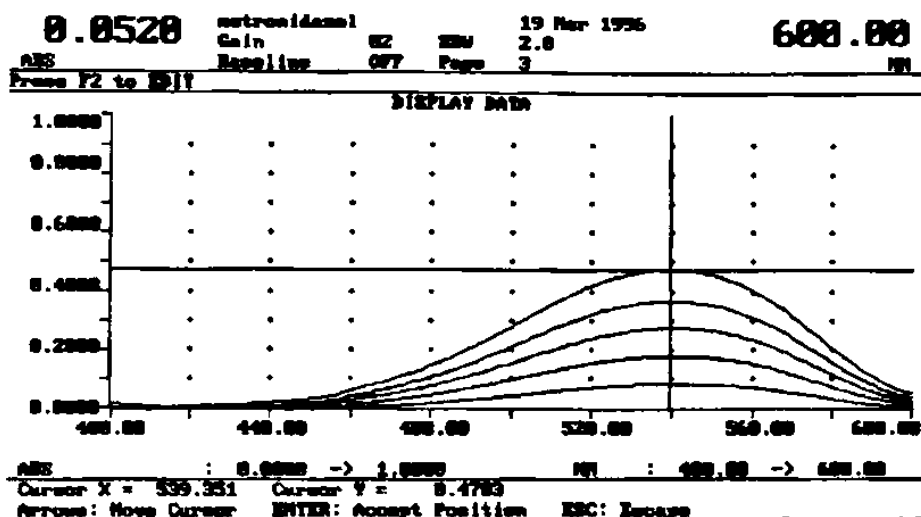


Figura 1 Espectros de absorção do produto colorido formado após hidrólise alcalina do MTD, seguida da reação de Bratton-Marshall. As concentrações das soluções de leitura foram iguais a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e as absorvâncias foram determinadas no intervalo de 400 à 600 nm.

Na figura 2 está representada a Curva de Ringbom correspondente aos resultados da experiência realizada com o objetivo de verificar a obediência a lei de Lambert-Beer.

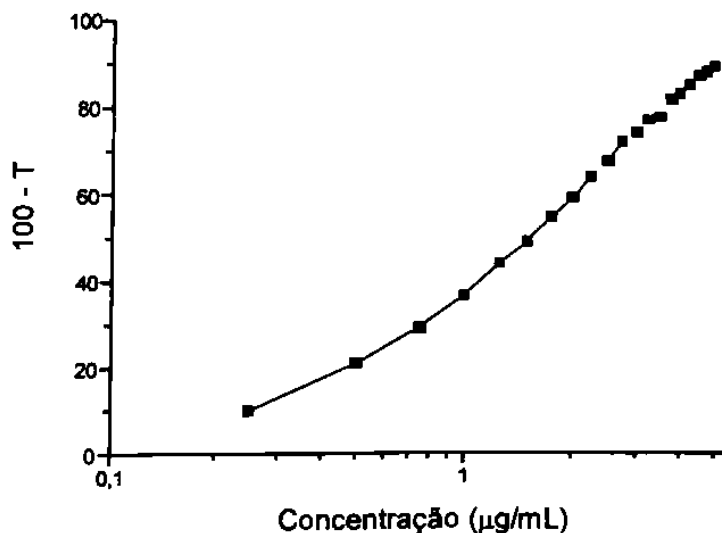


Figura 2 Curva de Ringbom obtida de uma solução padrão de MTD após hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As concentrações das soluções de leitura variaram de 0,25 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as absorvâncias foram determinadas a 539 nm.

A reta de calibração foi construída de acordo com os valores das absorvâncias determinadas na leitura das soluções com concentração entre 1,0 e 3,25 µg/mL de MTD. Na figura 3 ela é apresentada assim como a equação da reta teórica. O coeficiente de correlação encontrado foi igual a 1,00; precisão absoluta igual a 0,0001123 µg/mL e a precisão relativa de 0,0528 %.

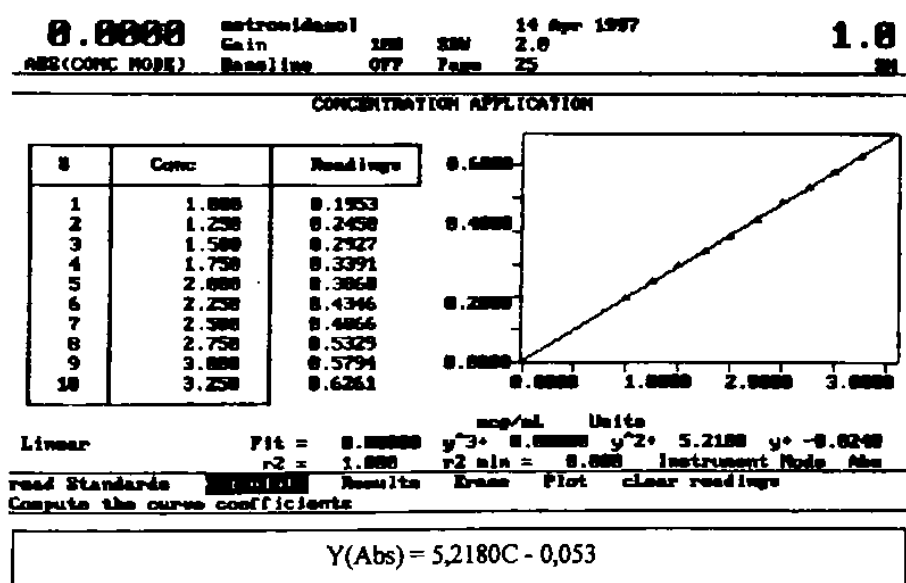


Figura 3 Reta de calibração obtida de uma solução padrão de MTD segundo método da hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As concentrações das soluções de leitura ficaram entre 1,00 e 3,25 µg/mL de MTD e as absorvâncias foram determinadas a 539 nm.

Quando da aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina nas amostras padronizada e comerciais de comprimidos contendo 250 mg de MTD, os resultados encontrados após análise de 10 alíquotas, são apresentados na tabela IV.

TABELA IV Resultados obtidos para as amostras padronizada e comerciais de comprimidos de MTD, após aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina, seguida da reação de Bratton-Marshall. A tomada de ensaio foi equivalente a 250,0 mg de MTD e os valores representam a média de 10 análises.

amostra	teor (mg)	%	DP	CV
A1	239,80	95,90	2,480	1,037
A2	232,50	95,80	1,077	0,463
A3	244,18	97,67	0,901	0,369
A4	244,38	97,75	1,626	0,665
A5	202,75	81,10	1,201	0,592
A6	252,72	101,08	0,816	0,323
A7	250,01	100,01	0,665	0,265
Ap	249,76	99,91	0,889	0,356

DP = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Os resultados obtidos para as amostras de comprimidos de MTD após o teste de recuperação são demonstrados na tabela V. Os cálculos abaixo exemplificam a determinação da porcentagem de recuperação de uma determinada alíquota.

$$F = \frac{Aa}{Ap} Cp$$

F = concentração média encontrada na análise da amostra após adição do padrão (mg)

Aa = 0,469 (absorbância média da alíquota com adição de padrão)

Ap = 0,475 (absorbância média do padrão)

Cp = 250 mg (concentração do padrão)

$$F = 0,469 / 0,475 \cdot 250$$

$$F = 246,47 \text{ mg de MTD}$$

O = 247,36 mg (concentração média encontrada na análise da amostra sem adição do padrão ou amostra original)

$\frac{1}{2}$ O = 123,68 mg

S = 125,0 mg (quantidade de padrão adicionada)

$$\%R = \frac{F - \frac{1}{2}O}{S}$$

% Recuperação = $246,47 - 123,68 / 125,0$

% Recuperação = 98,23 %

TABELA V Resultados obtidos para as amostras padronizada e comerciais de comprimidos de MTD, após a aplicação do teste de recuperação, segundo método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As tomadas de ensaio corresponderam a 125,0 mg de MTD a partir do pó dos comprimidos, às quais foram acrescentadas 125,0 mg de MTD padrão. Os valores expressam a média de 10 análises.

amostra	teor (mg)	% recuperada
A1	248,22	102,62
A2	244,99	102,89
A3	234,99	90,31
A4	250,38	102,50
A5	231,12	103,79
A6	246,76	96,34
A7	248,25	98,93
Ap	248,89	99,55

Nas experiências para determinação da linearidade, os ensaios com a solução do placebo da amostra padronizada mostraram que não houve reação colorimétrica. Quando neste placebo foram adicionadas sucessivas quantidades de MTD padrão, a reação desenvolveu-se normalmente com a formação do produto colorido. Na figura 4 está ilustrado

o resultado obtido para a amostra padronizada de comprimidos, relacionando a concentração teórica com a concentração encontrada no ensaio.

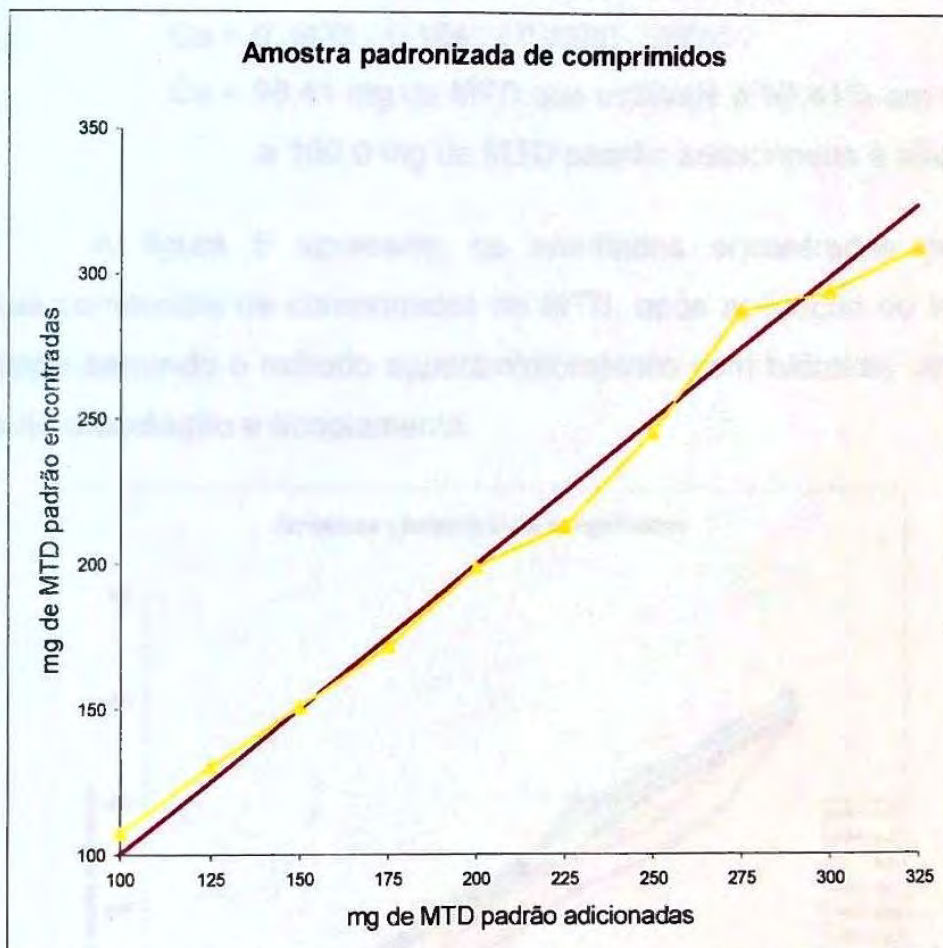


Figura 4 Representação dos resultados obtidos após o teste da linearidade aplicado à amostra padronizada de comprimidos, segundo método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As tomadas de ensaio foram iguais a 130,0 mg do placebo da amostra padronizada de comprimidos às quais foram acrescentadas quantidades variáveis de 100,0 a 325,0 mg de MTD padrão.

O esquema que segue abaixo, ilustra o cálculo para a determinação da linearidade a partir de uma alíquota da amostra A1 de comprimidos, acrescida de 100,0 mg de MTD padrão.

$$C_a = \frac{A_a - A_{plac}}{A_p} C_p$$

$A_p = 0,4560$ (absorbância média do padrão)

$A_a = 0,3435$ (absorbância média da alíquota acrescida de padrão)

$A_{plac} = 0,1640$ (absorbância média do placebo da amostra)

$C_p = 250,0$ mg (concentração do padrão)

$C_a = 0,3435 - 0,1640 / 0,4560 \cdot 250,0$

$C_a = 98,41$ mg de MTD que equivale a 98,41% em relação a 100,0 mg de MTD padrão adicionadas à alíquota.

A figura 5 apresenta os resultados encontrados para as amostras comerciais de comprimidos de MTD, após aplicação do teste da linearidade segundo o método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de diazotação e acoplamento.

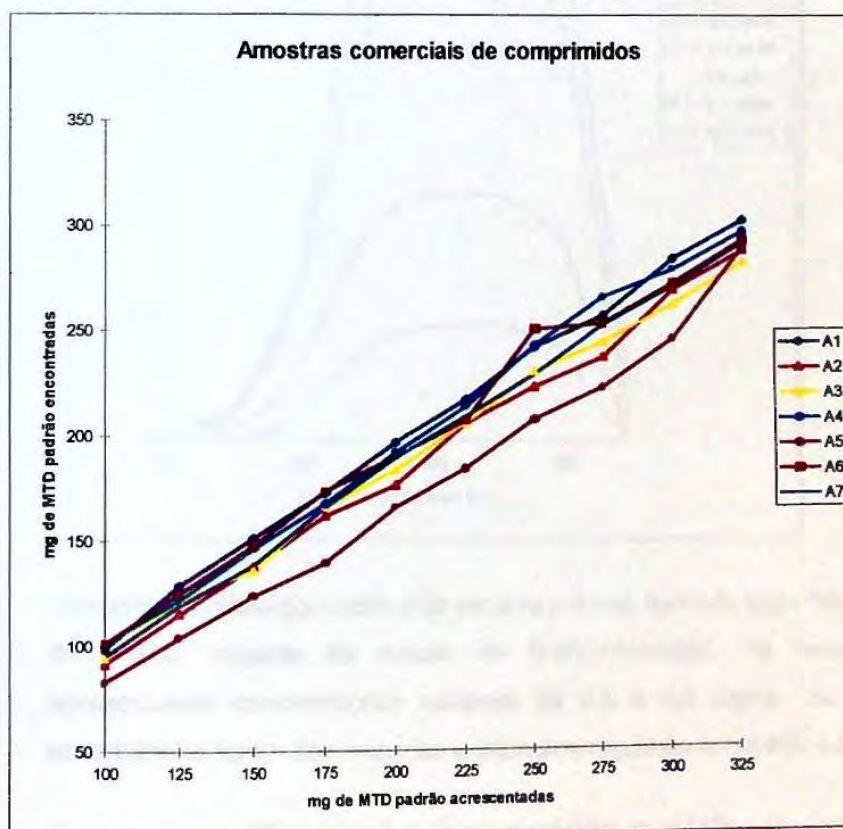


Figura 5 Representação gráfica dos resultados obtidos para as amostras comerciais de comprimidos após o teste da linearidade, segundo método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As tomadas de ensaio corresponderam a diferença entre o peso médio e a quantidade declarada de MTD, às quais foram acrescentadas quantidades variáveis entre 100,0 e 325,0 mg de MTD.

5.2.2 - Para o benzoilmetronidazol

O espectro de absorção referente ao BMTD foi desenvolvido a partir de soluções padrão em cinco concentrações que foram submetidas à hidrólise alcalina e reação de diazotação e acoplamento. O máximo de absorção encontrado foi em 539 nm e os espectros são ilustrados na figura 6.

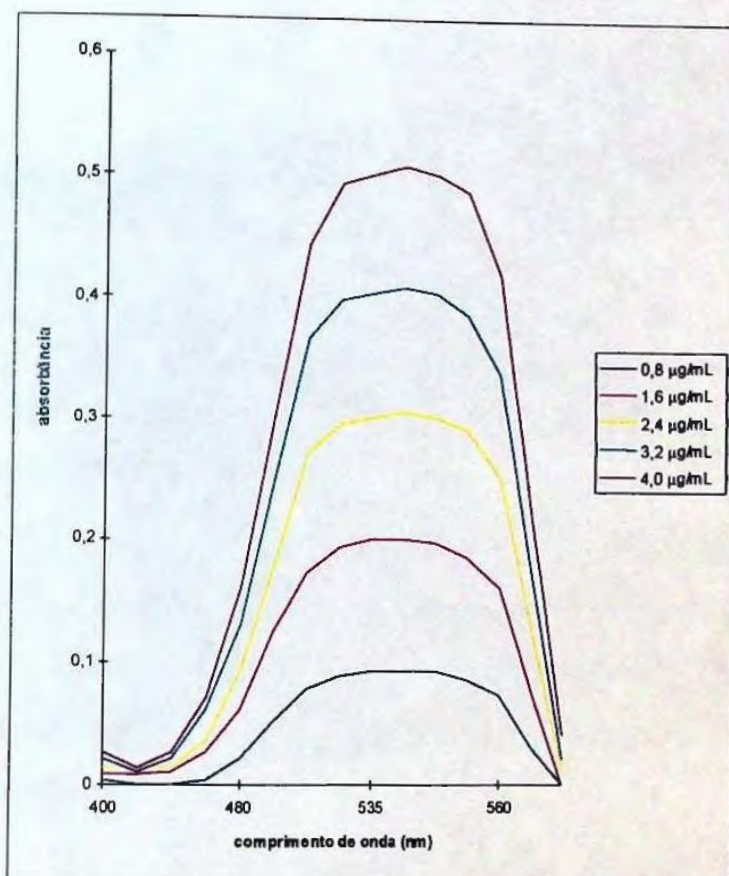


Figura 6 Espectros de absorção obtidos do produto colorido formado após hidrólise alcalina do BMTD, seguida da reação de Bratton-Marshall. As soluções padrão apresentaram concentrações variáveis de 0,8 a 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD e as absorbâncias foram determinadas a intervalos regulares entre 400 e 600 nm.

A reta de calibração foi desenvolvida a partir de uma solução padrão contendo 40,33 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD e a reta obtida é ilustrada na figura 7. O coeficiente de correlação foi de 0,999 e os valores da precisão não foram calculados uma vez que o coeficiente linear (a) quando submetido ao teste de significância mostrou-se significativo indicando comprometimento da reta.

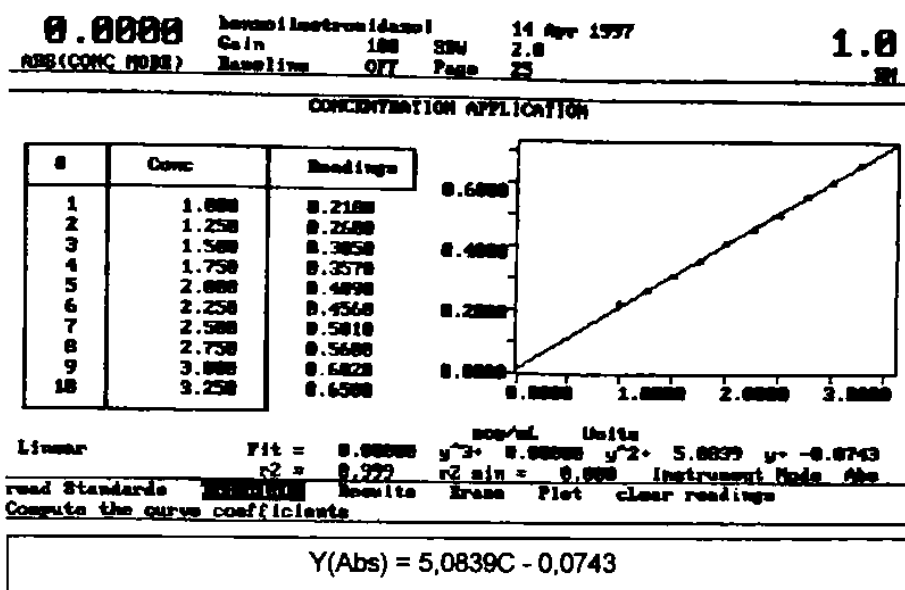


FIGURA 7 Reta de calibração obtida de uma solução padrão de BMTD após hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As soluções finais de leitura representaram concentrações no intervalo de 1,6 à 5,2 µg/mL de BMTD e as absorvâncias foram determinadas a 539 nm.

Os teores de BMTD encontrados nas amostras comerciais de suspensões, após aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de diazotação e acoplamento, são demonstrados na tabela VI. Cada determinação foi repetida 10 vezes e os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente.

TABELA VI Resultados obtidos para as amostras de suspensões comerciais após aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. A tomada de ensaio foi igual a 10,0 mL de suspensão, equivalente a 403,3 mg de BMTD e os valores apresentados significam a média de 10 determinações.

amostra	teor (mg)	%	DP	CV
S1	380,53	94,35	1,968	0,834
S2	235,67	58,44	1,179	0,807
S3	390,73	96,88	2,393	0,988
S4	380,47	94,34	2,195	0,930
S5	232,20	57,57	6,388	4,240
S6	234,20	58,07	9,050	5,868

DP = desvio padrão CV = coeficiente de variação

Para o teste de recuperação, os resultados não se mostraram satisfatórios. A tabela VII registra a concentração prática encontrada e a respectiva porcentagem de recuperação de cada amostra.

TABELA VII Resultados obtidos para as amostras de suspensões após a aplicação do teste de recuperação, segundo o método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. A tomada de ensaio foi igual a 5,0 mL de suspensão (equivalente a 201,6 mg de BMTD) à qual foram acrescentadas 201,6 mg de BMTD padrão. Os valores representam a média de 10 análises.

amostra	teor (mg)	% recuperada
S1	437,10	108,40
S2	235,65	58,43
S3	416,43	103,25
S4	238,02	59,01
S5	244,69	60,67
S6	417,06	103,40

Com relação à linearidade, a figura 8 traz os resultados encontrados para as suspensões comerciais. A tomada de ensaio correspondeu a 201,6 mg de BMTD às quais foram adicionadas quantidades de 10,0 a 50,0 mg de benzoilmetronidazol padrão. Os resultados da amostra S6 não foram apresentados na referida figura uma vez que não foi encontrada outra amostra do mesmo lote, para a conclusão das análises.

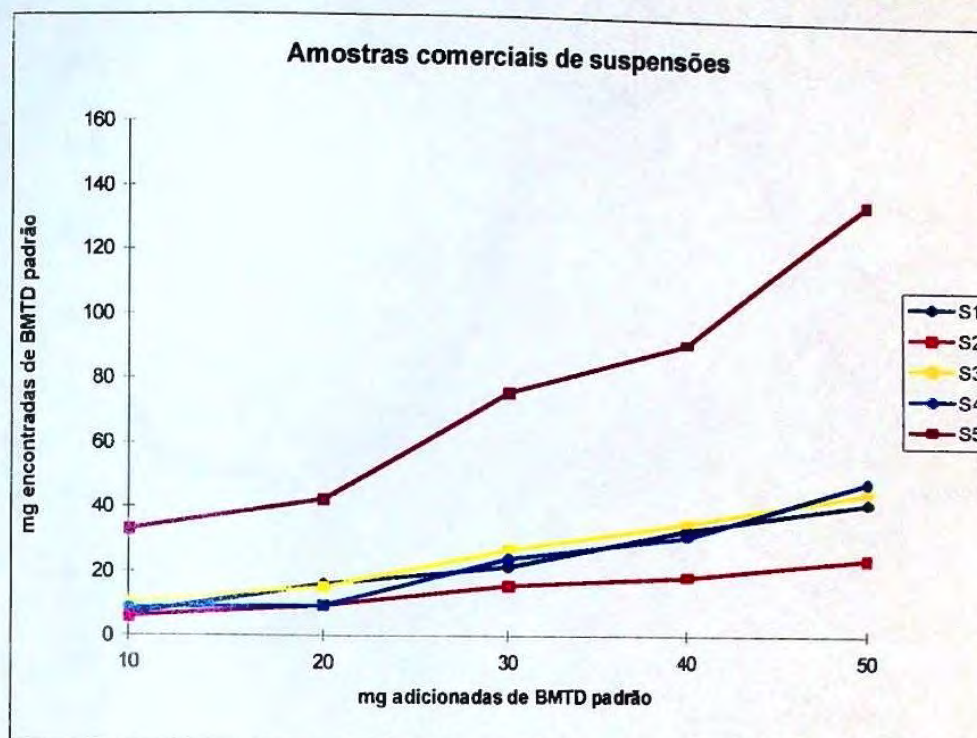


Figura 8 Representação gráfica dos resultados obtidos com as amostras de comerciais de suspensões, após teste da linearidade segundo método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall. As tomadas de ensaio foram iguais a 5,0 mL de suspensão (equivalentes a 201,6 mg de BMTD) aos quais foram adicionadas quantidades variáveis de 10,0 a 50,0 mg de BMTD padrão.

5.3 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM REDUÇÃO DO GRUPO NITRO E REAÇÃO DE BRATTON-MARSHALL

O produto colorido formado a partir de uma solução padrão de MTD submetida à redução com zinco em meio ácido e reação de Bratton-Marshall, apresentou espectros de absorção representados na figura 9. Foram preparadas soluções em duas concentrações (200,0 e 400,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD) com variação no volume do reativo N-1-naftiletlenodiamina.

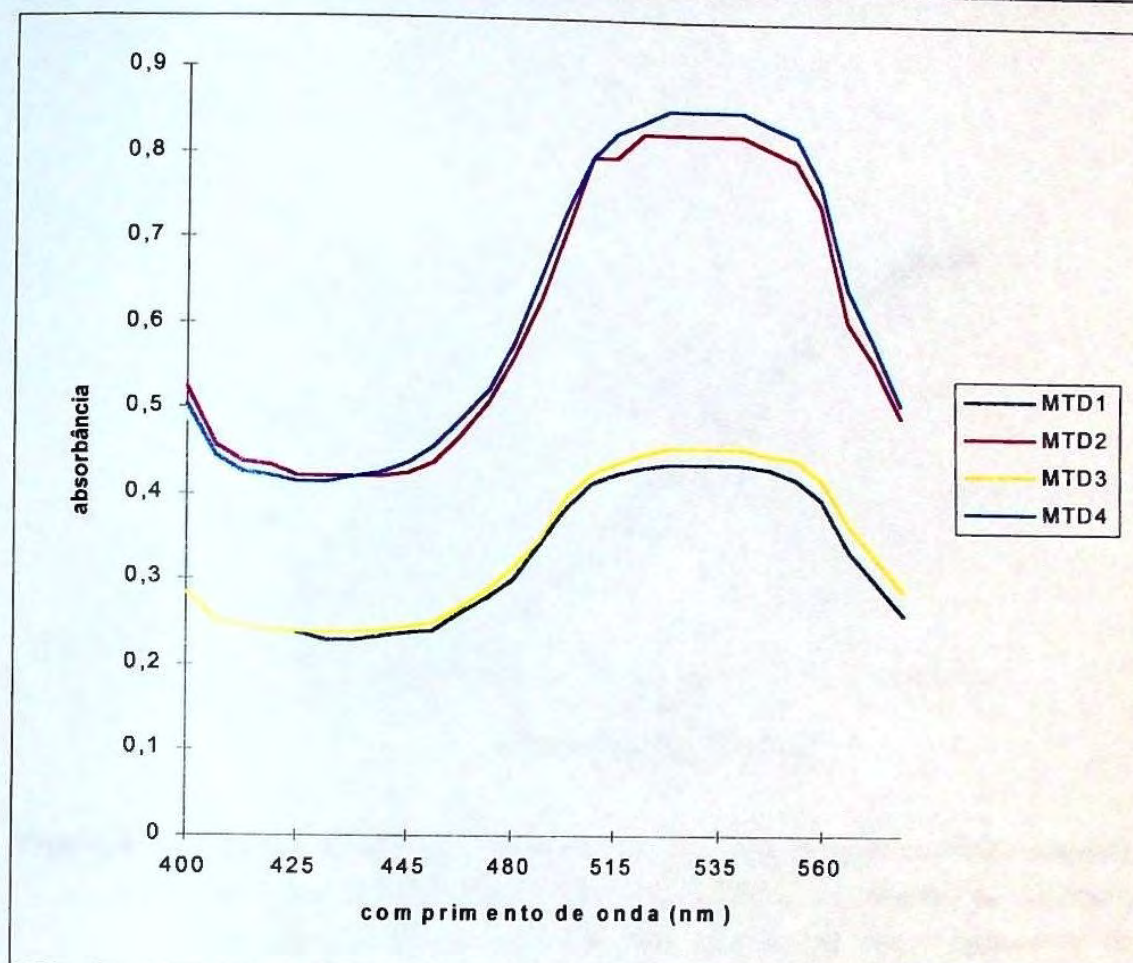


Figura 9 Espectros de absorção obtidos do produto colorido formado após redução do MTD com zinco em meio ácido, seguida da reação de Bratton-Marshall. As concentrações das soluções padrão foram de 200,0 (MTD1 e 3) e 400,0 (MTD2 e 4) $\mu\text{g/mL}$ de MTD e os volumes do reativo N-1-naftiletlenodiamina foram iguais a 5,0 (MTD1 e 2) e 10,0 (MTD3 e 4) mL. As absorbâncias foram determinadas a intervalos regulares entre 400 e 600 nm.

A curva de Ringbom obtida é apresentada na figura 10, e o intervalo de concentração avaliado correspondeu a 20,0 e 680,0 $\mu\text{g/mL}$ MTD.

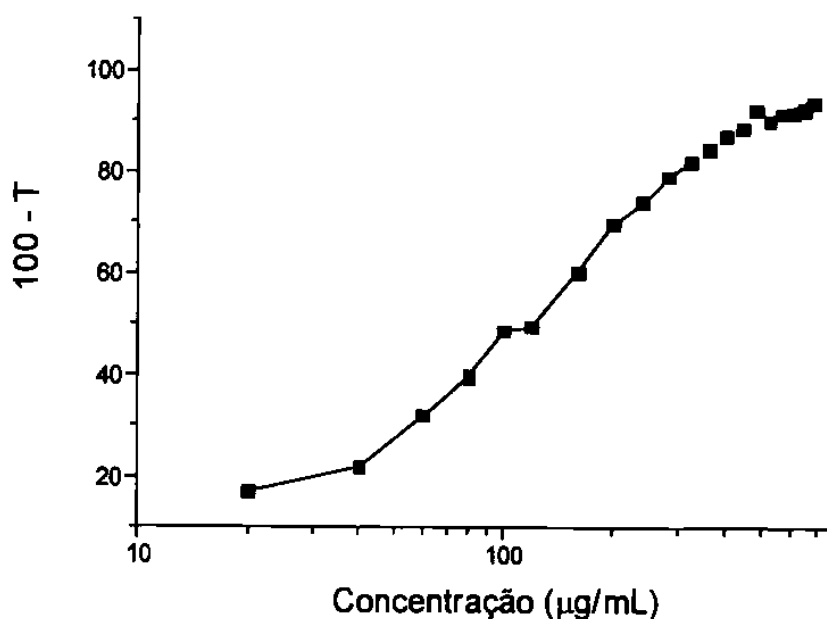


Figura 10 Curva de Ringbom obtida de uma solução padrão de MTD submetida a redução com zinco em meio ácido, seguida de reação de diazotação e acoplamento. As concentrações das soluções de leitura variaram de 20,0 a 680,0 µg/mL de MTD e as absorbâncias foram determinadas a 530 nm.

Com os resultados acima, pode-se realizar a experiência para obtenção da reta de calibração que é demonstrada na figura 11 onde é indicada a equação da reta teórica. O coeficiente de correlação encontrado foi igual a 0,994, e os valores da precisão não foram calculados uma vez que o coeficiente linear (a), quando submetido ao teste de significância mostrou-se significativo indicando comprometimento da reta.

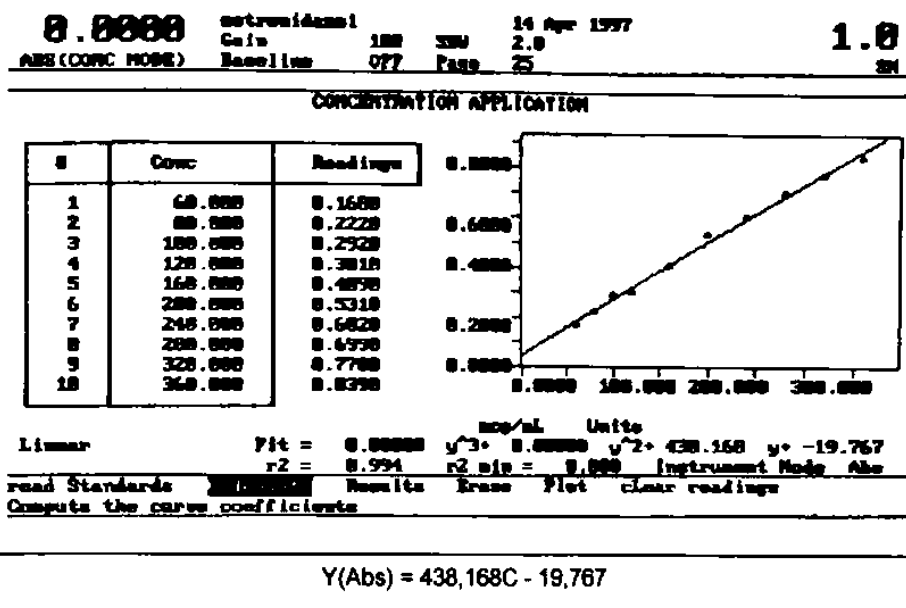


Figura 11 Reta de calibração obtida de uma solução padrão de MTD segundo método espectrofotométrico com redução do nitro grupo pelo zinco em meio ácido, seguida da reação de diazotação e acoplamento. As soluções finais de leitura apresentaram concentrações no intervalo de 60,0 á 360,0 µg/mL de MTD e as absorbâncias foram determinadas a 530 nm.

Após preparação de 10 alíquotas da amostra padronizada de comprimidos e da aplicação do método em questão, foram encontrados os seguintes resultados individuais: 231,3; 216,3; 216,3; 221,1; 238,3; 217,9; 227,7; 216,3; 231,3; 217,9 mg de MTD. O teor declarado de MTD é de 250 mg por comprimido e a média dos valores encontrados foi igual a 223,4 mg de MTD correspondendo a 89,36%, com desvio padrão de 8,043 e coeficiente de variação igual a 3,6 %.

Quando da realização do teste de recuperação na amostra padronizada de comprimidos de MTD, os valores encontrados variaram muito e ficaram distantes daqueles esperados, não permitindo uma avaliação confiável.

5.4 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM ABSORÇÃO NO UV

5.4.1 - Para o metronidazol

Os resultados da experiência para verificação do espectro de absorção do MTD, em função do pH estão ilustrados na figura 12.

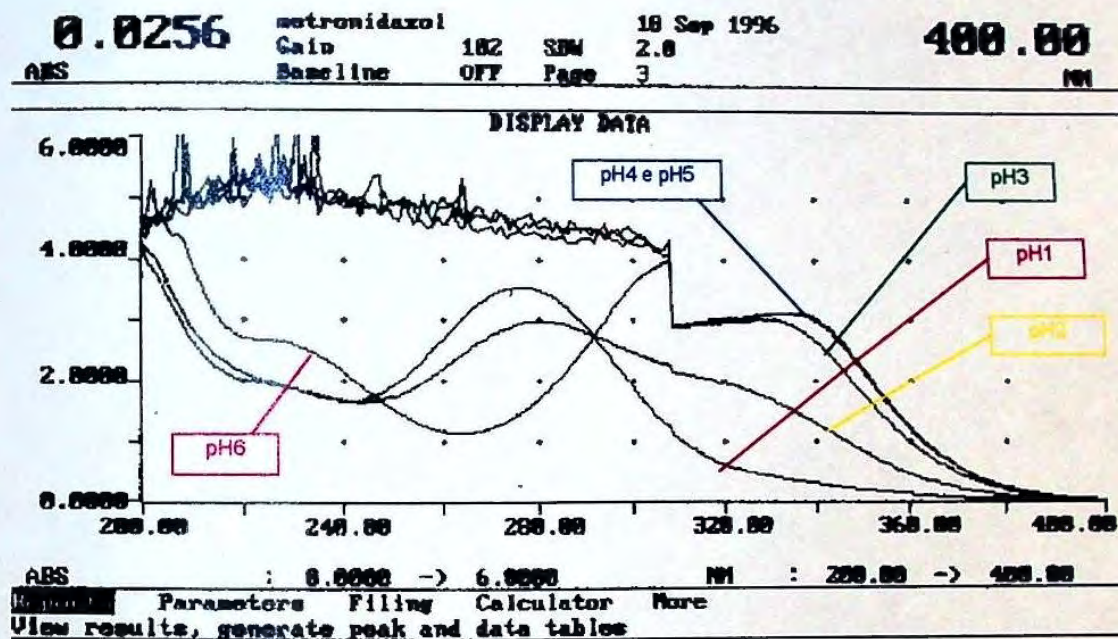


Figura 12 Espectros de absorção das soluções padrão de MTD preparadas em solução tampão de pH entre 1 e 6. A concentração das soluções foi igual a 100 µg/mL de MTD e as absorbâncias foram determinadas a intervalos regulares de 200 à 400 nm.

Na figura 13 está representada a curva de Ringbom obtida de uma solução padrão de MTD com pH igual a 1.

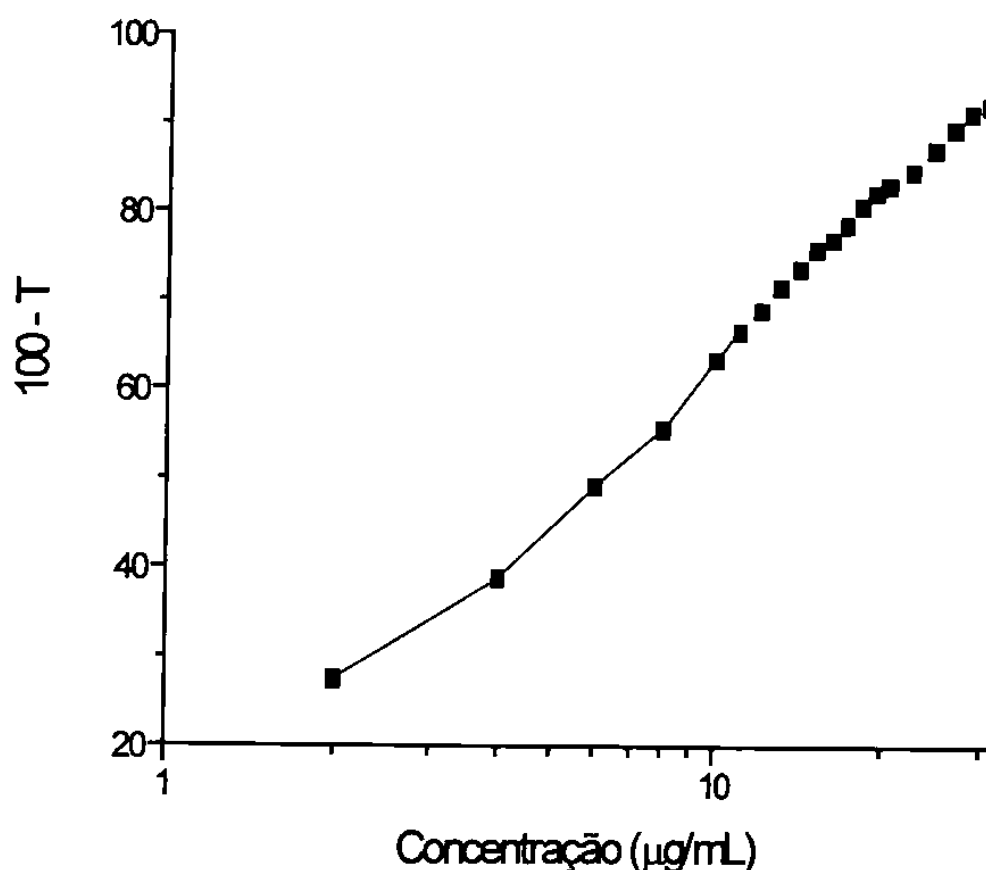


Figura 13 Curva de Ringborn obtida de uma solução padrão de MTD submetida ao método espectrofotométrico no UV em ácido clorídrico 0,1N. As concentrações das soluções de leitura variaram de 2,0 a 30,0 µg/mL de MTD e as absorbâncias foram determinadas a 277 nm.

Os resultados da reta de calibração são apresentados na figura 14, onde está indicado a equação da reta teórica. O coeficiente de correlação foi igual a 0,999, precisão absoluta igual a 0,2959 µg/mL enquanto a precisão relativa 2,2764%.

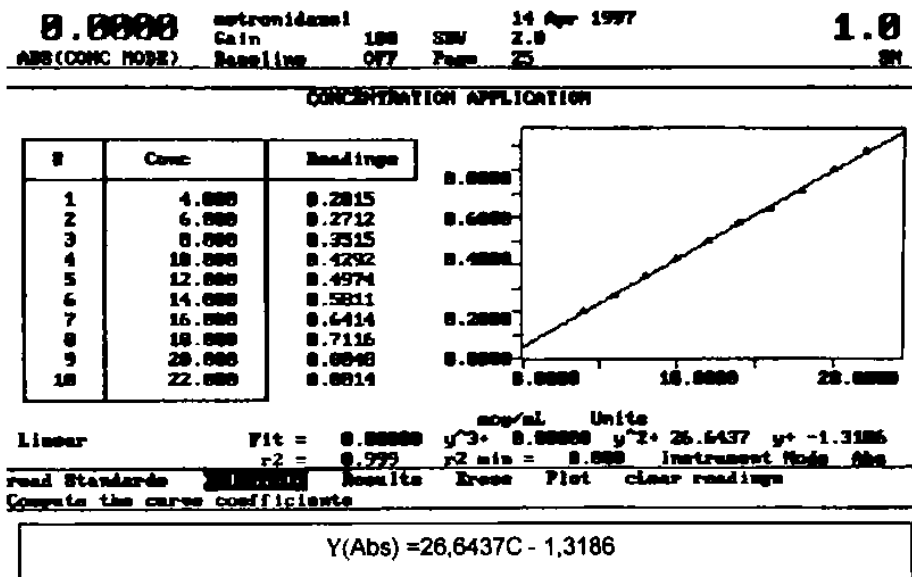


Figura 14 Reta de calibração obtida de uma solução padrão contendo 200,0 µg/mL de MTD submetida ao método espectrofotométrico no UV. As soluções finais de leitura apresentaram concentrações no intervalo de 4,0 à 22,0 µg/mL de MTD e as absorvâncias foram determinadas a 277 nm.

A aplicação do método na análise das amostras padronizada e comerciais de comprimidos apresentou os resultados que estão resumidos na tabela VIII.

TABELA VIII Resultados obtidos após análise das amostras padronizada e comerciais de comprimidos de MTD pelo método espectrofotométrico no UV em HCl 0,1N. A tomada de ensaio foi equivalente a 250,0 mg de MTD e os valores indicados representam a média de 10 determinações.

amostra	teor (mg)	%	DP	CV
A1	245,19	98,07	1,64	1,11
A2	230,14	92,06	3,15	1,37
A3	232,50	93,00	2,45	1,05
A4	243,66	97,64	2,30	0,94
A5	244,67	98,04	1,63	1,10
A6	245,00	98,00	2,74	1,12
A7	244,83	98,27	2,17	0,88
Ap	247,65	99,06	0,993	0,40

DP = desvio padrão CV = coeficiente de variação

Na tabela IX estão demonstrados os resultados obtidos após o teste de recuperação do padrão, aplicado às amostras padronizada e comerciais de comprimidos de MTD.

TABELA IX Resultados obtidos para as amostras padronizada e comerciais de comprimidos, após aplicação do teste de recuperação, segundo método espectrofotométrico no UV em HCl 0,1N. As tomadas de ensaio corresponderam a 125,0 mg de MTD às quais foram acrescentadas 125,0 mg de MTD padrão. Os valores apresentados significam a média após 10 análises.

amostra	teor (mg)	% recuperada
A1	241,89	96,76
A2	242,95	97,16
A3	247,80	98,21
A4	241,80	96,72
A5	247,38	99,03
A6	248,47	99,38
A7	248,40	99,36
Ap	248,95	99,57

A linearidade do método aplicado à amostra padronizada de comprimidos está demonstrada na figura 15. Com relação às amostras comerciais de comprimidos, a figura 16 apresenta os resultados ilustrados graficamente, após o mesmo teste.

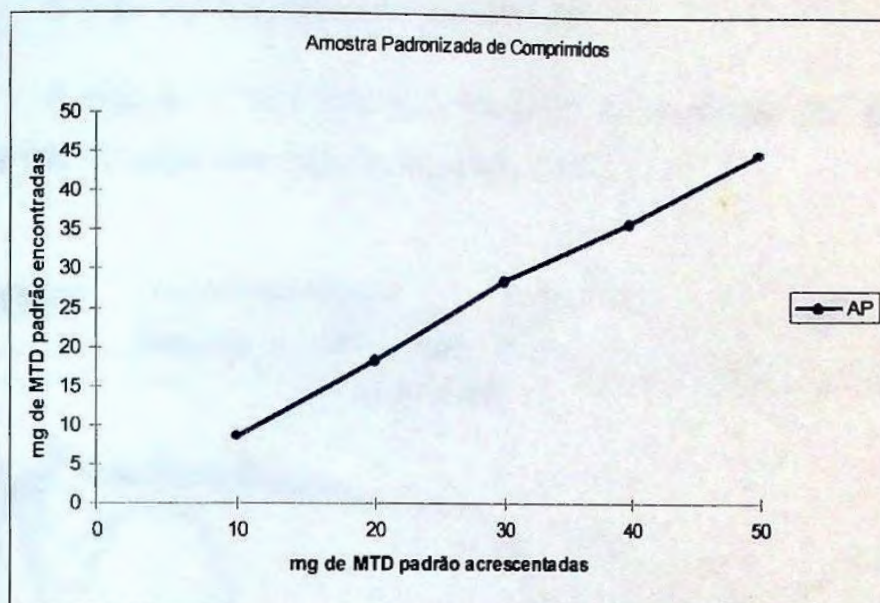


Figura 15 Representação gráfica dos resultados obtidos após aplicação do teste de linearidade à amostra padronizada de comprimidos, segundo método espectrofotométrico no UV. As tomadas de ensaio foram iguais a 130,0 mg do pó dos comprimidos às quais foram acrescentadas quantidades iguais a 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg de MTD padrão. As absorbâncias foram determinadas a 277 nm.

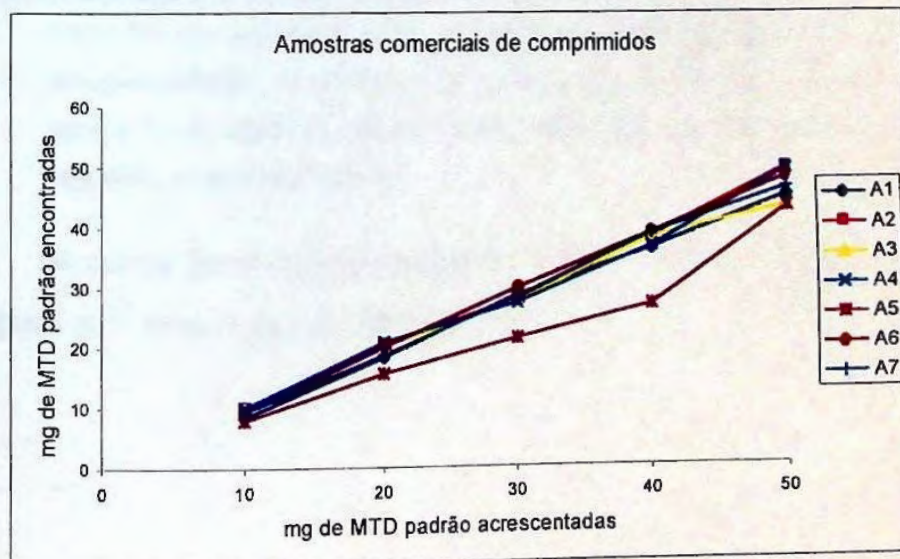


Figura 16 Representação gráfica dos resultados obtidos para as amostras comerciais de comprimidos, submetidas ao teste da linearidade segundo o método espectrofotométrico no UV. As tomadas de ensaio foram iguais à diferença entre o peso médio e a quantidade declarada de MTD às quais foram adicionadas quantidades variáveis de 10,0 a 50,0 mg de MTD padrão. As absorbâncias foram determinadas a 277 nm.

5.4.2 - Para o benzoilmetronidazol

A figura 17 representa o espectro de absorção de soluções padrão de BMTD com intervalo de pH entre 1 a 6.

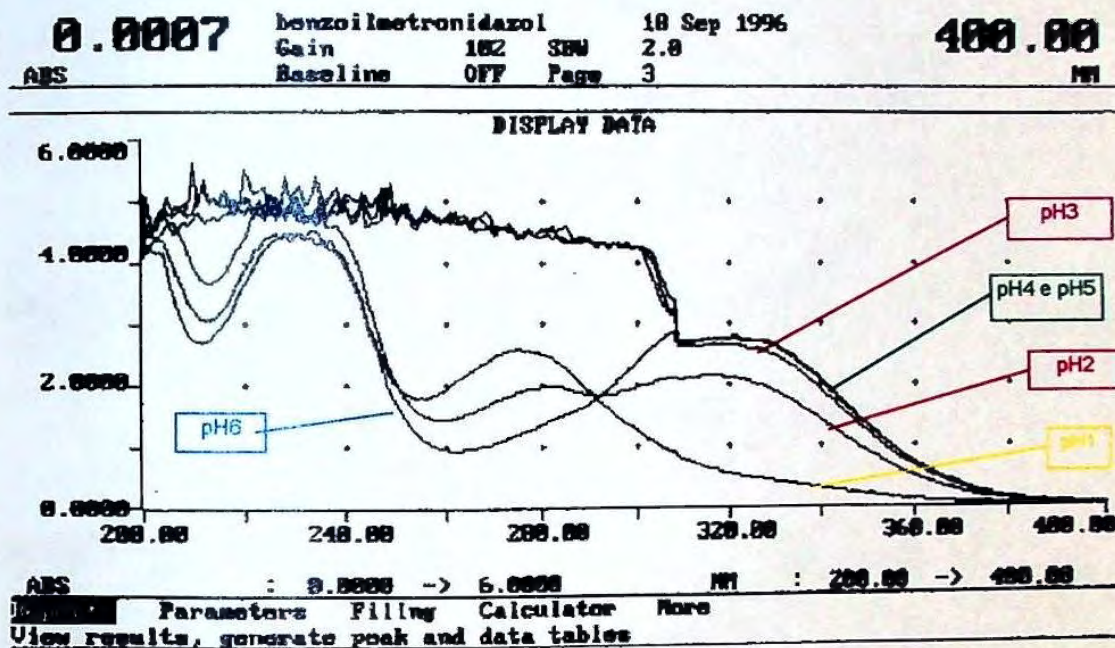


Figura 17 Espectros de absorção obtidos de soluções padrão de BMTD preparadas em soluções tampão de pH entre 1 à 6. A concentração das soluções de leitura foi igual a 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de BMTD e as absorbâncias foram determinadas a intervalos regulares entre 200 e 400 nm.

A curva de Ringbom obtida de uma solução padrão de BMTD com pH igual a 1, está ilustrada na figura 18.

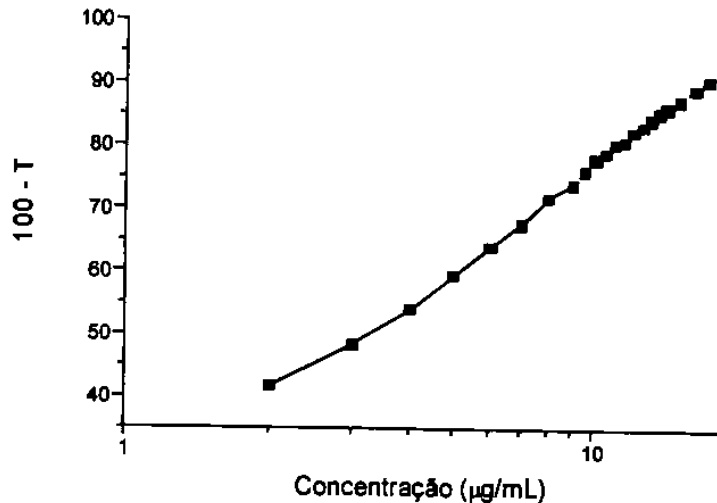


Figura 18 Curva de Ringbom obtida de uma solução padrão de BMTD após ser submetida ao método espectrofotométrico no UV. As concentrações das soluções de leitura variaram de 2,0 a 17,0 µg/mL de BMTD e as absorvâncias foram determinadas a 277 nm.

A reta de calibração é demonstrada na figura 19 onde também está indicada a equação da reta teórica. O coeficiente de correlação foi igual 0,998 e a precisão não foi calculada porque o coeficiente linear da reta (a), quando submetido ao teste de significância mostrou-se significativo comprometendo assim a validade da reta.

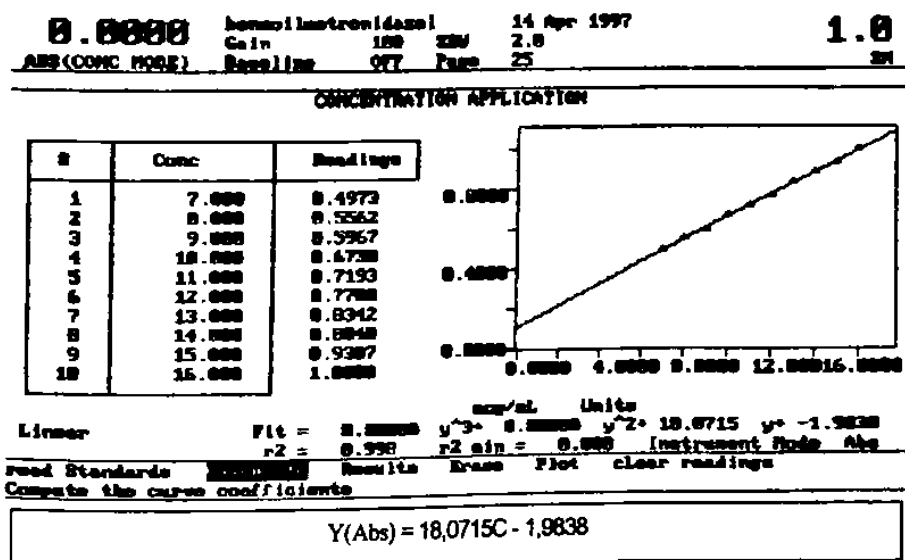


FIGURA 19 Reta de calibração obtida de uma solução padrão de BMTD submetida ao método espectrofotométrico no UV. As soluções finais de leitura apresentaram concentrações o intervalo de 7,0 à 16,0 µg/mL de BMTD e as absorvâncias foram determinadas a 277 nm.

Os resultados da aplicação do método nas amostras de suspensões forneceu os resultados que podem ser vistos na tabela X.

TABELA X Resultados obtidos para as amostras de suspensões comerciais após aplicação do método espectrofotométrico no UV em ácido clorídrico 0,1N. A tomada de ensaio foi igual a 10,0 mL correspondente a 403,3 mg de BMTD e os valores apresentados significam a média de 10 análises.

amostra	teor prático (mg)	%	DP	CV
S1	414,25	102,70	2,60	0,627
S2	403,46	100,04	2,92	1,170
S3	428,14	106,10	3,21	1,210
S4	406,10	100,70	2,48	0,985
S5	398,37	98,78	2,78	1,120
S6	396,20	98,24	2,41	0,984

DP = desvio padrão CV= coeficiente de variação

O teste de recuperação aplicado às amostras de suspensões segundo o método espectrofotométrico no UV, apresentou valores que estão demonstrados na tabela XI.

TABELA XI Resultados obtidos das amostras de suspensões submetidas ao teste de recuperação, segundo método espectrofotométrico no UV em ácido clorídrico 0,1N. A tomada de ensaio foi igual a 5,0 mL de suspensão (equivalente a 201,6 mg de BMTD) à qual foram acrescentadas 201,6 mg de BMTD padrão. Os valores apresentados significam a média de 10 análises

amostra	teor encontrado	% recuperada
S1	418,70 mg	104,90
S2	381,98 mg	89,42
S3	414,67 mg	99,50
S4	416,28 mg	105,76
S5	413,15 mg	106,10
S6	407,32 mg	103,70

5.5 - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO COM NITROPRUSIATO DE SÓDIO E CLORETO DE HIDROXILAMÔNIA

Através da experiência para obtenção dos espectros de absorção, ficou evidente que o ponto de máxima absorção para o MTD, é em 560 nm. A figura 20 demonstra tal resultado.

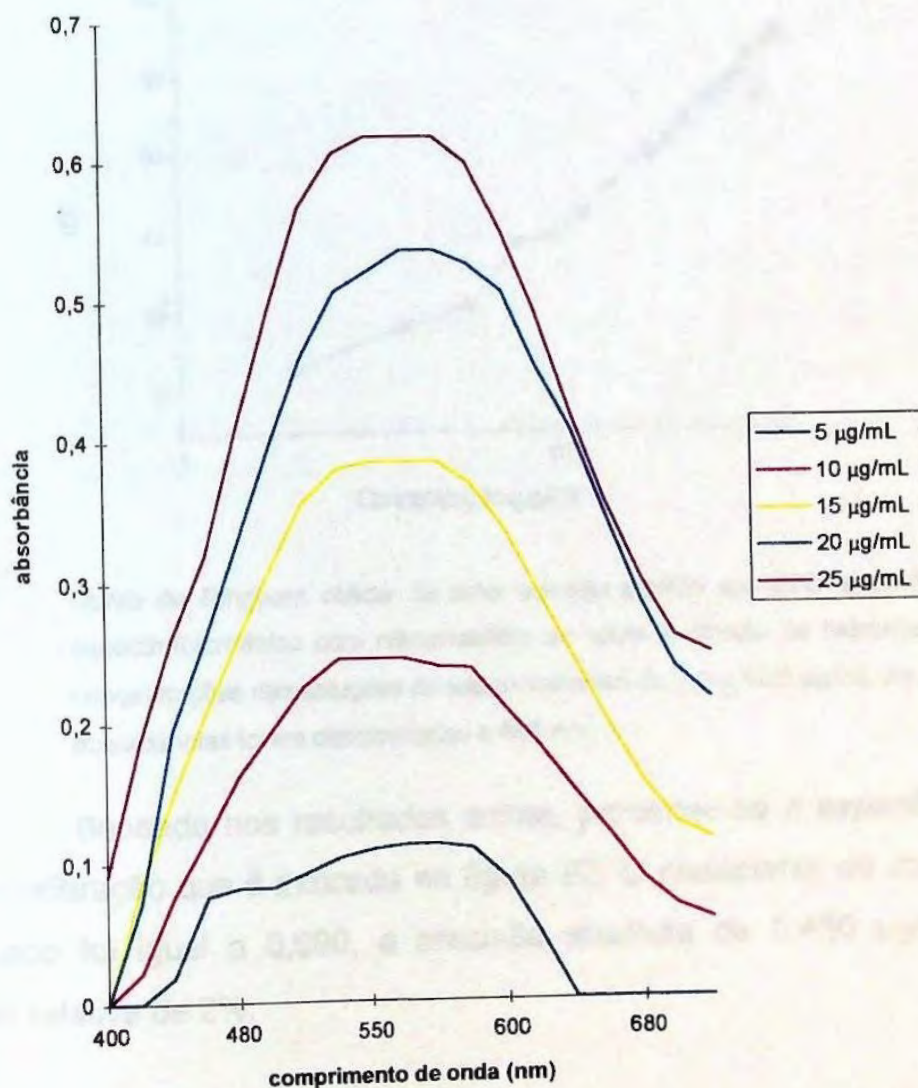


Figura 20 Espectros de absorção do produto colorido formado após reação de complexação do MTD padrão com nitroprussiato de sódio na presença de cloreto de hidroxilamônia. As soluções padrão apresentaram concentrações iguais a 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL e as absorbâncias foram determinadas a intervalos regulares entre 400 e 720 nm

Para a obtenção da curva de Ringbom, dificuldades práticas surgiram uma vez que houve variação na tonalidade e instabilidade da coloração esperada. Na figura 21 pode-se observar que o intervalo entre 10,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD representa aquele que obedece a lei de Lambert-Beer.

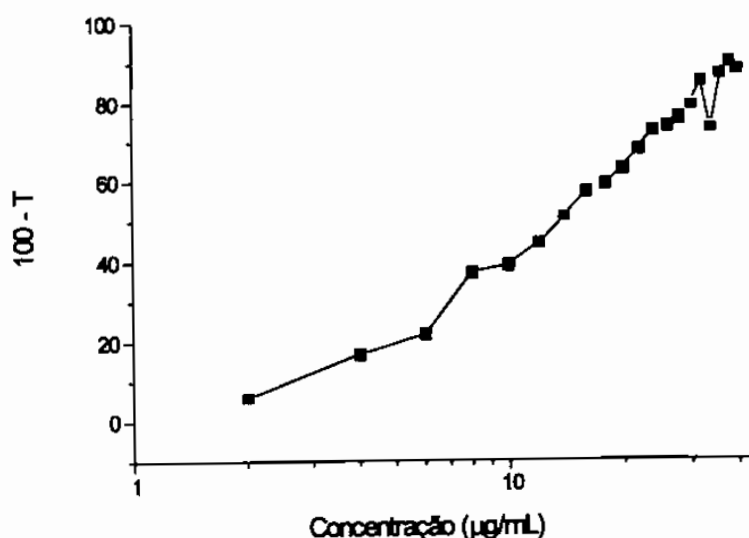
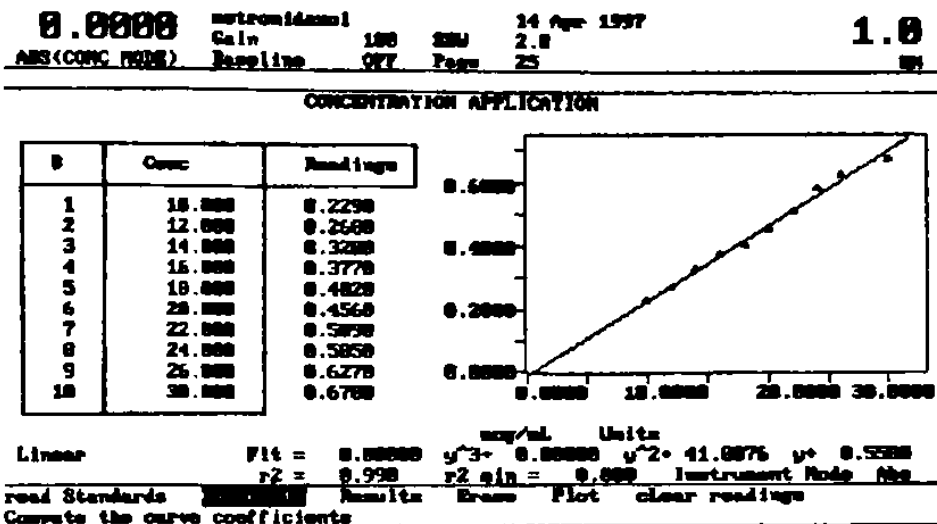


Figura 21 Curva de Ringbom obtida de uma solução padrão de MTD segundo método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia. As concentrações das soluções de leitura variaram de 2,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$ de MTD e as absorvâncias foram determinadas a 560 nm.

Baseado nos resultados acima, procedeu-se a experiência da reta de calibração que é indicada na figura 22. O coeficiente de correlação encontrado foi igual a 0,990, a precisão absoluta de 0,400 $\mu\text{g/mL}$ e a precisão relativa de 2%.



$$Y(\text{Abs}) = 41,0876C + 0,5580$$

Figura 22 Reta de calibração obtida de uma solução padrão de MTD submetida ao método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia. As concentrações das soluções de leitura variaram de 10,0 à 30,0 µg/mL e as absorbâncias foram determinadas a 560 nm

6 - ADENDO

a) Para o cálculo da reta de calibração, empregou-se o método dos quadrados mínimos segundo o qual a melhor reta estima os valores da variável dependente, de tal modo que, a soma dos quadrados dos desvios entre o valor experimental e o valor esperado, é mínima.

Roteiro para o cálculo:

Abs X	Conc (µg/mL) Y	x^2	y^2	xy
0,218	1,00	0,047524	1	0,218
0,260	1,25	0,06760	1,5625	0,325
0,305	1,50	0,093025	2,25	0,4575
0,357	1,75	0,127449	3,0625	0,62475
0,409	2,00	0,167281	4	0,818
0,456	2,25	0,207936	5,0625	1,026
0,501	2,50	0,251001	6,25	1,2525
0,560	2,75	0,31360	7,5625	1,54
0,602	3,00	0,362404	9	1,806
0,658	3,25	0,432964	10,5625	2,1385
$\Sigma x = 4,326$	$\Sigma y = 21,25$	$\Sigma x^2 = 2,070784$	$\Sigma y^2 = 50,3125$	$\Sigma xy = 10,20625$

Matriz para o cálculo da reta sendo $n = 10$

x	y	xy
$\Sigma x = 4,326$	$\Sigma y = 21,25$	$\Sigma xy = 10,20625$
$\bar{x} = 0,4326$	$\bar{y} = 2,125$	$\Sigma x \cdot \Sigma y = 91,9275$
$\Sigma x^2 = 2,070784$	$\Sigma y^2 = 50,3125$	
$(\Sigma x)^2 = 18,714276$	$(\Sigma y)^2 = 451,5625$	

$$A = S_{xx} = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$$

$$A = 2,070784 - \frac{18,714276}{10}$$

$$A = 0,1993564$$

$$B = S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$B = 50,3125 - \frac{451,5625}{10}$$

$$B = 5,15625$$

$$C = S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x \cdot \sum y)}{10}$$

$$C = 10,20625 - \frac{(4,326 \cdot 21,25)}{10}$$

$$C = 1,0135$$

Cálculo do coeficiente de Pearson (r):

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

$$r = \frac{1,0135}{\sqrt{0,1993564 \cdot 5,1563}}$$

$$r = 0,9996$$

Cálculo do valor de b:

$$b = \frac{C}{A}$$

$$b = \frac{1,0135}{0,1993564}$$

$$b = 5,08385$$

$$b^2 = 25,84563$$

Cálculo do valor de a:

$$\bar{y} = a + b\bar{x}, \text{ portanto } a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 2,125 - 5,08385 \cdot 0,4326$$

$$a = -0,007427$$

Teste de significância de a ; para tanto aplica-se o teste "t":

$$t = \frac{a}{S(a)}$$

$$S(a) = \frac{s \cdot \sum x^2}{n \cdot A}$$

$$s = \sqrt{\frac{S}{n-2}}$$

$$S = B - (b^2 \cdot A)$$

$$S = 5,15625 - (25,84563 \cdot 0,1993564)$$

$$S = 0,0037583$$

$$\text{então, } s = 0,0216725 \quad S(a) = 0,0225119 \quad t = 0,32991$$

Sabe-se que para $P = 95\%$ e $n = 10$, o "t" determinado é igual a 2,262. Como o "t" encontrado é menor que o tabelado, conclui-se que o valor de a não é significativo e que a reta passa pela origem. Uma vez que o teste "t" demonstrou que o valor de a não é significativo, calculou-se o valor de b' pela expressão:

$$b' = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

$$b' = \frac{10,20625}{2,070784}$$

$$b' = 4,928688$$

Cálculo da precisão absoluta (E):

$$E = \frac{\sum y^2 - b' \cdot \sum xy}{n-1}$$

$$E = \frac{50,3125 - 4,928688 \cdot 10,20625}{9}$$

$$E = \frac{50,1325 - 4,928688 \cdot 10,20265}{9} \quad E = 0,0010$$

Cálculo da precisão relativa (e):

$$e = \frac{100.E}{y}$$

$$e = \frac{100.0,00100}{2,125}$$

$$e = 0,04746\%$$

a) Para o cálculo do coeficiente de variação

Abaixo segue um roteiro para a determinação do coeficiente de variação referente à amostra padronizada de comprimidos contendo 250 mg de MTD, quando da aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall.

amostra	absorbância (539 nm)
1	0,420
2	0,426
3	0,420
4	0,426
5	0,432
6	0,426
7	0,426
8	0,426
9	0,426
10	0,432
média 0,424	

padrão	absorbância (539 nm)
1	0,432
2	0,432
3	0,432
média 0,432	

A concentração de metronidazol (C_a) referente a cada ensaio foi calculada pela expressão:

$$C_a = \frac{A_a}{A_p} \cdot C_p \quad \text{onde}$$

A_a = absorvância da amostra

A_p = absorvância do padrão

C_p = concentração do padrão

Para o cálculo da porcentagem de metronidazol na amostra, usou-se a seguinte expressão:

$$\% = \frac{C_a \cdot 100}{C_{teórica}}$$

Para os 10 resultados apresentados, tem-se :

Conc (mg)	(x - X)	(x - X) ²
243,05	- 2,84	8,0656
246,53	0,64	0,4096
243,05	- 2,84	8,0656
246,53	0,64	0,4096
250,00	4,11	16,8921
246,53	0,64	0,4096
246,53	0,64	0,4096
246,53	0,64	0,4096
246,53	0,64	0,4096
250,00	4,11	16,8921
média (X) = 246,528		$\Sigma = 52,3730$

$$\text{Variância}(v) = \frac{\sum (x - X)^2}{n - 1}$$

$$v = \frac{52,3730}{9}$$

$$v = 5,8192$$

$$\text{DesvioPadrao}(DP) = \sqrt{v}$$

$$DP = 2,412$$

$$\text{CoeficienteDeVariacao}(CV) = \frac{100 \cdot DP}{X}$$

$$CV = \frac{100 \cdot 2,412}{246,528}$$

$$CV = 0,9783$$

O limite de confiança (LC) da média para 95% foi calculado como:

$$LC = X \pm t \cdot Sm$$

onde $t = 2,262$ para 9 graus de liberdade

$$Sm = \sqrt{\frac{DP}{n}}$$

$$Sm = \sqrt{\frac{0,9783}{10}}$$

$$Sm = 0,3127778$$

$$LC = 246,528 \pm 2,262 \cdot 0,3127778$$

$$LC = 246,528 \pm 0,7075033$$

7 - DISCUSSÃO

Os códigos oficiais ao apresentarem uma metodologia analítica, pressupõe-se que esta foi devidamente validada a partir de uma amostra padronizada preparada especificamente para este fim. No presente trabalho, uma vez selecionada a substância que serviria de suporte para o estudo da validação de métodos analíticos, preocupou-se em experimentar um método oficial já validado. A escolha pela titulação em meio não aquoso com ácido perclórico¹¹ considerou além da comprovada eficiência, sua adequação aos laboratórios de controle de qualidade que dispõem de recursos e equipamentos mais modestos. Reconhece-se o valor incontestável da HPLC, método preconizado na última revisão da Farmacopéia Americana⁸⁷, mas não contempla a real condição de trabalho de muitos laboratórios.

Como já foi mencionado anteriormente, a mudança na fórmula de um medicamento constitui-se em fator determinante para a revalidação do método. A amostra padronizada preparada para este trabalho é provavelmente diferente daquela utilizada para a validação da metodologia oficial. Neste caso, a aplicação do método titulométrico foi apenas para avaliação preliminar do comportamento deste método e os resultados encontrados para esta amostra foram compatíveis com os limites esperados e aceitos oficialmente. Além disto, a adoção de um método oficial como referência se constitui em uma das alternativas para a validação de métodos analíticos. Como a fórmula da amostra padronizada era conhecida, preparou-se um placebo que foi também titulado para observação de possíveis interferências dos excipientes. O consumo de ácido perclórico na análise deste foi insignificante. Isto foi suficiente para julgar que não havia necessidade de estudo mais aprofundado da titulação para este caso.

Com relação às amostras comerciais, a situação mostrou-se diferente. De um lado não foi possível preparar os respectivos placebos porque as fórmulas completas não eram conhecidas. Por outro lado, só foi possível aplicar o método titulométrico às amostras sólidas uma vez que, a presença de água nas suspensões invalidaria qualquer tentativa de análise destas amostras. Considerando que na preparação de comprimidos de MTD há fórmulas distintas, apesar de no geral as diferenças serem mínimas, quando da aplicação do método às 7 amostras comerciais de comprimidos, poder-se-ia esperar comportamento idêntico do método frente a estas amostras. Contudo, conforme pode ser visto na Tabela I, os resultados não podem ser considerados satisfatórios na sua maioria tanto para exatidão como em relação a precisão.

Tanto na análise da amostra padronizada como das amostras comerciais, o método comportou-se de maneira adequada. A extração com acetona quente que poderia causar alguma precipitação após filtração, como adverte TUCKERMAN & BICAN-FISTER⁸⁴ não ocorreu. A presença da mistura de ácido acético glacial e anidrido acético confirmou a nitidez da viragem do indicador.

Dentre os métodos analíticos empregados no controle de qualidade, a espectrofotometria sempre ocupou lugar de destaque. Até pouco tempo, a proporção de métodos espectrofotométricos encontrados na literatura correspondia a cerca de 90% em relação a outras metodologias. Este nível vem diminuindo nos últimos anos em consequência do grande interesse pelos métodos cromatográficos, em especial à HPLC.

A preferência pelos métodos espectrofotométricos justifica-se primeiramente pelo bom desempenho a nível de exatidão e precisão, os atributos mais importantes de qualquer método. A maioria dos autores

admite que quando estes métodos são bem conduzidos, os valores encontrados para exatidão e precisão, estão compatíveis com os níveis de exigência adotados nos códigos oficiais e laboratórios de controle de qualidade de medicamentos das indústrias farmacêuticas. Além disto, outra característica que merece destaque é a ótima sensibilidade permitindo operar na quase totalidade das análises de fármacos e medicamentos. Alguma restrição pode ser feita em relação a seletividade em razão da enorme diversificação das estruturas químicas encontradas entre os fármacos. Estas podem provocar algumas dificuldades na região do ultra violeta, particularmente quando dentro de um mesmo grupo farmacológico, as substâncias apresentam semelhanças estruturais levando a propriedades físico-químicas muito próximas. A espectrofotometria na região do visível, além das vantagens já citadas, pode ter a seletividade melhorada com o emprego de inúmeras reações colorimétricas aumentando o poder discriminativo do método. A prática consagrada de comparar as absorbâncias da amostra e padrão, através das soluções coloridas, favorece o acompanhamento das operações analíticas. O emprego de equipamentos simples e com a recomendação do uso da água como solvente para determinações espectrofotométricas, aliada à facilidade de execução, constituem-se em vantagens complementares que explicam o largo emprego do método no controle de qualidade. A estes fatores reúne-se o custo relativamente baixo.

Todas estas argumentações conduziram à decisão pela escolha do método espectrofotométrico para o desenvolvimento do presente trabalho. O objetivo foi observar os aspectos analíticos mais importantes de alguns métodos espectrofotométricos, iniciando-se pela seleção daqueles com maior e melhor potencial de aplicação, mesmo por aqueles laboratórios de condições mais limitadas. É evidente que sem a experimentação adequada, a avaliação dos métodos levantados na literatura seria prejudicada. Ao mesmo

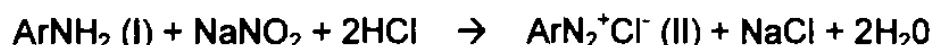
tempo, testar todos os trabalhos resultaria em desprendimento exagerado de tempo, custo, dificuldades na aquisição de material necessário e outros encargos não garantindo pleno sucesso no objetivo.

Infelizmente, os atributos exatidão, precisão e linearidade, que são os de maior interesse para avaliação do mérito dos métodos, não estão descritos nos trabalhos de maneira suficientemente clara a permitir um julgamento criterioso. As informações são insuficientes quanto as evidências experimentais que garantiriam a certeza dos resultados. A avaliação crítica dos métodos fundamentou-se nos indicadores experimentais já conhecidos e consagrados pelo longo tempo de uso. São representados pela reação química bem definida como é o caso da reação de diazotação e acoplamento^{72,78}, reação de complexação com ferro⁷⁴ facilidade de execução como é o caso da metodologia com absorção no UV²⁵, além de considerar-se sensibilidade, custo e materiais de fácil aquisição.

O trabalho de SANYAL⁷², reunia as melhores características dentro dos critérios considerados na seleção dos métodos. A hidrólise inicial do metronidazol para liberação do nitro grupo, originando o íon nitrito - agente determinante na reação de diazotação e acoplamento, não deveria oferecer maiores dificuldades. Mesmo assim, foi decidido observá-la considerando variáveis como tempo e condições de aquecimento. Os resultados da Tabela II demonstram que o uso de hidróxido de sódio 2N e banho maria fervente por 15 minutos, garantem o máximo de liberação do nitro grupo, não alterando-se com o aquecimento por mais de 60 minutos. Já em ampolas fechadas, a reação de hidrólise é mais lenta só atingindo o máximo após 45 minutos e com liberação do grupo nitro em menor escala. Neste caso pode-se acrescentar ainda as maiores dificuldades operacionais. Os dados encontrados pelo presente trabalho confirmam as informações do autor quanto ao tempo de hidrólise.

A hidrólise do metronidazol com produção de íons nitrito foi estudada por LAU e colaboradores⁴⁸ usando hidróxido de sódio 0,1N e banho maria fervente. Nestas condições, os resultados demonstraram que a liberação foi estequiométrica necessitando no entanto de duas horas para a completá-la, constituindo-se em uma desvantagem significativa nas análises rotineiras dos laboratórios de controle de qualidade.

Considerando a exatidão, precisão e sensibilidade, o clássico método de Bratton e Marshall⁸ é o mais adequado para doseamento de compostos com amino grupo aromático. Consiste na diazotação da sulfanilamida (I) com ácido nitroso para formar um sal de diazônio (II) em meio ácido. Este é então tratado com N-1-naftiletilenodiamina (III) para formar o composto azóico colorido (IV), que pode ser medido espectrofotometricamente. O esquema da reação é o seguinte⁵⁵:



A reação de Bratton e Marshall é desenvolvida de tal maneira que o ácido nitroso é produzido em excesso pela reação entre nitrito de sódio e ácido clorídrico. Antes da reação de acoplamento há necessidade de eliminar o excesso de ácido nitroso pelo tratamento com sulfamato de amônia. Tanto no presente trabalho como nos de SANYAL⁷² e LAU e colaboradores⁴⁸, não ocorreu este tratamento uma vez que o ácido nitroso formado foi proveniente e proporcional à quantidade de metronidazol. A sulfanilamida é que participa da reação em excesso, logo o espectro de absorção do produto colorido é resultante da reação do sal de diazônio da sulfanilamida com o agente copulante. No trabalho original de Bratton e Marshall⁸, o comprimento de onda determinado foi de 545 nm, enquanto que os outros dois autores determinaram respectivamente, 538 nm e 550 nm.

Estas diferenças não podem ser justificadas apenas pelo fato de se analisar diferentes nitroimidazóis como fez LAU e colaboradores⁴⁸, uma vez que todos estes compostos liberaram de maneira idêntica o nitro grupo. No presente trabalho, o máximo de absorção determinado foi em 539 nm ficando muito próximo ao estabelecido por SANYAL⁷². Em relação aos comprimentos de máxima absorção, é possível que as diferenças encontradas ocorram por conta do nível de resolução dos espectrofotômetros utilizados. É muito provável que em 1939 quando Bratton e Marshall trabalharam, o espectro de absorção tenha sido traçado manualmente com os dados obtidos de maneira rudimentar, não podendo assim comparar com os resultados obtidos com equipamentos mais modernos e precisos. Além do mais, os espectros de absorção em todos os casos apresentam razoável patamar no ponto de absorção máxima resultando praticamente em absorbâncias comparáveis nos comprimentos de onda indicados nos trabalhos.

Os dados da curva de Ringbom e reta de calibração foram suficientemente satisfatórios para o estudo da aplicação do método. Inicialmente a amostra padronizada e as 7 amostras comerciais de comprimidos foram submetidas ao método da hidrólise alcalina seguida da reação de Bratton-Marshall. Os resultados da Tabela IV mostram que apenas um medicamento forneceu resultados abaixo do limite mínimo aceitável (81,10%), enquanto todos os outros apresentaram após a média de 10 análises, valores de exatidão na ordem de 96 a 101% e precisão máxima de 1%. Estes resultados parecem satisfatórios e confirmados pelo teste de recuperação, conforme Tabela V. O teor muito baixo apresentado por um dos medicamentos, deve estar correto uma vez que a sua recuperação foi satisfatória.

Para o emprego do método nas amostras de suspensão, nas quais se usa o benzoilmetronidazol no lugar do metronidazol, foi necessário

estudar o comportamento deste composto para observação de sua característica espectrofotométrica nas mesmas condições de hidrólise seguida da reação de diazotização e acoplamento. Por esta razão, foi determinado o espectro de absorção e os resultados apresentados na figura 6 comprovam que não houve nenhuma alteração em relação ao metronidazol. Sob condições idênticas a este, obteve-se a reta de calibração e os valores encontrados confirmam a semelhança de comportamento.

Por outro lado, o emprego do método para análise das suspensões revelou, na maioria dos casos, resultados que comprometem a exatidão com valores muito abaixo do teor declarado. Isto não recomenda o emprego do método, apesar dos resultados satisfatórios encontrados para a precisão. Podemos admitir nestes casos, que as discrepâncias podem ser decorrentes da usual complexidade destas formulações nas quais há sempre grande número de componentes de estrutura e propriedades químicas diferentes. Outra hipótese é a instabilidade das formas farmacêuticas líquidas aliada à dificuldade na operação de amostragem, comprometendo a análise, além da característica de solubilidade do benzoilmetronidazol que implica na dificuldade de extração.

A variação de resultados no teste de recuperação com as amostras comerciais de suspensões induz a pensar que as causas apontadas anteriormente podem ser responsáveis por estes valores alterados, agindo individual ou conjuntamente. Situação semelhante ocorreu com o teste da linearidade uma vez que, os resultados oscilaram demasiadamente e isto pode ter ocorrido pelas mesmas causas já citadas.

Dentre as metodologias levantadas para a determinação do metronidazol, seja como matéria prima ou medicamento, a que mais pareceu promissora foi a relacionada à redução do nitro grupo. Esta

afirmação baseou-se no número de trabalhos descritos e pela simplicidade de reação uma vez que o metronidazol reduzido pode ser submetido à reações colorimétricas nas quais são usados diferentes reagentes cromogênicos. Estes podem ser exemplificados com o dimetilaminocinamaldeído⁵⁶, furfuraldeído⁴², solução de metol e dicromato de potássio⁷⁵, vanilina⁷¹ e reativo de Bratton-Marshall⁷⁸. A maioria dos autores utilizaram o zinco como agente redutor, em meio ácido e aquecimento enquanto HASSAN e colaboradores³⁶ sugeriram como alternativa o cloreto de amônia.

A escolha pela técnica analítica descrita por SETHI⁷⁸ levou em conta a confiabilidade consagrada que a reação de diazotação e acoplamento oferece. Uma vez que o metronidazol reduzido tem em sua estrutura um amino grupo, a amina primária formada reage prontamente com nitrito de sódio em meio ácido originando o sal de diazônio e que, ao reagir com o N-1-naftiletlenodiamina forma o composto azóico. A técnica descreveu a adição de sulfamato de amônia que tem a função exclusiva de eliminar íons nitrito formados em excesso que poderiam comprometer o desenvolvimento da reação quantitativa para o metronidazol.

Enquanto SANYAL⁷² determinou o metronidazol através da liberação do nitro grupo, o método agora descrito o faz considerando a redução deste grupamento para amino grupo e que é quantitativamente proporcional ao metronidazol tomado para análise. Diante destas informações já de domínio geral e procurando reproduzir o trabalho de SETHI⁷⁸, várias experiências foram realizadas. Entre estas, as determinações do espectro de absorção, da quantidade ideal de zinco, da proporcionalidade dos reagentes, do melhor tempo de aquecimento e da necessidade ou não da agitação da solução quando da reação de redução.

Estes ensaios pareceram necessários considerando a ausência de informações no trabalho de SETHI⁷⁸. Todos os resultados obtidos que a princípio o complementarizavam, apresentaram-se desfavoráveis e sem uniformidade, parecendo haver comprometimento da etapa correspondente à redução do metronidazol. Provavelmente, o composto reduzido na forma de amina seja instável como afirmou POPULAIRE e colaboradores⁶³, não reconhecendo a análise colorimétrica como ideal para quantificação do metronidazol. Há de se considerar ainda, que durante a reação outros compostos de natureza desconhecida podem se fazer presentes e sobre os quais não foram encontradas informações. Na tentativa de isolar o produto reduzido para posterior uso na comparação de resultados, optou-se pela sua síntese. Para isto foi realizada experiência a fim de obtê-lo a partir do metronidazol usando a reação de redução com zinco em escala preparativa. Apesar dos esforços, os resultados foram desfavoráveis porque não se conseguiu a extração do referido composto nas condições empregadas.

Mesmo com as dificuldades já citadas anteriormente, desenvolveu-se o ensaio para obtenção do espectro de absorção do metronidazol, visando a confirmação do comprimento de onda para leitura e que é apresentado na figura 9. Enquanto o trabalho original determinou 550 nm, os experimentos revelaram como máxima absorção 530 nm. Pode-se admitir que a diferença tenha ocorrido em razão das condições experimentais distintas, como também pela indefinição da reação com a formação provável de outras substâncias de estruturas desconhecidas.

Observando-se a figura 9 percebe-se que o espectro de absorção apresenta um patamar largo estendendo-se de ± 500 a 550 nm. Como no trabalho de SETHI⁷⁸ não há registro do espectro de absorção não se sabendo portanto como o autor estabeleceu 550 nm como comprimento de onda, fica inviável o confronto daqueles resultados com os obtidos no

presente trabalho. Entretanto, o espectro de absorção apresentado na figura 9 não deixa dúvida quanto ao ponto de máxima absorção em 530 nm, que é o ponto intermediário do patamar.

A curva de Ringbom e a reta de calibração não estão plenamente satisfatórias, particularmente a reta uma vez que a inclinação apresentou um coeficiente linear significativo mesmo tendo pequeno valor absoluto. Mesmo assim, o método foi aplicado pois considerou-se que na prática a comparação da amostra com o padrão é feita com soluções de concentração teoricamente iguais. Consequentemente as absorbâncias ficariam bem próximas reduzindo assim o erro na medida experimental.

A aplicação do método na amostra padronizada de comprimidos que revelou um resultado médio de 223,46 mg de MTD correspondendo a 89,38%, desvio padrão de 8,04 e coeficiente de variação igual a 3,6%, impediu qualquer tentativa de determinação de metronidazol nas amostras comerciais de comprimidos e suspensão.

Como o objetivo do presente trabalho não era experimentar todos os métodos colorimétricos e sabendo-se que estes, após a reação de redução do nitro grupo, apresentavam dificuldades operacionais como necessidade de aquecimento, tempo de reação, instabilidade do produto colorido, reagentes não muito comuns, e tendo como contrapartida um método que requer instrumental e reagentes simples e baseia-se na eficiente reação de Bratton-Marshall com perspectivas de sucesso, a escolha pelo método colorimétrico de SETHI⁷⁸ foi natural. Infelizmente os resultados indicaram que o desempenho está vinculado muito mais à reação de redução do que a estes fatores citados acima.

Os resultados encontrados no presente trabalho na obtenção do espectro de absorção em função do pH foram concordantes com aqueles determinados por FABAYO e colaboradores²⁵, isto é, em pH igual a

1 o ponto máximo de absorção para o metronidazol foi de 277 nm permitindo estabilidade e simetria ao espectro. A USP XXIII⁸⁷ recomenda para a identificação do nitroimidazol em comprimidos, a leitura de uma solução contendo o fármaco preparada em ácido clorídrico 0,1N com a determinação da absorbância a 278 nm.

Conforme a expectativa, os resultados da curva de Ringbom que é apresentada na figura 13 foram satisfatórios, assim como a reta de calibração obtida e demonstrada na figura 14. Neste caso os valores podem ser explicados pelo fato de não haver reação química, revelando estabilidade do composto.

Na aplicação do método às 8 amostras de comprimidos, os resultados podem ser considerados aceitos pois a precisão correspondeu em todos os casos, ficando para duas amostras valores mais próximos do limite de 90%.

Como o teste de recuperação do padrão revelou para todos os casos cerca de 98% de teor de metronidazol recuperado, pode-se afirmar que os valores obtidos nas análises anteriores são verdadeiros. A linearidade apresentou resultados que confirmam o bom desempenho do método.

Em se tratando de benzoilmetronidazol, o comportamento frente a experiência do espectro de absorção foi idêntico ao do metronidazol na faixa de pH entre 1 a 6. O pico de máxima absorção é determinado igualmente em 277 nm e pH 1 para solução padrão. A curva de Ringbom demonstrada na figura 18 mostrou-se satisfatória, porém a reta de calibração apresentou coeficiente linear estatisticamente significativo comprometendo a exatidão dos resultados.

Entretanto na aplicação do método espectrofotométrico no UV em 6 amostras comerciais de suspensões, os resultados tanto para exatidão como precisão foram aceitáveis. Contudo, o teste de recuperação do padrão e a linearidade não puderam ser avaliados criticamente porque os valores encontrados não foram uniformes e constantes. Estas variações só podem ser explicadas porque nos referidos testes ocorreu acentuada mudança na operação analítica, uma vez que a tomada de ensaio foi reduzida à metade implicando em maior risco de erro, principalmente por se tratar de amostra de suspensão.

O fato da análise das suspensões pelo método espectrofotométrico no UV não poder ser avaliada de maneira mais completa considerando a falta de resultados dos teste de recuperação e linearidade, não significa a impossibilidade de sua aplicação para outras amostras. Esta afirmação baseada no fato de que de um lado tem-se os bons resultados da análise quantitativa das amostras, e de outro a argumentação apresentada por SANYAL73 de que os conservantes, suspensores, corantes, adoçantes, flavorizantes, compostos fenólicos como metil e propilparabenos nas concentrações usuais, não interferem na determinação do benzoilmetronidazol.

Dentre os trabalhos publicados que empregam a espectrofotometria no visível, destacou-se o método proposto por SASTRY e colaboradores⁷⁴ onde sugeriram a análise do metronidazol, tinidazol e piperazina por complexação com nitroprussiato de sódio na presença de cloreto de hidroxilamônia.

A reação de complexação pode ser explicada em primeiro lugar pela decomposição do nitroprussiato de sódio $(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO})^{-2}$ pelo cloreto de hidroxilamônia originando o composto $(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O})^{-2}$. Como segunda etapa, os fármacos mencionados reagiriam com este produto formando um complexo colorido que pode ser representado pelo $(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{X})^{-2}$.

A leitura preliminar do método ofereceu perspectivas com possibilidade de êxito na aplicação às amostras de medicamentos contendo o MTD. Alguns aspectos chamaram a atenção como a simplicidade das operações analíticas, rapidez na execução, conhecimento das reações de complexação, produto colorido estável por duas horas e ponto máximo de absorção determinado a 660 nm. Esta característica representou ponto importante na escolha do método para estudo, uma vez que é muito raro na análise espectrofotométrica de fármacos um que apresente tal comprimento de onda conferindo seletividade ao método.

Os bons indícios no entanto, não foram confirmados ao se experimentar o método nas condições indicadas pelos autores. A necessidade de preparação diária dos reagentes contrariou a afirmação de simplicidade, do método. Os espectros de absorção obtidos em função da concentração além de não apresentarem proporcionalidade adequada, revelaram um ponto de máxima absorção igual a 560 nm muito diferente daquele descrito no trabalho original. Quando da realização da experiência para determinação de curva de Ringbom, os resultados traduziram-se na insistente instabilidade do produto formado em função do tempo com mudança de coloração. Ao contrário, o ensaio para a determinação da reta de calibração forneceu resultados satisfatórios que podem ser vistos na figura 22. Entretanto, para segura conclusão sobre o desempenho do método, esta experiência foi realizada em dias diferentes e os valores mostraram-se novamente distintos, fazendo crer que a reação de complexação era dependente de algum fator ou variável não identificados nas condições experimentais descritas por SASTRY e colaboradores⁷⁴.

Nas observações sobre os atributos dos métodos analíticos estudados, a exatidão, precisão e linearidade foram considerados em todos os casos e nem poderia ser diferente uma vez que eles são os mais

importantes em qualquer programa de validação. Os dados pertinentes a cada processo permitem uma análise crítica dos resultados, podendo se comparar o desempenho entre eles possibilitando a escolha de um método mais adequado para futura aplicação numa amostra específica.

O planejamento deste trabalho preocupou-se em avaliar melhor estes três atributos. Das alternativas que poderiam ser empregadas para determinar exatidão e precisão, optou-se por trabalhar em cada método com a amostra padronizada de medicamento e seu respectivo placebo. Os ensaios foram executados, submetendo também as amostras padronizada e comerciais ao teste de recuperação do padrão. Esta alternativa forneceu um volume de dados satisfatórios para o objetivo desta pesquisa.

Em relação à linearidade, o usual é determiná-la usando-se o placebo da amostra padronizada ao qual são acrescentados três níveis de concentração do fármaco próximos ao teor declarado, englobando também o limite de aceitação. Entretanto, conforme recomendação de PASTEELNICK⁵⁹, foi adotado um intervalo mais amplo para melhor observação da proporcionalidade das respostas analíticas.

É evidente que os outros atributos não podem ser desconsiderados. Em relação a seletividade ou especificidade não se pode enaltecer o método titulométrico com o ácido perclórico na análise do metronidazol, um vez que o ácido reage com qualquer base nitrogenada. Embora o método espectrofotométrico no UV tenha melhores características de seletividade em relação ao método citado acima, ainda apresenta limitações porque muitos fármacos absorvem também na região de 277 nm, além de que pode haver interferência por parte dos excipientes, seja dos comprimidos ou das suspensões²⁴. Portanto, a aplicação deste método exigirá sempre atenção quanto ao tratamento adequado de amostras a serem analisadas.

O método colorimétrico com tratamento do nitro grupo, seja por hidrólise ou redução, confere razoável seletividade pois são poucas as substâncias do arsenal terapêutico que apresentam propriedades idênticas e que poderiam interferir na determinação espectrofotométrica. O método colorimétrico baseado na hidrólise alcalina pode servir como indicador de estabilidade, bastando para isto executar ensaios com e sem hidrólise.

Os atributos limites de detecção e quantificação devem ser importantes naqueles casos em que os medicamentos são utilizados em doses terapêuticas muito pequenas. No presente trabalho, este problema não existiu porque o metronidazol é utilizado terapeuticamente em doses iguais a 250,0 mg e 400,0 mg permitindo tomadas de ensaio compatíveis com a exigência dos métodos analíticos, sejam volumétricos ou espectrofotométricos.

O estudo da reprodutibilidade envolve todos os aspectos e fatores que podem interferir nos resultados da metodologia analítica. As conclusões exprimem a robustez do método. Esta avaliação é feita com maior profundidade nas instituições oficiais encarregadas de normas em controle de qualidade de medicamentos. A parte operacional é desenvolvida com ajuda de vários laboratórios nos chamados Estudos Colaborativos com intensa avaliação estatística. Nas indústrias e nos órgãos de pesquisa acadêmica o estudo da reprodutibilidade tem objetivos mais imediatos. Na presente pesquisa, não se pretendeu abordar tal atributo numa amplitude incompatível com as condições de trabalho existentes, e sim contribuir com a avaliação de alguns aspectos da validação de métodos analíticos selecionados para determinação do metronidazol. Desta maneira, a análise crítica dos resultados experimentais poderá servir como indicador para futuros trabalhos nesta área.

8 - CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, pode-se concluir:

- 1) a titulação do metronidazol com ácido perclórico forneceu resultados satisfatórios somente para a amostra padronizada de comprimidos, enquanto que para as amostras comerciais de comprimidos a exatidão e precisão comprometem a aceitação dos resultados na maioria dos casos;
- 2) no método espectrofotométrico com prévia hidrólise do metronidazol com hidróxido de sódio 2N seguida da reação de Bratton-Marshall, o aquecimento em banho maria mostrou-se mais eficiente do que o tratamento em ampolas fechadas a $100^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- 3) a aplicação do método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall em comprimidos apresentou bons resultados para todas as amostras com exceção de uma, confirmados pela exatidão, precisão, linearidade e teste de recuperação. Para as suspensões, o método mostrou-se totalmente inadequado;
- 4) método espectrofotométrico com redução do nitro grupo seguida da reação de Bratton-Marshall mostrou-se inadequado para análise da amostra padronizada de comprimidos o que vem justificar a decisão de não experimentá-lo nas demais amostras. A grande variabilidade dos resultados foi devida a instabilidade da reação de redução;

- 5) os resultados da aplicação do método espectrofotométrico no UV não foram satisfatórios para duas amostras de comprimidos no que se refere à exatidão, mas plenamente aceitos para as outras amostras em relação aos atributos precisão, linearidade e teste de recuperação comprovando que os valores anteriormente encontrados são verdadeiros;
- 6) mesmo considerando os resultados desfavoráveis obtidos na linearidade e teste de recuperação quando da análise de suspensões pelo método espectrofotométrico no UV, os valores da exatidão e precisão que foram satisfatórios, indicam a possibilidade de aplicação do método;
- 7) o método espectrofotométrico com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia além de apresentar comportamento discordante do trabalho original, apresentou resultados que não permitem indicá-lo para a determinação de metronidazol, a menos que novos estudos venham permitir melhor avaliação;
- 8) considerando os principais atributos exigidos num programa de validação de métodos analíticos, os resultados obtidos apontam a espectrofotometria no UV e método espectrofotométrico com hidrólise alcalina seguida da reação de Bratton-Marshall como os mais eficientes para análise de comprimidos de metronidazol.

RESUMO

Considerando a ampla e diversificada aplicação terapêutica do metronidazol aliada ao grande número de medicamentos e a extensa metodologia analítica descrita, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar alguns métodos analíticos baseados nos princípios da validação e que pudessem ser usados por diferentes laboratórios de controle de qualidade. Foram estudados métodos espectrofotométricos no UV e no visível com hidrólise alcalina e redução do nitro grupo seguidas da reação de Bratton-Marshall, e com nitroprussiato de sódio e cloreto de hidroxilamônia visando a determinação de metronidazol e benzoilmetronidazol presentes em comprimidos e suspensões, respectivamente. Os parâmetros analíticos dos métodos foram avaliados e estabelecidas as condições experimentais adequadas, os mesmos foram aplicados às amostras de medicamentos. Para cada metodologia foram estudados a exatidão e precisão com as devidas considerações estatísticas. A linearidade foi avaliada em vários níveis de concentração e observada graficamente. O método espectrofotométrico no UV demonstrou ser adequado para análise de comprimidos e suspensões, enquanto o método espectrofotométrico com hidrólise alcalina e reação de Bratton-Marshall foi eficiente para comprimidos. O método titulométrico com ácido perclórico não demonstrou resultados satisfatórios para amostras comerciais de comprimidos. Os demais métodos estudados apresentaram valores que não satisfazem os critérios de aceitação.

SUMMARY

Considering the ample and diversified therapeutic application of metronidazole allied at the great number of pharmaceutical preparations and the extensive analytic methodology described, the main target of this work was to evaluate some analytic methods taking in consideration the validation principles which could be used by difference laboratories of quality control. It was been studied spectrophotometric methods on UV and on visible with alkaline hydrolysis and reduction of nitro group followed by the Bratton-Marshall reaction, and with sodium nitroprusside and hidroxyl ammonium chloride in order to determinate of metronidazole and benzoyl metronidazole which are presents in tablets and suspension, respectively. The analytic parameters of the methods were been evaluated and the adequate experimental conditions were established, and the same were been applied to the pharmaceutical dosage forms. To each methodology were been studied the accuracy and precision with the due statistic considerations. The linearity was evaluated in several levels of concentration and graphically observed. The spectrophotometric method on UV showed be adequate for the analysis of tablets and suspension, while the spectrophotometric method with alkaline hydrolysis and Bratton-Marshall reaction was efficient for tablets. The non-aqueous titration with perchloric acid did not demonstrate satisfactory results for commercial samples of tablets. The other methods studied showed values, which does not satisfy the normal criterion of acceptance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADAMOVICS, J. Rapid determination of metronidazole in human serum and urine using a normal-phase HPLC column with aqueous solvents. J. Chromatogr., Amsterdam, v. 309, p. 436-440, 1984.
2. AKPINAR, M., GÜNDEN GÖGER, N., ORBEY, M.T. Quantitative analysis of ketoconazole and metronidazole containing drugs by spectrophotometry. J. Fac. Pharm., Ankara, v. 10, n.2, p.183-187, 1993.
3. AXON, A. T. R. Helicobacter pylori therapy : Effect on peptic ulcer disease. J. Gastroentrol. Hepatol., Melbourne, v. 6, p. 131-137,1991.
4. BARBEZAT, G. O. Treatment of Helicobacter pylori : who does what and to whom. New Ethicals, v.32, p. 11-12, 1995. Apud : Int. Pharm. Abst., Bethesda, v.33, n.3, 1996, 3301456.
5. BHATIA, S. C., SHANDBHAG, V. D. Electron-capture gas chromatographic assays of 5-nitroimidazole class of antimicrobials in blood. J. Chromatogr., Amsterdam, v.305, p. 325-334, 1984.
6. BHATKAR, R. G., CHODANKAR, S. K. Determination of metronidazole. Indian J. Pharm. Sci., Bombay, v. 42, p. 127-129, 1980.
7. BELLIVEAU, P. P. Stability of cefotaxime sodium and metronidazole in 0,9% NaCl injection or in ready-to-use metronidazole bags. Am. J. Health Syst. Pharm. Bethesda, v.52, p. 1561-1562, 1995.

* De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas e local de publicação dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX, Columbus, 1994

8. BRATTON, A. C., MARSHALL, E. K. A new coupling for sulfanilamide determination. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 128, p. 537-550, 1939.
9. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 1980. v.1. 294p.
10. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 1988. v.1. 374p.
11. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office. 1993. v.2. p.1011-1012.
12. BROOKS, M. A., D'ARCONTE, L., SILVA, J. A. F. Determination of nitroimidazoles in biological fluids by differential pulse polarography. J. Pharm. Sci. Washington, v. 65, p.112-114, 1976.
13. CARTWRIGHT, A. C., MATTHEWS, B. R. International pharmaceutical product registration : aspects of quality, safety and efficacy. New York : Ellis Horwood, 1994. p.247-285.
14. CHATTERJEE, P. K., JAIN, C. L., SETHI, P. D. Differential spectrophotometric analysis of diloxanide furoate and metronidazole in formulations. Indian Drugs. Bombay, v. 23, n.2, p.112-115,1985.
15. CHATTERJEE, P. K., JAIN, C. L., SETHI, P. D. Simultaneous spectrophotometric determination of metronidazole and furazolidone in pharmaceutical formulations. Indian J. Pharm. Sci. Bombay, v.48, n. 1, p.25-27, 1986.

16. CHATTERJEE, P. K., JAIN, C. L., SETHI, P. D. Simultaneous spectrophotometric estimation of di-iodohydroxyquinoline and metronidazole or their analogous derivatives in combined dosage forms. Indian J. Pharm. Sci. Bombay, v. 48, p.195-197, 1986.
17. CLARKE, E. G. C. Isolation and identification of drugs. London : Pharmaceutical Press, 1978. p. 429.
18. COELHO, L. G. V., PASSOS, M. C. F., CHAUSSON, Y., COSTA, E. L., MAIA, A. F., BRANDÃO, M. J. C. C., RODRIGUES, D. C., CASTRO, L. P. Duodenal ulcer and eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. Scand. J. Gastroenterol. Oslo, v. 27, p.362-366, 1992.
19. DAS, T., DAS, C., RAY, S. Simultaneous spectrophotometric determination of metronidazol and furazolidone in combined pharmaceutical dosage forms. Indian J. Pharm. Sci. Bombay, v.54, p.111-113, 1992.
20. DEVANI, M. B., SHISHOO, C. J., DOSHI, K., SHAH, A. K. A rapid method of analysis of metronidazole and tinidazole in tablets. Indian J. Pharm. Sci. Bombay, v. 43, p.151-152, 1981.
21. DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. 25. ed. São Paulo : Publicações Científicas, 1996.
22. DOLLERY, C. S., ed. Therapeutic drugs. London: Churchill Livingstone, 1991. p. 170-175.
23. DUX, J. P. Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory. New York : Van Nostrand Reinhold, 1990. p.59-77.

24. EBOKA, C. J., ADESANYA, K. I. Spectrophotometric assay of drugs in the presence of spectral interferants in suspensions and syrups. Int. J. Pharm. Amsterdam, v.51, p. 263-267, 1989.
25. FABAYO, A. B., GRUDZINSKI, S. K. Quantitative determination of metronidazole in tablets by UV- absorption spectrophotometric. Acta Polon.Pharm. Warsaw, v.42, n.1, p. 49-54, 1985.
26. FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu 1996. v. 1, p.48-48/1.
27. GALAL, S. M., BEDAIR, M. M., EL-SAYED, M. A. Derivative spectrophotometric determination of protozoal drugs in two-component tablet preparation. J. Pharm. Belg. Brussels, v. 46, n. 5, p.315-319, 1991.
28. GANDHI, T. P., PATEL, P. R., PATEL, V. C., PATEL, S. K., GILBERT, R. N. Colorimetric determination of metronidazole in bulk and dosage forms. J. Inst. Chemi., Calcuta, v.56, n.3 , p.127-128, 1984.
29. GARFIELD, F. M. Quality assurance principles for analytical laboratories. Arlington : Association of Official Analytical Chemistry International, 1994. p.74-81.
30. GARRAT, D. C. The quantitative analysis of drugs. 3 ed. London : Chapman & Hall, 1964. p. 700-715.
31. GIROUD, J. P., MATHÉ, G., MEYNIEL, G. Pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique. Paris : Expansion Scientifique, 1978. p. 1137-1139.

32. GUPTA, V. D. Quantitation of metronidazole in pharmaceutical dosage forms using high-performance liquid chromatography. J. Pharm Sci., Washington, v.73, n. 9, p.1331-1333, 1984.
33. GYENES, I. C. Titration in non-aqueous media. London : Iliffe Books , 1967. p.351-373.
34. HACKETT, L. P., DUSCI, L. J. Determination of metronidazole and tinidazole in human plasma using HPLC. J. Chromatogr., Amsterdam, v. 175, p.347-349, 1979.
35. HARRIS, A. W., MISIEWICZ, J. .J. Eradication of *Helicobacter pylori* . Baillers Clin. Gastroenterol. v.9, n.3, p. 583-613, 1995.
36. HASSAN, S. M., SHARAF EL-DIN, M., BELAL, F., SULTAN, M. Application of difference spectroscopy to the determination of some pharmaceutically important nitro compounds. J. Pharm.Pharmacol., London, v.40, p. 798-800, 1988.
37. HIRSCHL, A. M., HIRSCHIL, M. M., ROTTER, M. Comparison of three methods for the determination of the sensitivity of *Helicobacter pylori* to metronidazole. J. Antimicrob. Chemother., London, v.32, p.45-49, 1993.
38. INAMDAR, M. C., MODY,S. Estimation of metronidazole. Indian J. Pharmac. Thana, v.39, n.5, p.106-108, 1977.
39. INDEX nominum : international drug directory ed. by Swiss Pharmaceutical Society. 16. ed. Stuttgart : Medpharm Scientific, 1995. p.798.

40. JENSEN, C. J., GUGLER, R. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and metabolites. J. Chromatogr. , Amsterdam, v.277, p.381-384, 1983.
41. JOKIPII, L., JOKIPII, A. M. M. Nitroimidazole treatment of giardiasis. In : MEYER, E. A., ed. Human parasitic diseases. Amsterdam: Elsevier, 1990. cap. 18, p. 315-323.
42. KAMALAPURKAR, O. S., PRIOLKAR, S. R. S. Estimation of metronidazole and its dosage forms. Indian Drugs. Bombay, v. 20, n.9, p.391-392, 1983.
43. KATELARIIS, P., GLUPCZINSKI, Y., BURETTE, A., RAVIELIN, N. H., KOSUNEN, T. U., SEPPÄLÄ, K., BELL, G. D., POWELL, K. Eradicating *Helicobacter pylori*. Lancet , London, v.339, n.4, p.54-55, 1992.
44. KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica . Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1988. p. 94-95; 510-513.
45. KOROLKOVAS, A. Análise farmacêutica. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1984. p. 118-131.
46. KUCHARSKY, R. N. J., SAFARIK, L. Titration in non-aqueous solvents. Amsterdam: Elsevier, 1965. p.144-167.
47. LANBECK, K., LINDSTROM, B. Determination of metronidazole e tinidazole in plasma and feces by HPLC . J. Chromatogr., Amsterdam, v.162, p.117-121, 1979.
48. LAU, E. P. K., YAO, C., LEWIS, M., SENKOWSK, B.Z. Colorimetric determination of some N-1 substituted nitroimidazoles. J. Pharm. Sci. Washington, v.58,n. 1, p. 55-57, 1969.

-
49. LESPAGNOL, A. Précis de pharmacie chimique usuelle a l'usage des pharmaciens et etudiants en pharmacie . Paris : Technique e Documentation, 1977. p. 33-34.
50. MARQUES, A. R., STAFFORD ,B., FLYNN, N., SADÉE, W. Determination of metronidazole and misonidazole and their metabolites in plasma and urine by HPLC. J. Chromatogr., Amsterdam, v.146, p.163-166, 1978.
51. MARTIN, N. F., ROBINSON, H. N. Topical treatment of blefaritis. PCT Int. Appl. WO 92 03133, mar 1992. Apud : Chem. Abstr. Columbus, v.116, abstr. n. 207820 b, 1992.
52. MARTINDALE the extra pharmacopeia. 23. ed. London : Pharmaceutical Press, 1993. 516-521p.
53. McNULTY, C. A. M., DENT, J., WISE, R. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pyloridis* to 11 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. Washington, v.28, n.6, p.837-838, 1985.
54. MINGÓIA, Q. Química farmacêutica . São Paulo : Melhoramentos, 1967. p. 645-649.
55. MORRISON, R. T., BOYD, R. N. Química orgânica . Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. p.916-929.
56. MOUSSA, B. A. Colorimetric determination of parasiticide hycanthone and metronidazole. Int. J. Pharm. , Amsterdam, v.10, p. 199-207, 1982.

57. PARIMOO, P. Quantitative determination of metronidazole by oxidation reduction method . Indian J. Pharm. Sci. Bombay, v.48, nov/dec, p. 186-187, 1986.
58. PARIMOO, P., UMAPATHI, P., RAVIKUMAR, N., RAJASEHAR, S. Determination of metronidazole and di-iodohidroxyquiniline in pharmaceutical preparations by quantitative thin layer chromatography. Indian Drugs., Bombay, v. 29, p.228-230, 1992.
59. PASTEELNICK, L. A. Analytical methods validation. In : BERRY, I. R.; NASH, R. A., eds. Pharmaceutical process validation . New York : Marcel Dekker, 1993. cap. 13, p.411-428
60. PATCHETT, S., BEATTIE, S., LEEN, C., KEANE, C., O'MORAIN, C. Eradicating *Helicobacter pylori* and symptoms of non-ulcer dyspepsia. Br. Med. J., London, v. 303, p.1238-1240, 1991.
61. PEDRAZZOLI, V., KILIAN, M., KARRING, G.T. Comparative clinical and microbiological effectes of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. J. Clin. Periodontol. Copenhagen, v.19, p.715-722, 1992.
62. PESSOA, S. B., MARTINS, A. V. Parasitologia médica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 49-56, 201-206, 228-229.
63. POPULAIRE, P., DECOUVELAERE, B., LEBRETON, G., PASCAL, S. Dosage colorimétrique de 1(hydroxy-2ethyl)-1méthyl-2nitro-5imidazole. Ann. Pharm. Fr., Paris, v.26, p.549-556, 1968.
64. RAVDIN, J. I. Amebíase. In : WYNGARDEN, J. B., SMITH, L.H., BENNETT, J. C. Tratado de medicina interna . 19. ed. Rio de Janeiro : Guanabra Koogan, 1993. cap. 22, p.2036-2038.

65. REIMUND, K. P., LORENZ, W., CELIK, I., BAUHOFER, A., GREGER, B., SEITZ, R., ROTHMUND, M. Management of leucopenic sepsis. Lancet. London, v. 346, n. 8971, p. 382-383, 1995.
66. REMINGTON'S Pharmaceutical sciences. 18. ed. Easton : Mack, 1990. p.1230-1231.
67. ROGGERO, E., ZUCCA, E., PINOTTI, E., PASCARELLA, A., CAVALLI, F. Eradication of *Helicobacter pylori* infection in primary low-grade gastric lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. Ann. Intern. Med. Philadelphia, v. 122, p. 767-769, 1995.
68. RÓNA, K., GALCHÁLYI, B. Simple liquid chromatographic method for the determination of ornidazole and metronidazole in human serum. J. Chromatogr., Amsterdam, v. 420, p.228-230, 1987.
69. RUDOLPH, J. S. Validation of solid dosage forms. In : BERRY, I. R., NASH, R. A., eds. Pharmaceutical process validation. New York : Marcel Dekker, 1993. cap.5, p.167-188.
70. RYAN, M. A clinical role for pharmacists in the management of *Clostridium difficile* induced colitis. Ir. Pharm. J., Dublin, v. 73, p.215-217, 1995.
71. SANGHAVI, N. M., CHANDRAMOHAN, H. S. Methods of estimation of metronidazole. Indian J. Pharm., Bombay, v.36, n.6, p. 151-152, 1974.
72. SANYAL, A. K. Rapid and selective method for quantitation of metronidazole in pharmaceuticals. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, v.71, p.849-851, 1988.

73. SANYAL, A. K. Rapid ultraviolet spectrophotometric assay of benzoilmetronidazole in an oral suspension. Analyst, London, v.117, p.93-95, 1992.
74. SASTRY, C. S. P., ARUNA, M., VIJAYA, D. Spectrophotometric determination of some antihelmintics and antiamebic agents. Indian J. Pharm. Sci. Bombay, v. 49, n.5, p.190-192, 1987.
75. SASTRY, C. S. P., ARUNA, M., MOHANA RAO, A. R. M. Spectrophotometric determination of some antiamebic and antihelmintic drugs with metol and chromiun (VI). Talanta, London, v.35, n. 1, p. 23-26, 1988.
76. SASTRY, C. S. P., ARUNA, M. Spectrophotometric determination of some antihelmintic and antiamebic agents with 3-methyl-2-benzothiazolidone hydrazone hydrochloride. Pharmazie, Berlin, v.43, n. 5, p.361, 1988.
77. SASTRY, C. S. P., ARUNA, M., MOHANA RAO, A. R., TIPIRNENI, A. S. R. P. Application of p-N,N-dimethylphenylenediamine dihydrochloride for determination of some antiamebic and antihelmintic drugs. Chem. Anal., Warsaw, v.36, n.1, p.153-158, 1991.
78. SETHI, P. D. Quantitative analysis of drugs in pharmaceutical formulations. 2. ed. New Delhi : Satish Kumar Jain, 1993. p. 186-188.
79. SRIDEVI, S., BABU, R. J., MITTAL, N., KUMAR, D. S., PANDIT, J. Development and evolution of acrylic strips of metronidazole for the therapy of periodontal disease. Pharmazie, Berlin, v. 50, p. 153-154, 1995.

-
80. STEVENS, D. L., MAIER, K. A., LAINE, B. M., MITTEN, J. E. Comparison of clindamycin, rifampin, tetracycline, metronidazole and penicilin for efficacy in prevention of experimental gas gangrene due to *Clostridium perfringens*. J. Infec. Dis., Chicago, v. 115, n.2, p.220-228, 1987.
81. TALWAR, S. K., SHARMA, S. C., DAS, S. Simultaneous spectrophotometric determination of diloxanide furoate and metronidazol in dosage forms. J. Pharm. Biomed. Anal. Oxford, v.4, n.4, p.511-515, 1986.
82. TEIXEIRA, R. Amebicidas. Tricomonicidas. Giardicidas. Tripanomicidas. Leishmanicidas. In : SILVA, P. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1994. cap.120, p.1198-1202.
83. TRISSEL, L. A. Handbook on inietable drugs. 5. ed. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, 1988. n.p.
84. TUCKERMAN, M. M., BICAN-FISTER, T. Analysis of metronidazole. J. Pharm. Sci., Washington, v.58, n.11, p.1401-1403, 1969.
85. UNITED States pharmacopeia. 20. ed. Rockville U.S. : Pharmacopeial Convention, 1980. p.530-531.
86. UNITED States pharmacopeia. 22. ed. Rockville U.S. : Pharmacopeial Convention, 1990. p.890-892.
87. UNITED States pharmacopeia. 23. ed. Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention, 1994. p.1019-1021, 1982-1984.
88. VENKATESHAWARAN, T. G., STEWART, J.T. Determination of metronidazole in vaginal tissue by HPLC using solid-phase extration. J. Chromatogr. B. Amsterdam, v. 672, p.300-304. 1995.

-
89. WALSH, J. H., PETERSON, W.L. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. N. Engl. J. Med. Boston, v.333, p.984-991, 1995.
90. WANG, J. Metronidazole and micostatin containing dentrificies for halitosis control. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu , CN 1,044,901, 1990. Apud : Chem. Abstr., Columbus, v.115, abstr. n. 286970 f, 1991.
91. WEARLY, L. L., ANTHONY, G.D. Metronidazole. Anal. Profiles Drugs Subst. New York, v.5, p. 329-344,1976.
92. WEBSTER, L. T. Drugs for amebiasis, giardiasis and trichomoniasis. In : GOODMAN, L.S., GILMAN, A. The pharmacological basis of therapeutics. 8. ed. New York : Pergamon Press, 1990. cap. 42. p.999-1007.
93. WOOLARD, G. A. Effect of precipitating agents on the analysis of metronidazole by HPLC. J. Chromat., Amsterdam, v.303, p.222-224, 1984.
94. XINQUAN, Y., TUN, L., XIUFANG, Q. Manufacture of stick tape pharmaceutical dosage forms for topical application. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu , CN 1,051,502, may, 1991. Apud : Chem. Abstr. Columbus, v.115, abstr. n. 239788 t, 1991.