

**Análise químico-farmacêutica e avaliação da estabilidade de
pimobendana em diferentes formas farmacêuticas.**

Austeclinio Vicente Ferrera de Macedo Moraes

Campo Grande – MS
2025

A Análise químico-farmacêutica e avaliação da estabilidade de pimobendana em diferentes formas farmacêuticas.

Austeclinio Vicente Ferrera de Macedo Moraes

Dissertação apresentada ao Programa Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Nájla Mohamad Kassab

Campo Grande – MS
2025

AUSTECINIO VICENTE FERREIRA DE MACEDO MORAES

Análise químico-farmacêutica e avaliação da estabilidade de pimobendana em diferentes formas farmacêuticas.

Dissertação apresentada ao Programa Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nájla Mohamad Kassab – Presidente
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Profa. Dra. Helen Cassia Rosseto – Membro Titular
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira - Membro Titular
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
2025

De Macedo Moraes, Austeclinio Vicente Ferreira

Análise químico-farmacêutico e avaliação da estabilidade de pimobendana em formas farmacêuticas diversas.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2025.

Orientadora: Professora Dra. Nájla Mohamad Kassab

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar o dom da inteligência, da paciência e da perseverança. Agradeço também a minha mãezinha do céu, Nossa Senhora, que sempre está para mim onde eu precisar e a qualquer momento.

A Irmã Dulce, hoje conhecida como Santa Dulce dos pobres, que com a sua história de amor ao próximo.

A minha mãe, Tania Ferreira de Macedo, que com todo seu amor, carinho e dedicação esteve comigo desde dia que eu nasci e até o dia de hoje, sempre com um colo para me socorrer quando algo no laboratório dava errado e sempre pronto a oferecer boas intenções a Nossa Senhora.

Ao meu amor, Lucas Ferreira Jeronymo, que nos momentos de incertezas e dificuldades esteve ao meu lado me dando todo apoio e servindo de pilar para o dia a dia, um muito obrigado. Te amo vidinha.

À minha orientadora, Dra. Nájla Mohamad Kassab, que acreditou em mim e fez a loucura de me aceitar como aluno e me orientou sempre com palavras de carinho e muito afeto e me trouxe de volta ao mundo das ciências e me mostrou que é possível sim fazer um mestrado/doutorado com qualidade e sem stress.

Aos meus amigos que o mestrado me trouxe, Vitoria de Almeida, Luis Fernando Pereira, Maria Beatriz, Danielle Freire, Nathalia Rickyane, Júlio Abreu Miranda e Everton Nascimento Alencar. Não sei como agradecer o carinho de sempre e só digo que eu não teria chegado até aqui sem vocês.

Agradeço também a todos os técnicos que estão no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica todo dia sempre com uma disposição em ajudar, Layna Tayná, Camila Sorio e Luis Fernando Pereira.

Expresso minha sincera gratidão à banca avaliadora pela valiosa dedicação e contribuição. Agradeço, em especial, por aceitarem o convite e por enriquecerem de forma tão significativa o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a empresa Copervet pelo apoio financeiro e estrutural concedido, o qual foi fundamental para a realização e o desenvolvimento desta dissertação.

A todos vocês, meu mais sincero e emocionado agradecimento. Este trabalho carrega um pedacinho de cada um.

RESUMO

A pimobendana (PMB) é utilizada para o tratamento de primeira escolha para a insuficiência cardíaca associado a outros fármacos, entretanto apresenta características físico-químicas que dificultam a manipulação. O método desenvolvido e validado seguiu as diretrizes da RDC nº 166/2017 (ANVISA), do guia ICH Q2(R1) e do Appendix F da AOAC *International*. O método demonstrou linearidade na faixa de 2,0–14,0 µg/mL ($r > 0,999$), com limites de detecção e quantificação determinados em 0,12 µg/mL e 0,25 µg/mL, respectivamente. A precisão apresentou desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 1,9%, e a exatidão apresentou recuperações entre 98,0–102,0%. Um método espectrofotométrico UV/Vis simples, rápido e econômico foi desenvolvido e validado para a quantificação de PMB em formulações farmacêuticas sólidas (cápsulas) e líquidas (soluções orais anidras). A análise foi conduzida em espectro de ordem zero, empregando solução de HCl 0,1 mol/L como solvente e comprimento de onda de máxima absorção em 329 nm. O método mostrou-se seletivo, robusto frente às variações deliberadas avaliadas e plenamente aplicável à análise de amostras comerciais, apresentando resultados consistentes e concordantes com o teor rotulado. Dessa forma, o procedimento desenvolvido atende aos requisitos regulatórios e se mostra adequado para análises rotineiras em laboratórios de controle de qualidade.

Palavras-chave: Pimobendana, Validação analítica, Espectrofotometria UV/Vis, Controle de qualidade, Formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Pimobendan (PMB) is used as a first-line treatment for heart failure, in combination with other drugs; however, it presents physicochemical characteristics that make its manipulation challenging. The developed and validated method followed the guidelines of RDC No. 166/2017 (ANVISA), the ICH Q2(R1) guideline, and Appendix F of AOAC International. The method demonstrated linearity over the range of 2.0–14.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r > 0.999$), with limits of detection and quantification determined at 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Precision showed a relative standard deviation (RSD) below 1.9%, and accuracy presented recoveries between 98.0–102.0%. A simple, rapid, and cost-effective UV/Vis spectrophotometric method was developed and validated for the quantification of PMB in solid (capsules) and liquid (anhydrous oral solutions) pharmaceutical formulations. The analysis was performed using zero-order spectra, employing 0.1 mol/L HCl solution as the solvent and a maximum absorption wavelength at 329 nm. The method proved to be selective, robust against the evaluated deliberate variations, and fully applicable to the analysis of commercial samples, yielding consistent results in agreement with the labeled content. Therefore, the developed procedure meets regulatory requirements and is suitable for routine analyses in quality control laboratories.

Keywords: Pimobendan, Analytical validation, UV/Vis spectrophotometry, Quality control, Pharmaceutical formulations.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANFARMAG: Associação nacional dos farmacêuticos magistras

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

ATR: Reflectância total atenuada

AST: Aspartato aminotransferase

ALT: Alanina aminotransferase

CDM: cardiopatia dilatada

DMSO: Dimetilsulfóxido

DVMM: Doença valvar mitral mixomatosa

DPR: Desvio padrão relativo

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GGT: Gama-glutamiltransferase

HCl: Ácido clorídrico

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IC: Insuficiência cardíaca

ICC: Insuficiência cardíaca congestiva

ICH: *International Conference on Harmonization*

IECA: Inibidores da enzima conversora de angiotensina

IFA: Insumo farmacológico ativo

IN: Instrução Normativa

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

MAPA: Ministério da agropecuária e abastecimento.

NaOH: Hidróxido de Sódio

ng/L: Nanograma por litro

nm: Nanômetro

ODMP: O-desmetil-Pimobendana

PDE3: Fosfodiesterase do tipo 3

PMB: Pimobendana

PIB: Produto Interno Bruto

RMN: Ressonância magnética nuclear

SQRC: Substância química de referência caracterizada

UV: Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da PMB.....	14
Figura 2. Espectros UV-Vis da PMB.....	28
Figura 3. Espectro FTIR-ATR da PMB.....	29
Figura 4. Espectros de RMN ¹ H da PMB (DMSO-d ₆)	30
Figura 5. Distribuição ácido-base e microespécies da PMB.....	32
Figura 6. Curva analítica representativa da PMB.....	33
Figura 7. Gráfico dos resíduos correspondente à curva analítica.....	34
Figura 8. Espectros UV/Vis da PMB e dos placebos das formulações.....	37
Figura 9. Superfícies de resposta em 3D da absorbância da PMB.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre os ácidos clorídrico utilizado no teste de robustez.....	19
Tabela 2. Solventes e soluções avaliados na seleção do meio de dissolução da PMB.....	22
Tabela 3. Composição dos excipientes presentes nas formulações sólidas contendo PMB.....	23
Tabela 4. Composição dos excipientes presentes nas formulações líquidas contendo PMB.....	23
Tabela 5. Matriz experimental do delineamento fatorial 2 ³ utilizado para a avaliação da robustez do método, conforme planejado no software Design-Expert® 13.....	27
Tabela 6. Principais bandas de absorção observadas no espectro FTIR-ATR da PMB e suas atribuições.....	29
Tabela 7. Principais sinais observados nos espectros de RMN ¹ H da PMB e suas atribuições..	30
Tabela 8. Seleção de solventes para determinação espectrofotométrica da PMB.....	31
Tabela 9. Parâmetros de regressão linear das três curvas analíticas independentes construídas para avaliação da linearidade.....	34
Tabela 10. Resultados de repetibilidade e precisão intermediária para cápsulas e solução oral anidra contendo PMB.....	35
Tabela 11. Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão da forma farmacêutica líquida através do método espectrofotométrico proposto.....	36
Tabela 12. Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão da forma farmacêutica líquida através do método espectrofotométrico proposto.....	36
Tabela 13. Fatores e níveis avaliados no estudo de robustez do método espectrofotométrico para determinação de PMB.....	38
Tabela 14. Resposta aos fatores e níveis avaliados no estudo de robustez do método espectrofotométrico para determinação de PMB.....	38
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) do modelo 2FI para a resposta absorbância na avaliação da robustez.....	40
Tabela 16. Estatísticas de ajuste do modelo de robustez obtido no Design-Expert® 13.....	40
Tabela 17. Coeficientes estimados do modelo 2FI para a resposta absorbância na avaliação da robustez.....	41
Tabela 18. Resultados da análise de diferentes formulações contendo PMB utilizando o método espectrofotométrico proposto.....	42

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. Objetivos	16
2.1 Objetivos gerais:	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. Revisão de literatura	17
3.1 Farmácia de Manipulação Brasileira	17
3.2 Pimobendana e a Insuficiência cardíaca Congestiva	18
3.3 Pimobendana e os métodos cromatográficos	20
4. MateriaL e métodos	22
4.1 Reagentes	22
4.2 Equipamentos	22
4.3 Caracterização da matéria-prima	23
4.3.1 Espectroscopia UV-Vis	23
4.3.2 Espectroscopia FTIR-ATR	23
4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H)	24
4.4 Validação do método espectrofotométrico	24
4.5 Seleção do solvente e determinação do comprimento de onda espectrofotométrico	24
4.6 Preparo das soluções	25
4.6.1 Preparação da Solução estoque para curva de calibração	25
4.6.2 Preparação da solução para Robustez	25
4.6.3 Preparação das soluções para a exatidão	25
4.6.4 Preparação das soluções para seletividade	26
4.6.5 Preparação das soluções para avaliação da precisão	27
4.7 Parâmetros analíticos	27
4.7.1 Linearidade	28
4.7.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	28
4.7.3 Precisão	28
4.7.4 Exatidão	29
4.7.5 Seletividade	29

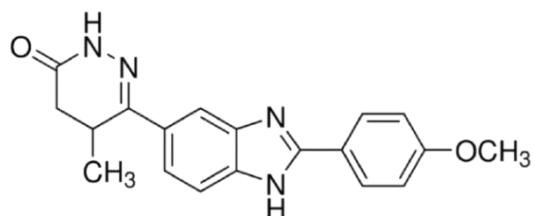
4.7.6 Robustez	30
5.Resultados e discussão	31
5.1 Caracterização da matéria-PRIMA PMB	31
5.1.1 Espectro UV/Vis	31
5.1.2 Espectro FTIR-ATR.....	32
5.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H).....	33
5.2 Seleção do solvente	35
5.3 Determinação do λmax	37
5.4 Linearidade	38
5.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	39
5.6 Precisão.....	40
5.7 Exatidão	41
5.8 Seletividade	42
5.9 Robustez	43
5.10 Aplicabilidade do método.....	48
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

As farmácias de manipulação desempenham papel crescente no cenário farmacêutico brasileiro, refletindo demanda ampliada por terapias individualizadas e necessidade de rigor no controle de qualidade. De acordo com a Associação Nacional dos Farmacêuticos Magistras, o setor apresentou expansão contínua nos últimos anos, reforçando a importância de métodos analíticos simples, rápidos e acessíveis para garantir a qualidade de formulações magistras (ANFARMAG, 2024).

A pimobendana (PMB – Figura 1) é um derivado benzimidazol-piridazinona amplamente utilizado no tratamento da insuficiência cardíaca (IC) em cães, atuando por mecanismo inotrópico positivo associado à vasodilatação mediada pela inibição da fosfodiesterase III. Pelo seu perfil farmacológico favorável, a PMB é considerada um fármaco de primeira escolha em diversas cardiomiopatias, como a doença valvar mitral mixomatosa e a miocardiopatia dilatada (Jericó, 2015; Keene et al., 2019).

Figura 1. Estrutura química da pimobendana (PMB).



Fonte: Elaborada pelo autor no ChemDraw com base em dados de Rekis et al. (2018) e ChemicalBook (2025)

Diversos métodos instrumentais de maior complexidade e de alta sensibilidade estejam descritos para a determinação de PMB, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), tais técnicas demandam infraestrutura sofisticada, maior custo operacional e mão de obra especializada (Dobariya & Multani, 2013; Saenklub et al., 2022). Alternativas modernas como a cromatografia em camada fina de alta performance (HPTLC) também têm sido exploradas, sobretudo para formulações sólidas (Bagul et al., 2024).

No entanto, apesar da elevada precisão desses métodos, sua complexidade limita a implementação rotineira em laboratórios magistras e em estabelecimentos com recursos mais restritos. Nesse contexto, a espectrofotometria UV/Vis apresenta-se como ferramenta analítica estratégica, oferecendo rapidez, baixo custo, simplicidade

operacional e adequada sensibilidade, desde que associada à caracterização apropriada da matéria-prima e a um processo de validação robusto. A adoção de métodos espectrofotométricos validados segundo normas nacionais (ANVISA RDC nº 166/2017) e internacionais (ICH Q2(R1); AOAC, 2017) representa alternativa viável para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

A pesquisa tem como objetivo desenvolver preparações farmacêuticas para uso animal contendo pimobendana, avaliar a estabilidade dessas formulações e validar uma metodologia analítica por UV/Vis para quantificação do fármaco em diferentes preparações. Essa iniciativa é de suma importância, uma vez que preenche uma lacuna significativa na disponibilidade de métodos analíticos e no entendimento da estabilidade e compatibilidade dessas formulações. Dessa forma, contribui para garantir a segurança e eficácia dos tratamentos veterinários que envolvem PMB. Avançar nesse campo é fundamental para atender às necessidades específicas da medicina veterinária e oferecer opções terapêuticas seguras e eficazes para os animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a caracterização físico-química do pimobendana e dos insumos farmacêuticos inertes que serão empregados no desenvolvimento das formulações farmacêuticas de uso animal;
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a quantificação do pimobendana por UV/Vis aplicada às diferentes formas farmacêuticas;
- ✓ Desenvolver preparações farmacêuticas sólidas (cápsulas) e líquidas (xarope/suspensão) para a veiculação do pimobendana baseado na compatibilidade físico-química entre os componentes das formulações;
- ✓ Avaliar amostras comerciais de formulações contendo pimobendana com o método desenvolvido e validado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO BRASILEIRA

O Conselho Federal de Farmácia na resolução nº 753/2023 atualizou as atribuições e regulamentações da atuação do farmacêutico no setor magistral, que segundo a associação de farmacêuticos magistrais (Anfarmag) cresceu 17% entre 2016 e 2023 superando o ritmo o produto interno bruto (PIB) brasileiro que no mesmo período foi de 15%. Outro levantamento importante é que o Brasil possuía aproximadamente 8.700 farmácias com manipulação em 2023 e a expectativa de encerrar o ano de 2025 com mais de 9.800 unidades no país inteiro, com uma distribuição concentrada na região sudeste e sul (70 % de todas as unidades). Todavia o maior crescimento se deu na região Nordeste com um aumento de 47% entre 2019 a 2023 enquanto o sudeste mais saturado só alcançou um aumento de 7,4% no mesmo período de tempo, relativamente distante dos 9,7% do crescimento nacional , demonstrando que ainda existe um mercado a ser explorado na região Nordeste (ANFARMAG,2024).

O setor emprega aproximadamente 65 mil funcionários com a massa salarial de mais de 2 bilhões de reais, um aumento de 23% em relação aos dados anteriores, com um lucro de 11 bilhões de reais no ano de 2023. É importante salientar que o setor magistral é majoritariamente feminino com 78%, enquanto os homens ocupam 22%, nessa população. Observa-se predominância de indivíduos com ensino médio completo, corresponde a 77% do valor total e apenas 15% dos colaboradores tem ensino superior completo incluindo os profissionais com mestrado e doutorado (ANFARMAG,2024).

O regime tributário do setor corresponde em 45% com a arrecadação pelo Simples Nacional e corresponde a 45,7 %, o Lucro Presumido com 16,7% e o Lucro Real em 25,6 % e a soma de arrecadação com aproximadamente 1,5 bilhões de reais em impostos (ANFARMAG,2024).

O setor magistral veterinário também cresceu e isso fica evidenciado quando o setor regulador, representado em sua totalidade pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), se preocupou em regulamentar a produção de medicamentos manipulados para animais com o decreto nº 5.053/2004 e a Instrução Normativa (IN) nº 11/2005. Ambas tratam do regulamento que estabelece a fiscalização dos produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabricam ou comercializam, incluindo as fiscalizações aplicáveis aos estabelecimentos

que manipulam esses produtos, incluindo as boas práticas de manipulação (BRASIL, 2004; BRASIL 2005).

3.2 PIMOBENDANA E A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA

A insuficiência cardíaca congestiva é uma síndrome clínica multifatorial e não pode ser tratada como uma doença isolada. Em cães ela se estabelece devido à doença valvar mitral mixomatosa (DVMM) ou a cardiopatia dilatada (CMD), o principal tratamento é o individualizado, para isso o médico veterinário se apoia nos achados clínicos e o diagnóstico é baseado em exames complementares como o ecocardiograma, eletrocardiograma e a radiografia torácica. O tratamento inclui os fármacos diuréticos, digitálicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os inodilatadores como a PMB (Petrus, 2019) (Araújo et al., 2024).

A PMB fármaco utilizado para o tratamento de insuficiência cardíaca é um derivado benzimidazol-piridazinona conhecido como inodilatador que possui um mecanismo de ação principal, onde existe uma maior sensibilização ao cálcio intracelular (Ca^{+2}) e a inibição da fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3) (BOYLE; LEECH, 2012). Os principais efeitos fisiológicos observados é o aumento da força de contração (efeito inotrópico positivo) com a diminuição do consumo de oxigênio pelo miocárdio, vale ressaltar que em um coração em insuficiência observa-se a redução da resposta beta-adrenérgica, por isso a sensibilização do cálcio é o principal mecanismo inotrópico da PMB. Ainda podemos destacar a vasodilatação sistêmica por meio da inibição da PDE3, diminuindo a concentração de (Ca^{+2}) livre no músculo liso vascular, podendo observar uma vasodilatação arterial e venosa (Araújo et al., 2024).

A PMB foi liberada para uso oficialmente para cães, entretanto o uso *off-label* já vem relatado estudo em gatos e outras espécies (Boyle; Leech, 2012). Em cães, os estudos são vastos e acontece a algumas décadas, são utilizados principalmente para o tratamento de DVMM e CDM (Araújo et al., 2024), outros autores pesquisaram o uso associado do PMB com outras drogas, buscando uma melhora do tratamento e assim um prognóstico melhor para o paciente e ainda demonstra que o diagnóstico tem que ser acompanhado de exames complementares, não podendo ser apenas baseando em relato do tutor evidenciando a importância do acompanhamento com médico veterinário cardiologista (Petrus, 2019).

O uso *off-label* em gatos é pesquisado principalmente para o tratamento cardiomiopatia hipertrófica não responsiva a taurina (Hambrook; Bennett, 2012). Porém, é controverso o seu uso pois sugere aumento da sobrevida porem não demostra evidencias conclusivas para se tornar o uso *on-label*, todavia existe a melhora da função atrial e uma melhora hemodinâmica (Baron Toaldo et al., 2020), por mais que seja seguro e bem tolerado e com uma base solida na farmacologia como existe para os cães, autores diferentes sugerem que existe a necessidade mais estudos sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica quando administrado em gatos (Gordon et al., 2025).

Ainda existe na literatura artigos que demostram o uso de PMB em animais não convencionais (a priori são animais que não são considerados domésticos), um artigo demostrou o uso do PMB em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), que vivia sob cuidados humanos, após o diagnóstico complementar com um ecocardiograma o betabloqueador foi substituído por PMB associado com furosemida, aumentando a estabilidade clínica do animal (Farsette et al., 2023).

Em equinos (*Equus ferus caballus*), estudos de farmacocinética em animais saudáveis demostrou que após a administração oral as concentrações plasmáticas foram baixas e não foi encontrado o metabolito ativo da PMB (O-desmetil-pimobendana), indicando baixa biodisponibilidade oral para essa espécie, como o fármaco não atingiu doses terapêuticas adequadas os autores sugeriam cautela antes do uso clínico da PMB (Jula et al., 2025).

Estudos farmacocinéticos em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) indicaram que, apesar da administração de doses superiores às preconizadas para cães e gatos, as concentrações plasmáticas permaneceram baixas. Entretanto, a detecção prolongada do metabólito ativo (O-desmetil-pimobendana) na circulação, associada à boa tolerabilidade clínica e à baixa incidência de efeitos adversos, sustenta o uso empírico da PMB, embora estudos clínicos adicionais ainda sejam indispensáveis (Ozawa et al., 2022).

O estudo em aves (*Amazona ventralis*) foi pioneiro ao fornecer os primeiros dados farmacocinéticos da PMB nessa espécie. Apesar do uso empírico prévio com doses extrapoladas de cães e gatos, as diferenças fisiológicas entre aves e mamíferos tornam essa extração imprecisa. As concentrações plasmáticas foram insuficientes, com absorção oral errática, baixa biodisponibilidade e alta variabilidade individual, não sendo possível recomendar esquemas posológicos confiáveis para aves com base nos dados atuais (Guzman et al., 2014).

Em suínos (*Sus scrofa domesticus*) foi feito um estudo e foi avaliado os efeitos hemodinâmicos sistêmicos da PMB e do seu metabolito ativo (O-desmetil-pimobendana) e os resultados demonstraram um aumento significativo na contratilidade cardíaca e na redução da resistência vascular sistêmica, confirmando o perfil inodilatador do fármaco, os autores concluíram também que o efeito inotrópico envolve o sistema B-adrenergico (Duncker et al., 1987).

Em furões (*Mustela putorius furo*) de meia idade e idosos, doenças cardíacas são frequentes principalmente a cardiopatia dilatada, contudo quase a totalidade dos fármacos utilizado para essa espécie o uso é *off-label*, vários parâmetros bioquímicos foram avaliados (ureia, creatinina, proteínas totais, bilirrubina, ALT, AST, GGT, glicose), os furões permaneceram saudáveis durante o estudo, os autores não observaram sinais clínicos adversos relacionados a administração da PMB, as doses utilizadas foram doses utilizadas em cães e ainda foi feito estudo com doses maiores e a conclusão dos autores foi que a PMB é bem tolerada nessa espécie, pois não induziu alterações graves em uso continuo entretanto não foi avaliado a eficácia terapêutica apenas a segurança do fármaco (Hermans et al., 2008).

Outros estudos recentes têm demonstrado que a PMB apresenta efeitos farmacológicos que extrapolam sua ação clássica como inodilatador. Nesse contexto, identificaram a PMB como um potente inibidor da transcrição e replicação do vírus da hepatite B (HBV), a partir de um rastreamento de fármacos aprovados pelo FDA. O fármaco promoveu redução significativa e dose-dependente dos níveis de antígeno de superfície do HBV (HBsAg), bem como dos RNAs virais e do DNA do core viral, tanto em modelos celulares quanto em camundongos transgênicos para HBV (Yuan et al., 2022).

3.3 PIMOBENDANA E OS MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

Do ponto de vista analítico, a PMB apresenta desafios relacionados à sua baixa solubilidade em meio aquoso, à presença de metabólitos farmacologicamente ativos especialmente a O-desmetil-pimobendana (ODMP), e à necessidade de quantificação em diferentes matrizes, como formas farmacêuticas sólidas, soluções orais, sistemas de liberação modificada e matrizes biológicas (Asakura et al., 1993; Kuriya et al., 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (HPLC-UV) constitui o método mais amplamente utilizado para a quantificação da PMB

em formas farmacêuticas. Essa ampla aplicabilidade está associada à elevada robustez do método, à simplicidade operacional, ao custo relativamente reduzido e à facilidade de validação em conformidade com as diretrizes regulatórias vigentes (Dobariya; Multani, 2013).

Na literatura a maioria dos métodos descritos para quantificação de PMB empregam colunas de fase reversa do tipo C18, com fases móveis compostas por misturas de solventes orgânicos, associados a fases aquosas acidificadas, com ajuste do pH. Isso favorece a simetria dos picos cromatográficos e o tempo de retenção adequados (Dobariya; Multani, 2013; Leão et al., 2024).

Além disso, métodos HPLC-UV são amplamente utilizados como métodos para estudos de estabilidade, permitindo a avaliação da degradação da PMB em condições de hidrolise ácido, básico, e com separação adequada entre o fármaco e seus produtos de degradação (GudapatI et al., 2020).

Ainda é importante ressaltar que métodos para a quantificação da PMB em sistemas inovadores já são utilizados, em um estudo recente um método foi validado utilizando HPLC-UV para a determinação do teor e para ensaios de liberação em formas farmacêuticas impressas em 3D, demonstrando que a técnica é linear, precisa, específica para matrizes complexas e robusta o suficiente para atender as normas regulatórias (Leão et al., 2024).

Entretanto para estudos farmacocinéticos, de bioequivalência e de biotransformação, os métodos em cromatografia líquida (LC) acoplado a espectrometria de massas (LC-MS) são mais aplicáveis pois são mais sensíveis e conseguem detectar e quantificar ao mesmo tempo concentrações na faixa de nanograma por litro (ng/L) demonstrando que para matrizes biológicas como o plasma requer uma seletividade mais precisa por conta da presença dos metabolitos ativo da PMB e assim fornecendo dados mais robustos para esses estudos. Além disso, métodos LC-MS têm sido amplamente utilizados para estudos indicativos de estabilidade, possibilitando a avaliação da degradação da PMB (Saengklub et al., 2022).

Outros métodos descritos foram baseados em se utilizar o HPLC com detecção por fluorescência para a quantificação do metabolito ativo da PMB (ODMP), esses métodos apresentam sensibilidade superior à detecção por UV, permitindo a quantificação da ODMP em sistemas biológicos, como os microssosas hepáticos de ratos,

com limites de detecção extremamente baixos. Entretanto a técnica de fluorescência tem pouca aplicabilidade em controle de qualidade (Kuriya et al., 2000).

É importante lembrar que a PMB é um fármaco que possui centro quiral, com isso métodos quirais para a separação dos enantiômeros vem sendo estudado também, pois permite também a detecção e a quantificação do ODMP enantiômero e para isso são utilizadas colunas cromatográficas com sílicas quirais, associados a detecção por fluorescência. Todavia esses métodos apresentam elevada complexidade e tem a sua aplicação restrita o que torna o método inviável para a aplicação nas análises de rotina ou nos ensaios de controle de qualidade (Asakura et al., 1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

A PMB utilizada como substância química de referência caracterizada (SQRC) foi obtida da CoperVet® (lote com pureza de 98,3%), sendo caracterizada previamente para confirmação de identidade e adequação ao uso analítico. Amostras comerciais em cápsulas e soluções orais não aquosas foram adquiridas do comércio nacional brasileiro. Utilizou-se água purificada (sistema OS50 LX – Gehaka®) e solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L preparada a partir de reagentes de diferentes fabricantes, empregados no estudo de robustez (Tabela 1).

Tabela 1: Informações sobre os ácidos clorídrico utilizado no teste de robustez

Marca	Fabricante	Lote	Data de Fabricação	Data de Validade
A	Neon	2203301914	Julho/2022	Junho/2026
B	Êxodo	63171	Abril/2022	Abril/2028
C	Synth	261980	Maio/2023	Maio/2026

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 EQUIPAMENTOS

As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific® Evolution 60® (Madison-WI, EUA), operado com software VisionLite®, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm. Para o preparo das soluções, empregou-se balança analítica AUY220 (Shimadzu®, Brasil) e banho ultrassônico Ultracleaner 1400 (Unique®, Brasil).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A caracterização físico-química da PMB empregada nos experimentos foi conduzida com o objetivo de confirmar a identidade estrutural do insumo farmacêutico ativo (IFA) e garantir a adequação de sua utilização no desenvolvimento e validação do método analítico proposto. A análise da matéria-prima é fundamental, considerando que o fármaco apresenta polimorfismo significativo, com mais de três formas cristalinas já descritas na literatura (Rekis et al., 2018), podendo impactar propriedades físico-químicas e comportamento espectral.

Para essa finalidade, foram utilizadas técnicas espectroscópicas complementares amplamente reconhecidas para elucidação estrutural, incluindo espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis), espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , conforme recomendações do INMETRO (2020) e referências clássicas de caracterização de substâncias orgânicas (Pavia et al., 2010; Boeren et al., 2014).

4.3.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Os espectros UV-Vis da PMB foram registrados no intervalo de 200 a 400 nm utilizando soluções de 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preparadas em metanol e em HCl 0,1 mol/L, seguindo os procedimentos instrumentais descritos na Seção 3.5. Esses espectros foram utilizados para fins de caracterização do padrão e para subsidiar a escolha do comprimento de onda analítico, posteriormente apresentada na Seção 3.5 (Dobariya; Multani, 2013).

4.3.2 ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) foram realizadas em espectrômetro Thermo Scientific™ Nicolet iS5, utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR) e software OMNIC™ 7.3 para aquisição e processamento dos dados. Os espectros foram registrados na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras acumuladas. As bandas obtidas foram utilizadas para confirmação da identidade do fármaco, e seus resultados são apresentados na Seção 4.1.2 (Chernienko et al., 2024).

4.3.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance Neo 500 (500 MHz para ^1H), equipado com sonda multinuclear Smart Probe de 5 mm com gradiente no eixo Z. Para a caracterização da PMB, os espectros de RMN de ^1H foram registrados em espectrômetro de alta resolução operando a 500 MHz, utilizando DMSO- d_6 como solventes e tetrametilsilano (TMS) ou o sinal residual do solvente como referência interna. Os dados espectrais foram empregados para confirmar a estrutura molecular da substância, sendo suas atribuições químicas discutidas na Seção 5.1.3. O processamento dos dados foi realizado no software TopSpin 1.3 (Bruker) (Santos; Colnago, 2013).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

O método espectrofotométrico foi validado de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA,2017), bem como segundo as diretrizes internacionais do guia Q2(R1) do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e do *Official Methods of Analysis* (Appendix F) da *AOAC INTERNATIONAL*. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos softwares Microsoft Excel®, OriginPro® 8.5 e Design-Expert® 13 (*Stat-Ease Inc.*).

Os parâmetros avaliados incluíram: linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, seletividade e robustez.

4.5 SELEÇÃO DO SOLVENTE E DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA ESPECTROFOTOMÉTRICO

A seleção do solvente foi realizada por meio da avaliação dos espectros de absorbância da PMB (8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em diferentes meios, incluindo acetonitrila, etanol, metanol, água purificada, soluções de HCl (0,01 a 1,0 mol/L) e solução de NaOH 0,5 mol/L. Para cada solvente, foram registrados espectros UV-Vis na faixa de 200 a 400 nm, com o objetivo de caracterizar o comportamento espectral da PMB e auxiliar na identificação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) em cada meio. Os solventes avaliados encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Solventes e soluções avaliados na seleção do meio de dissolução da PMB (8,0 µg/mL).

Solventes	pH
Acetonitrila PA	*
Etanol PA	*
Metanol PA	*
Água purificada	5,45
0,01 mol/L HCl	2,10
0,1 mol/L HCl	1,23
1,0 mol/L HCl	0,25
0,5 mol/L NaOH	13,45

*: Não determinado. Fonte: Elaborada pelo autor

4.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES

4.6.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Pesaram-se 20,0 mg da PMB padrão (SQRC) e transferiu para balão volumétrico de 100 mL. Adiciou-se 10 mL de metanol e a dispersão foi realizada em um banho de ultrassom por 10 minutos até completa solubilização. Em seguida, o volume foi completado até o menisco com solução de HCl 0,1 mol/L, obtendo-se a solução-estoque (200,0 µg/mL) que em seguida diluições adequadas foram preparadas para obtenção dos níveis de 2,0 a 14,0 µg/mL utilizados na curva analítica.

4.6.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PARA ROBUSTEZ

Para os ensaios de robustez (Seção 4.7.6), preparou-se uma solução padrão de 8,0 µg/mL da PMB a partir da solução-estoque, utilizando as três marcas comerciais de HCl listadas na Tabela 1. Variaram-se deliberadamente os fatores: concentração do ácido (0,09–0,11 mol/L), comprimento de onda (327–331 nm) e fabricante do HCl, conforme planejamento fatorial 2³ descrito no item 4.7.6.

4.6.3 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA A EXATIDÃO

Para o ensaio de recuperação (Seção 3.7.4), preparou-se inicialmente uma solução da amostra comercial de PMB com concentração de 10,0 µg/mL. Utilizou-se a solução-padrão de 20,0 µg/mL para realizar as adições correspondentes a 80%, 100% e 120% da concentração nominal, resultando em soluções contendo 5,0; 6,0; e 7,0 µg/mL de PMB. Cada nível foi preparado e analisado em triplicata.

4.6.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA SELETIVIDADE

Para os ensaios de seletividade, foram preparadas soluções placebo representativas das duas formas farmacêuticas avaliadas, conforme a composição descrita nas Tabelas 3 e 4. As preparações foram conduzidas seguindo os mesmos procedimentos aplicados às amostras contendo o fármaco, garantindo equivalência no processo de extração.

a) Placebo das cápsulas

Os excipientes listados na Tabela 3 foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 10 mL de metanol e a mistura foi submetida à sonicação por 10 minutos. O volume foi então completado com solução de HCl 0,1 mol/L. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado para avaliação de possíveis interferências.

Tabela 3. Excipientes presentes nas formulações sólidas (cápsulas) contendo pimobendana.

Fabricante	Excipientes declarados
Purifarma	Celulose; Croscarmelose sódica; Lauril sulfato de sódio; Dióxido de silício; Talco; Carbotil HR®
Copervet (Pimo-C®)	Ácido cítrico; Carboximetilcelulose (CMC); Dióxido de silício; Polivinilpirrolidona K30 (PVP K30); Estearato de magnésio; Sorbato de potássio

Fonte: Elaborada pelo autor

b) Placebo do veículo líquido anidro

Transferiu-se 1,0 mL do veículo anidro descrito na Tabela 4 para balão volumétrico de 25 mL, adicionaram-se 10 mL de metanol e procedeu-se com sonicação por 10 minutos. O volume foi completado com solução de HCl 0,1 mol/L. Uma alíquota de 1,0 mL dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e novamente diluída com HCl 0,1 mol/L.

As soluções placebo foram analisadas em 329 nm sob as mesmas condições utilizadas para as amostras contendo pimobendana.

Tabela 4. Excipientes presentes nas formulações líquidas orais (veículo anidro) contendo pimobendana.

Fabricante / Veículo	Excipientes declarados
Veículo anidro (laboratório)	Álcool de cereais; Glicerina bidestilada; Polietilenoglicol 400; Propilenoglicol; Sorbato de potássio; flavorizante de picanha
Copervet (Pimo-S®)	Glicerina bidestilada; Propilenoglicol; Polietilenoglicol 300; Polivinilpirrolidona K30 (PVP K30); Sorbato de potássio; Sucralose

Fonte: Elaborada pelo autor

4.6.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO

Para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, foram preparadas soluções independentes das duas formas farmacêuticas comerciais (cápsulas e solução oral anidra), ajustadas à concentração final de 8,0 µg/mL.

a) Cápsulas

O conteúdo de cápsulas comerciais contendo 1,25 mg de pimobendana foi transferido para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 10 mL de metanol e a dispersão foi submetida à sonicação por 10 minutos. O volume foi completado com solução de HCl 0,1 mol/L e homogeneizado. Após centrifugação, uma alíquota de 4,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e diluída até o menisco com HCl 0,1 mol/L, obtendo-se solução final a 8,0 µg/mL.

b) Solução oral anidra

O volume equivalente à dose declarada (1,25 mg/mL) foi calculado como 64 µL e transferido para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com HCl 0,1 mol/L e a solução foi submetida à sonicação por 10 minutos, resultando em concentração final de 8,0 µg/mL.

Essas soluções foram utilizadas nos ensaios de repetibilidade (seis determinações no mesmo dia) e de precisão intermediária (seis determinações em três dias distintos).

4.7 PARÂMETROS ANALÍTICOS

A validação do método foi conduzida conforme os requisitos estabelecidos na Resolução RDC nº 166/2017 (ANVISA), no guia ICH Q2(R1) e no Appendix F da AOAC International. Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção

(LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, seletividade e robustez.

4.7.1 LINEARIDADE

A linearidade foi avaliada em sete níveis de concentração (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$), preparados a partir da solução-estoque da PMB (SQRC). Cada nível foi analisado em triplicata, totalizando três curvas analíticas independentes obtidas em três dias não consecutivos. As absorbâncias foram registradas em 329 nm (ordem zero) e plotadas em função das respectivas concentrações. A regressão linear foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados, avaliando-se a equação da reta, o coeficiente de correlação (r) e a distribuição dos resíduos, conforme critérios estabelecidos nas normas de validação citadas.

4.7.2 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados a partir dos dados obtidos nas curvas analíticas de linearidade. Os valores foram calculados utilizando-se o desvio-padrão do intercepto da regressão linear (σ) e a inclinação média das curvas (S), conforme preconizado pelo guia ICH Q² e pela RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017). As equações empregadas foram:

$$\begin{aligned} &\triangleright \text{LD} = 3,3 \times (\sigma / S) \\ &\triangleright \text{LQ} = 10 \times (\sigma / S) \end{aligned}$$

Os resultados obtidos foram expressos em unidades de concentração ($\mu\text{g/mL}$), sendo utilizados exclusivamente para fins de caracterização da sensibilidade do método.

4.7.3 PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada por meio da análise de seis soluções independentes de PMB, preparadas a partir das formulações comerciais e ajustadas à concentração de 8,0 $\mu\text{g/mL}$, conforme descrito na Seção 4.6.5. Todas as medições foram realizadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo conjunto instrumental.

A precisão intermediária foi avaliada pela análise de três conjuntos independentes de soluções, preparadas em três dias distintos, por diferentes analistas e utilizando o mesmo laboratório e condições instrumentais. Os resultados foram expressos como

desvio padrão relativo (DPR%), conforme estabelecido na RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017) e no guia ICH Q²(R1).

4.7.4 EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada por meio do ensaio de recuperação, utilizando soluções padrão e da amostra comercial de PMB. Soluções da amostra contendo 10,0 µg/mL de PMB foram enriquecidas com volumes adequados da solução padrão de 20,0 µg/mL, de modo a obter três níveis de adição correspondentes a 80%, 100% e 120% da concentração nominal. Cada nível foi preparado e analisado em triplicata, seguindo o mesmo procedimento aplicado às demais soluções do método.

A porcentagem de recuperação (%R) foi calculada conforme recomendado pelo Appendix F da AOAC *International*, utilizando a Equação (1):

$$\%R = \left(\frac{Ca - Cs}{Ct} \right) \times 100$$

em que:

- **C_a** = concentração encontrada na amostra adicionada de padrão
- **C_s** = concentração encontrada na amostra sem adição de padrão
- **C_t** = concentração teórica de padrão adicionada

Os critérios de aceitação foram baseados na RDC nº 166/2017 e no guia ICH Q², considerando aceitáveis recuperações no intervalo de 98 a 102%, com o desvio padrão relativo compatível com métodos espectrofotométricos em UV.

4.7.5 SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada por meio da análise de soluções placebo representativas das formulações sólidas (cápsulas) e líquidas (veículos orais anidros) comercializadas ou manipuladas para uso veterinário. As composições dos excipientes mais comuns empregados nessas formulações estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

As soluções placebo foram submetidas aos mesmos procedimentos de extração, diluição e leitura aplicados às amostras contendo PMB, garantindo equivalência operacional no processo analítico. Os espectros obtidos foram comparados com os das soluções-padrão e das amostras comerciais, verificando-se a ausência de interferências significativas no comprimento de onda analítico de 329 nm, condição necessária para a confirmação da seletividade do método.

4.7.6 ROBUSTEZ

A robustez do método foi avaliada por meio de um delineamento fatorial completo 2^3 , totalizando 22 experimentos, planejados no software Design-Expert® 13 (Stat-Ease Inc.). Foram investigados três fatores deliberadamente variados, considerados críticos para o desempenho do método espectrofotométrico:

Concentração da solução de HCl, comprimento de onda de leitura e marca do reagente

Comprimento de onda: 327 a 331 nm

- a) Marca do reagente de HCl empregado na preparação das soluções.

Três fabricantes distintos (A, B e C), conforme apresentado na Tabela 1.

Os ensaios foram conduzidos na concentração de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de PMB, conforme descrito no item 3.5.2. A resposta avaliada foi a absorbância obtida em cada condição experimental. Os dados foram analisados por ANOVA (nível de confiança de 95%), permitindo identificar se as variações propostas afetavam significativamente o desempenho do método, conforme os critérios da RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017) e do guia ICH Q2(R1).

A matriz experimental contendo todas as combinações dos níveis dos fatores encontra-se apresentada na Tabela 5. As combinações dos níveis dos fatores estão apresentadas com seus respectivos números de corrida. Nesse delineamento, cada condição experimental (*RUN*) corresponde a uma combinação específica entre a concentração de HCl, o comprimento de onda e a marca do reagente.

As análises foram realizadas utilizando solução da amostra comercial contendo 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de PMB (preparada conforme item 4.6.2). A variável resposta monitorada foi a absorbância medida em 329 nm, conforme estipulado para o método. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%, visando avaliar a significância dos efeitos principais, das interações e da curvatura, conforme recomendado pela RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017) e pelo guia ICH Q2(R1).

Tabela 5: Matriz experimental do delineamento factorial 2³ utilizado para a avaliação da robustez do método, conforme planejado no software Design-Expert® 13.

Experimentos (run)	Concentração molar de HCl	Comprimento de onda (nm)	Marca do HCl (a/b/c) *
1	0,11	329	B
2	0,10	331	C
3	0,10	327	A
4	0,10	327	B
5	0,09	331	A
6	0,09	328	C
7	0,09	328	C
8	0,10	329	A
9	0,10	327	B
10	0,09	331	B
11	0,11	327	C
12	0,10	328	C
13	0,09	329	B
14	0,11	331	A
15	0,11	329	A
16	0,11	327	A
17	0,10	331	B
18	0,09	327	A
19	0,10	329	A
20	0,09	330	C
21	0,11	329	B
22	0,11	327	C

Fonte: Elaborada pelo autor

*Marcas de HCl: A: Neon, B: Éxodo, C: Synth

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA PMB

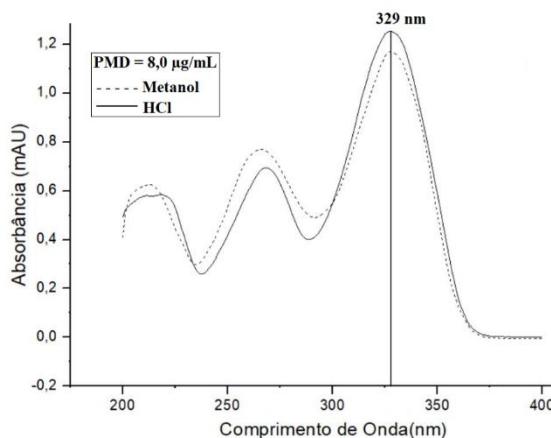
A caracterização da matéria-prima é etapa fundamental para assegurar a identidade química da PMB empregada no desenvolvimento e validação do método analítico. Foram utilizadas três técnicas complementares: espectroscopia UV-Vis, FTIR-ATR e RMN de ¹H, permitindo confirmar a estrutura molecular e a presença dos grupos funcionais característicos do fármaco. Os resultados obtidos são apresentados nas seções subsequentes.

5.1.1 ESPECTRO UV/VIS

O espectro UV-Vis da PMB foi obtido na faixa de 200 a 400 nm, utilizando solução de 8,0 µg/mL preparada em metanol e na solução de HCl 0,1 mol/L. O perfil espectral apresentou três bandas de absorção bem definidas, atribuídas às transições eletrônicas do sistema aromático e dos grupos cromofóricos presentes na molécula, incluindo o anel benzimidazol e a carbonila da diidropiridazinona.

Observou-se banda de maior intensidade na região próxima a 329 nm, correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, conforme descrito na literatura (Bagul et al., 2024). As demais bandas na região de 230 - 290 nm refletem contribuições adicionais do sistema aromático e dos substituintes heterocíclicos da molécula. A Figura 2 apresenta o espectro UV-Vis obtido para a matéria-prima, evidenciando o conjunto de bandas características do fármaco.

Figura 2 – Espectros UV-Vis da pimobendana (8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) registrados em metanol e em solução de HCl 0,1 mol/L, na faixa de 200–400 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor no software OriginPro® 8.5.

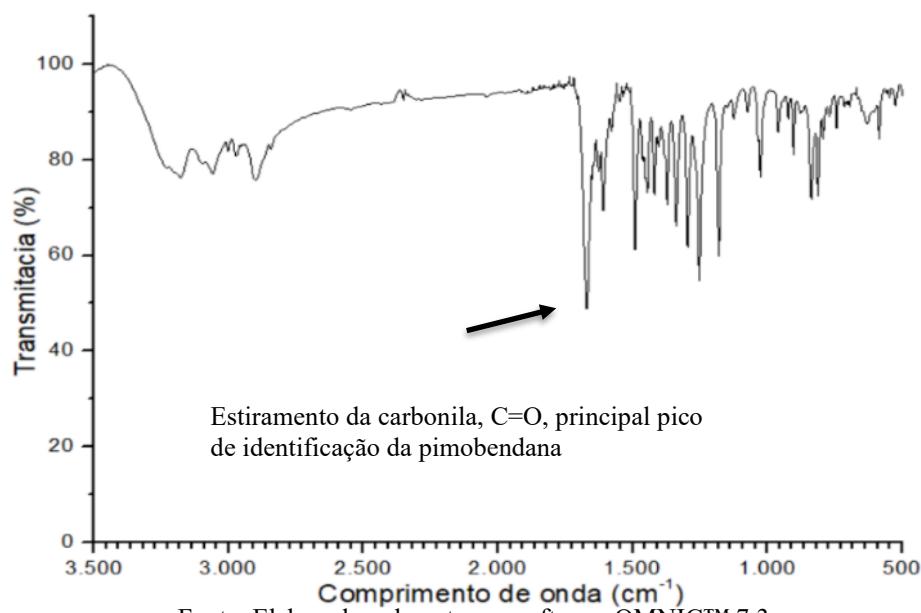
5.1.2 ESPECTRO FTIR-ATR

O espectro FTIR-ATR da matéria-prima de pimobendana é apresentado na Figura 3, exibindo as bandas características esperadas para a estrutura do fármaco. As principais absorções e suas respectivas atribuições vibracionais encontram-se sumarizadas na Tabela 6.

A banda intensa em 1628 cm^{-1} corresponde ao estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) presente no anel diidropiridazinona, constituindo um dos marcadores espectrais mais relevantes para identificação da PMB. Bandas adicionais foram observadas em 3200 cm^{-1} , atribuída ao estiramento N-H aromático, e em 2900 cm^{-1} , associada ao estiramento C–H alifático.

Na região de *fingerprint* ($900 - 650 \text{ cm}^{-1}$), destacam-se as bandas em 873 e 810 cm^{-1} , atribuídas às deformações fora do plano (*out-of-plane*) de anéis aromáticos, compatíveis com a presença do sistema benzimidazólico da molécula. O conjunto observado confirma a identidade da substância e está de acordo com descrições presentes na literatura (BOEREN et al., 2014) e em documentos de referência estrutural da PMB.

Figura 3 – Espectro FTIR-ATR da pimobendana padrão registrado na faixa de 4000–400 cm^{-1}



Fonte: Elaborado pelo autor no software OMNIC™ 7.3.

Tabela 6. Principais bandas de absorção observadas no espectro FTIR-ATR da pimobendana e suas atribuições.

Pico (cm^{-1})	Atribuição
3200	Estiramento N-H
2900	Estiramento C–H alifático
1671	Estiramento da carbonila (C=O)
873	Deformação fora do plano C-H aromático
810	Deformação fora do plano C-H aromático

Fonte: Dados experimentais do autor.

5.1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H da PMB, obtidos em solvente DMSO-d₆, apresentaram perfil plenamente compatível com a estrutura química descrita para o fármaco. A Figura 4 apresenta os espectros completos, enquanto as principais atribuições dos sinais observados encontram-se resumidas na Tabela 7.

No espectro de RMN ^1H , sinais característicos foram observados na região de 7,50 – 8,15 ppm, correspondentes aos hidrogênios aromáticos do sistema benzimidazólico, confirmando a presença desse núcleo heterocíclico na molécula. Os sinais aromáticos adicionais em 7,11 – 7,13 ppm, atribuídos a dupletos, corroboram a presença do anel anisólico substituído.

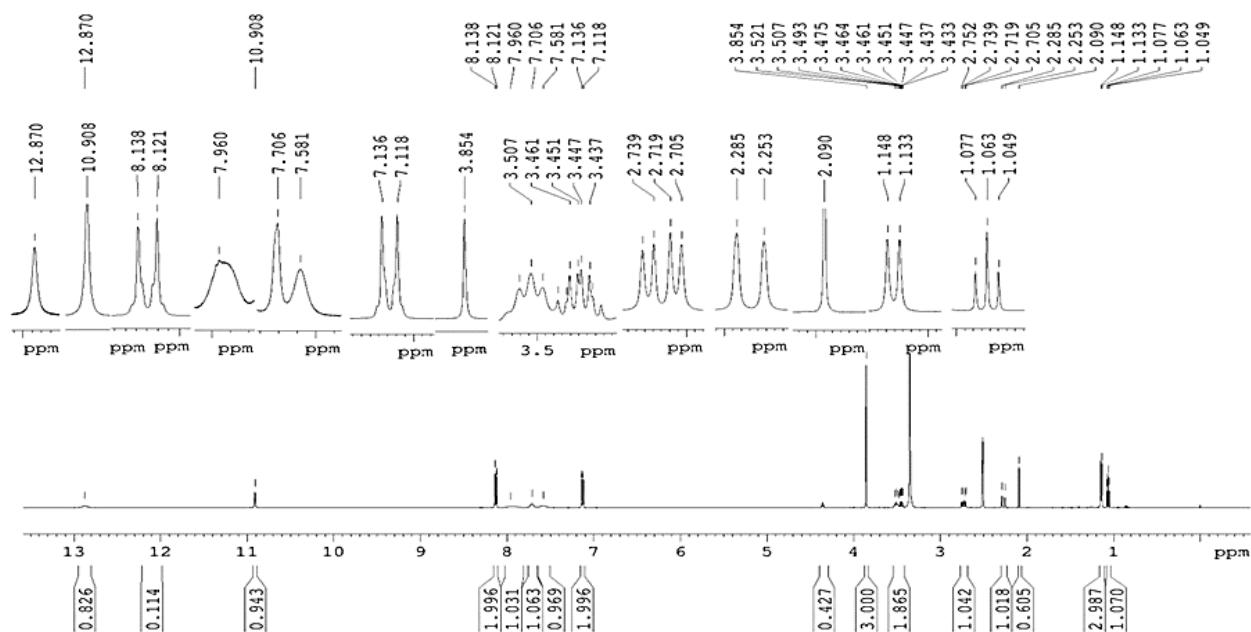
O sinal observado na faixa de 3,47 – 3,52 ppm, com padrão de duplo de quarteto, foi atribuído ao hidrogênio do carbono quiral (C–H), evidenciando o centro estereogênico da molécula. A região entre 4,15 – 4,25 ppm apresentou um quadruplo característico do grupo O–CH₂, enquanto o singuleto em 3,84 ppm confirmou a presença do grupo metoxi (O–CH₃).

Os sinais alifáticos incluem o duploto em 1,12 – 1,13 ppm, atribuído ao grupo CH_3 , bem como os sinais em 2,25 – 2,26 ppm e 2,70 – 2,72 ppm, correspondentes aos grupos CH_2 , sendo este último um duploto de duploto, indicativo de um metileno adjacente ao centro quiral.

Adicionalmente, foram observados dois singletos em campo baixo, em 10,88 – 10,90 ppm e 12,84 – 12,87 ppm, atribuídos aos prótons NH do sistema benzimidazólico, confirmando a integridade do núcleo heterocíclico da PMB.

O conjunto de sinais observados, bem como seus deslocamentos químicos e padrões de multiplicidade, reproduz fielmente os dados descritos na literatura (BOEREN et al., 2014) para a pimobendana, corroborando a identidade estrutural e a pureza da matéria-prima utilizada no estudo.

Figura 4 – Espectros de RMN¹H da pimobendana (DMSO-d₆).



Fonte: Dados experimentais obtidos pelo autor no software Topspin 4.0

Tabela 7. Principais sinais observados nos espectros de RMN¹H da PMB e suas atribuições.

PPM	Comparação	Conclusão
1,12 – 1,13	Duploto (CH ₃)	Confirma o grupo metila
2,26 – 2,25	Duploto (CH ₂)	Confirma o CH ₂
2,70 – 2,72	Duploto de duploto (CH ₂)	Confirma o metileno adjacente ao centro quiral
3,47 – 3,52	Duploto de quarteto (CH)	Centro quiral
3,84	Singleto (O-CH ₃)	Confirma a presença do grupo metoxi
7,11 – 7,13	Dubletos aromáticos	Confirma o anel aromático anisólico
7,50 – 8,15	Hidrogênios aromáticos (multipletos)	Confirma os hidrogênios do anel benzimidazol
10,88 – 10,90	Singleto (NH)	Confirma o NH do sistema heterocíclico
12,84 – 12,87	Singleto (NH)	Confirma o NH do benzimidazol

Fonte: Espectros obtidos experimentalmente pelo autor e comparada com BOEREN et al., 2014

5.2 SELEÇÃO DO SOLVENTE

A escolha do solvente adequado constitui uma etapa crítica no desenvolvimento de métodos espectrofotométricos, pois influencia diretamente a solubilidade da PMB, a definição do perfil espectral, a posição do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e a intensidade do sinal analítico. Para determinar o meio mais apropriado, avaliou-se o comportamento espectral da PMB na concentração de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ em diferentes solventes orgânicos, aquosos, ácidos e básicos. Os valores de λ_{max} e de absorbância obtidos encontram-se apresentados na Tabela 8.

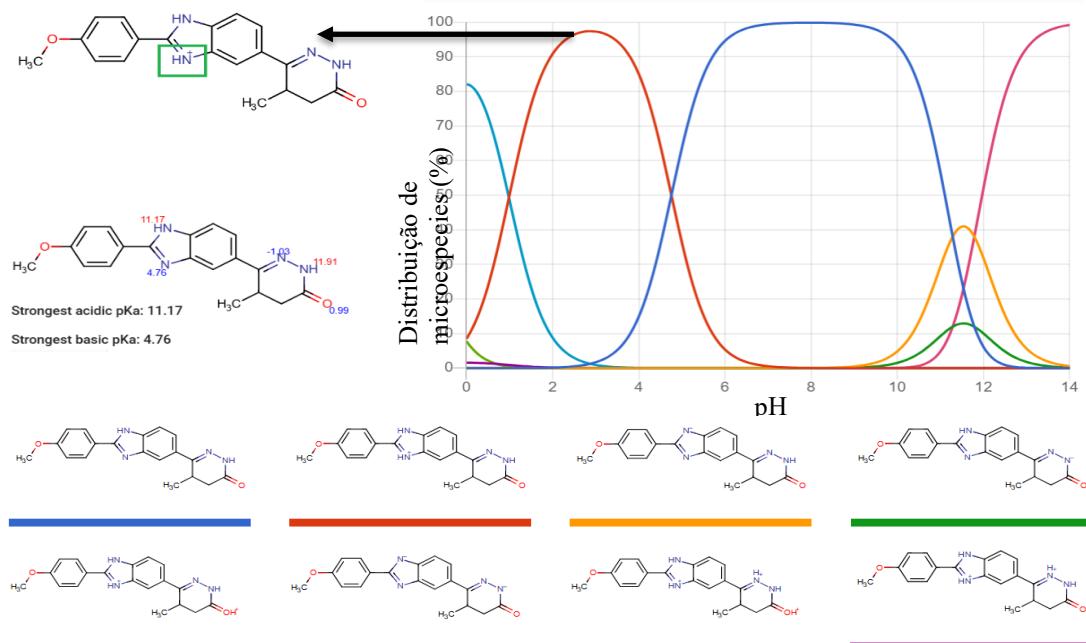
Tabela 8: Seleção de solventes para determinação espectrofotométrica da pimobendana (8,0 µg/mL)

Solvente / Solução	λ_{max} (nm)	Absorbância (mAU)
Acetonitrila PA	328	1,036
Etanol PA	329	0,520
Metanol PA	329	0,896
Água purificada	327	0,832
HCl 0,01 mol/L	329	1,342
HCl 0,1 mol/L	329	0,976
HCl 1,0 mol/L	329	0,915
NaOH 0,5 mol/L	339	0,384

Fonte: Dados obtidos experimentalmente pelo autor.

A interpretação desses resultados deve ser feita à luz do comportamento ácido–base da molécula. Conforme indicado pelo perfil de microespecies previsto pelo software Chemicalize® (Figura 5), a PMB apresenta pKa básico de aproximadamente 4,76 e pKa ácido próximo de 11,17, permanecendo predominantemente protonada em meio ácido. Essa condição favorece sua solubilização e resulta em espectros mais definidos e intensos, especialmente na região de absorção de maior relevância analítica.

Figura 5 – Distribuição ácido-base e microspecies da pimobendana calculadas pelo software Chemicalize® (ChemAxon).



Fonte: Elaborado pelo autor com dados obtidos no software Chemicalize® (ChemAxon).

Os solventes orgânicos (acetonitrila, etanol e metanol) produziram espectros bem definidos e λ_{max} entre 328 e 329 nm, porém com intensidades de absorbância moderadas, compatíveis com solubilidade intermediária da PMB nesses meios. Em água purificada, observou-se redução da absorbância, indicando limitação de solubilidade em pH neutro.

Em contraste, as soluções ácidas, particularmente aquelas contendo entre 0,01 e 1,0 mol/L de HCl, produziram respostas espectrais superiores, com λ_{max} fixo em 329 nm e absorbâncias mais elevadas. Esse comportamento é decorrente da protonação da PMB em meio ácido, condição que aumenta sua solubilidade e melhora a definição do espectro UV-Vis em ordem zero. Entre essas condições, o HCl 0,1 mol/L destacou-se por apresentar a melhor combinação entre intensidade sinal–ruído, estabilidade espectral, praticidade operacional, custo reduzido e reprodutibilidade.

A solução de NaOH 0,5 mol/L resultou em deslocamento do λ_{max} para 339 nm, acompanhado de expressiva queda da absorbância (0,384 mAU), sugerindo instabilidade estrutural e baixa solubilidade da PMB em meio altamente básico. Esse comportamento está de acordo com a baixa fração protonada da molécula em pH elevado.

Com base nesses resultados, o HCl 0,1 mol/L foi selecionado como solvente para as etapas subsequentes do método analítico, oferecendo o melhor desempenho em termos de solubilidade, definição espectral, estabilidade do sinal e aplicabilidade no controle de qualidade.

5.3 DETERMINAÇÃO DO Λ_{MAX}

A escolha de 329 nm como comprimento de onda analítico apresentou diversas vantagens experimentais. Em primeiro lugar, trata-se da região de máxima sensibilidade, onde o sinal da PMB é mais intenso e melhor definido em meio ácido, condição que favorece sua protonação e solubilidade. Além disso, nenhum dos excipientes presentes nas formulações analisadas exibiu absorbância significativa nessa faixa, conforme demonstrado nos estudos de seletividade (Seção 4.7.5), garantindo ausência de interferências analíticas.

O sinal em 329 nm também demonstrou elevada estabilidade espectral, com excelente reprodutibilidade entre leituras, dias e analistas. Essa faixa de comprimento de onda situa-se em uma região de baixa influência de ruído instrumental e alta eficiência óptica para espectrofotômetros UV-Vis modernos, independentemente da tecnologia da lâmpada empregada (deutério, xenônio ou híbrida), conforme descrito por Skoog et al.

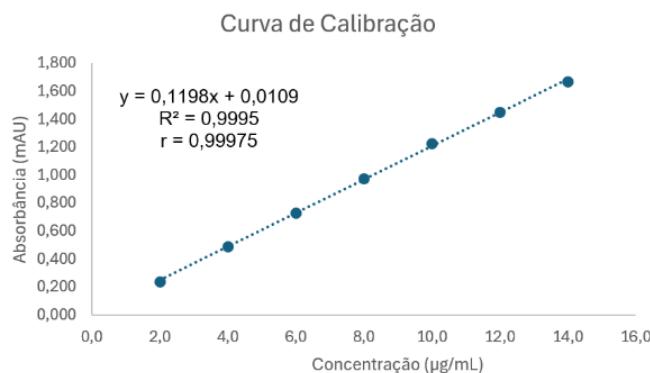
(2009) e Harris (2017). A seleção do λ_{max} é reconhecida como etapa crítica para assegurar sensibilidade, seletividade e robustez analítica, conforme recomendam o guia ICH Q2(R1) e a RDC nº 166/2017 (ANVISA,201). Assim, a adoção de 329 nm foi fundamental para garantir o desempenho adequado nas etapas subsequentes da validação.

5.4 LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de três curvas analíticas independentes, preparadas em dias distintos, seguindo as recomendações da RDC nº 166/2017 (ANVISA) e do guia ICH Q2(R1). Foram utilizados sete níveis de concentração (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 $\mu\text{g/mL}$), obtidos a partir da solução-estoque preparada em HCl 0,1 mol/L. Cada nível foi analisado em triplicata.

As absorbâncias registradas em 329 nm foram plotadas em função das respectivas concentrações, resultando em curvas com comportamento linear típico. A Figura 6 apresenta uma curva analítica representativa da relação concentração–absorbância.

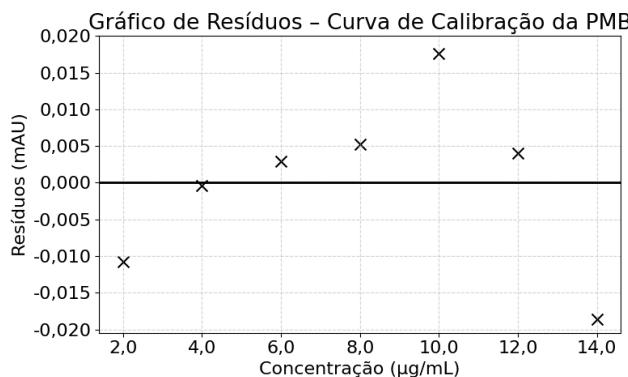
Figura 6 – Curva analítica representativa da pimobendana na faixa de 2,0–14,0 $\mu\text{g/mL}$, obtida em solução de HCl 0,1 mol/L, com leituras realizadas em 329 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor no software Microsoft Excel® 2019.

A adequação do modelo linear foi avaliada também por meio do gráfico de resíduos, apresentado na Figura 7, o qual evidencia distribuição aleatória dos erros em torno de zero, sem tendência associada à concentração. Esse comportamento confirma a homocedasticidade dos dados e a ausência de falta de ajuste, reforçando a validade do modelo linear para a faixa estudada.

Figura 7 – Gráfico dos resíduos correspondente à curva analítica, demonstrando distribuição aleatória e ausência de tendência sistemática.



Fonte: Elaborado pelo autor no <https://www.mycompiler.io/pt/new/python>

Os parâmetros de regressão linear obtidos para as três curvas independentes são apresentados na Tabela 9. Os coeficientes de correlação (*r*) permaneceram consistentemente superiores a 0,9990, atendendo plenamente às exigências regulatórias. As inclinações das curvas apresentaram baixa variação entre dias, evidenciando boa reproduzibilidade, enquanto os interceptos próximos de zero indicaram ausência de erro sistemático.

Tabela 9. Parâmetros de regressão linear das três curvas analíticas independentes construídas para avaliação da linearidade.

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	329
Faixa de linearidade (µg/mL)	2,0-14,0
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,1198x + 0,0109$
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,99975
LD (µg/mL)	0,125
LQ (µg/mL)	0,250

Fonte: Elaborada pelo autor

Abreviaturas: (λ) Comprimento de onda; (LD) Limite de detecção; (LQ) Limite de quantificação.

O conjunto dos resultados demonstra que o método desenvolvido apresenta excelente linearidade na faixa de 2,0–14,0 µg/mL, confirmando sua adequação para a quantificação da pimobendana em formulações farmacêuticas.

5.5 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da pimobendana foram estimados a partir dos parâmetros estatísticos das curvas analíticas obtidas na avaliação da linearidade (Seção 4.7.1). Os cálculos foram realizados utilizando o desvio-padrão do intercepto da regressão linear (σ) e a inclinação média das curvas (S), conforme recomendado pela RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017) e pelo guia ICH Q2(R1).

Os valores obtidos encontram-se apresentados na Tabela 9, juntamente com os demais parâmetros de regressão linear. Os resultados indicam que o método espectrofotométrico apresenta sensibilidade adequada para a detecção e quantificação de baixas concentrações de PMB, o que é particularmente relevante para formulações contendo doses reduzidas, como cápsulas de 1,25 mg.

Os valores de LD (0,125 µg/mL) e LQ (0,250 µg/mL) estão de acordo com o desempenho esperado para métodos UV-Vis, demonstrando que o procedimento analítico desenvolvido é suficientemente sensível para aplicações de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

5.6 PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (interdia), utilizando a concentração de trabalho de 8,0 µg/mL para as formulações sólida e líquida. Para cada matriz, foram preparadas seis soluções independentes conforme descrito na Seção 3.6.5, e as leituras foram realizadas em 329 nm.

5.6.1 INTRADIA E INTERDIA

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10. Na avaliação da repetibilidade, os desvios-padrão relativos (DPR) permaneceram abaixo de 2%, atendendo plenamente aos critérios estabelecidos. Tendência semelhante foi observada na precisão intermediária, demonstrando estabilidade do método entre dias de análise distintos.

Tabela 10: Resultados de repetibilidade e precisão intermediária para cápsulas e solução oral anidra contendo pimobendana (8,0 µg/mL).

Amostra	Repetibilidade ^a ± DPR			Precisão intermediária ^b ± DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Cápsulas	101,08 ± 0,17	101,60 ± 0,10	101,95 ± 0,22	101,55 ± 0,95
Líquido anidro	99,46 ± 0,20	100,33 ± 0,06	100,54 ± 0,45	100,15 ± 0,56

Fonte: Elaborada pelo autor

^a n = 6 determinações realizadas no mesmo dia (repetibilidade).

^b n = 6 determinações realizadas em três dias distintos (precisão intermediária).

Condições espectrofotométricas: leituras realizadas em 329 nm utilizando solução de HCl 0,1 mol/L como solvente.

A variabilidade entre as determinações evidencia que o método espectrofotométrico desenvolvido apresenta precisão, nas condições avaliadas, sendo plenamente adequado para aplicação rotineira em laboratórios de controle de qualidade.

5.7 EXATIDÃO

A exatidão do método espectrofotométrico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, nos quais soluções da amostra foram enriquecidas com quantidades conhecidas de padrão de PMB. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Tabelas 11 e 12, correspondentes às formulações sólida (cápsulas) e líquida (solução anidra), respectivamente.

Tabela 11: Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão da forma farmacêutica capsula por meio do método espectrofotométrico proposto.

Concentração teórica de PMB adicionada (µg/mL)	Concentração de PMB recuperada (µg/mL)	Recuperação (%) Resultado	Média ± DPR (%)
5,00	5,00	99,89	
6,00	6,02	102,39	101,37 ± 1,29
7,00	7,01	101,84	

Fonte: Elaborada pelo autor

Os percentuais de recuperação para os três níveis avaliados (80%, 100% e 120%) permaneceram dentro do intervalo aceitável de 98,0 a 102,0%, estabelecido pela RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017), pelo guia ICH Q2(R1) e pelo Appendix F da AOAC International. Além disso, os desvios-padrão relativos (DPR) foram inferiores a 2,0% para todos os níveis testados, indicando precisão interna dos ensaios e ausência de influência significativa da matriz.

Tabela 12: Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão da forma farmacêutica líquida por meio do método espectrofotométrico proposto.

Concentração teórica de PMB adicionada (µg/mL)	Concentração de PMB recuperada (µg/mL)	Recuperação (%) Resultado	Média ± DPR (%)
5,00	5,00	99,33	
6,00	6,02	101,00	100,00 ± 0,83
7,00	7,01	100,26	

Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados confirmam a concordância entre os valores experimentais obtidos e os valores teóricos esperados, demonstrando que o método apresenta exatidão adequada tanto para a formulação sólida quanto para a líquida. Esses achados reforçam a confiabilidade do método desenvolvido para aplicação em análises rotineiras de controle de qualidade.

5.8 SELETIVIDADE

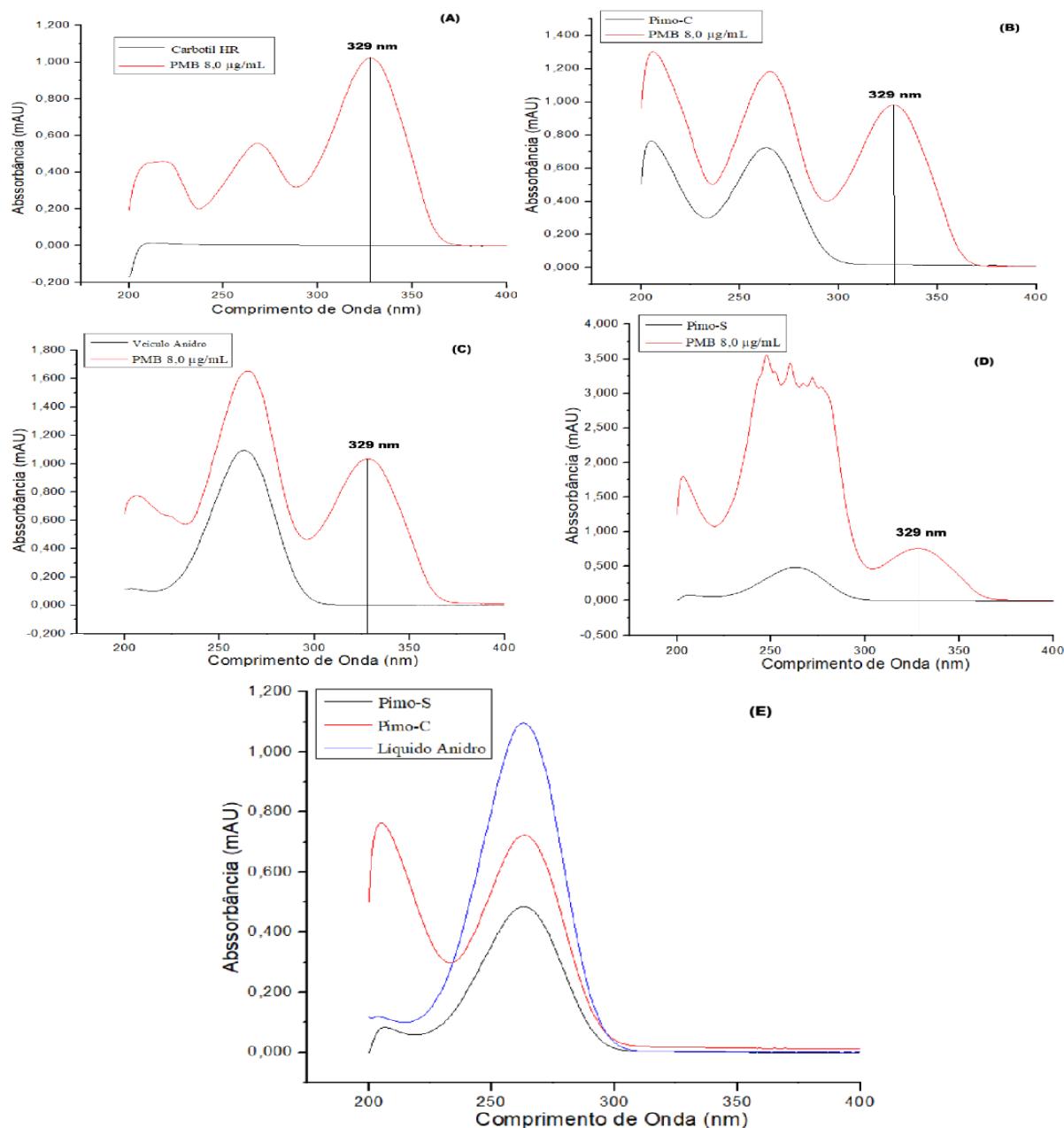
A seletividade do método espectrofotométrico foi avaliada pela comparação entre os espectros das formulações contendo PMB e os respectivos placebos das formas farmacêuticas sólida e líquida, conforme preconizado pela RDC nº 166/2017 (ANVISA,2017) e pelo guia ICH Q2(R1).

Os placebos foram preparados seguindo os mesmos procedimentos aplicados às amostras contendo o fármaco (Seção 4.7.5), assegurando a representação adequada das matrizes excipientes. Os espectros foram registrados na faixa de 200 a 400 nm, utilizando HCl 0,1 mol/L como solvente e comprimento de onda analítico previamente estabelecido em 329 nm (Seção 4.3).

A Figura 8 reúne os espectros da PMB e dos placebos, evidenciando que nenhuma das matrizes excipientes apresenta absorbância significativa em 329 nm. Em contraste, as soluções contendo PMB exibem um pico bem definido nessa região, característico da transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ do fármaco. Essa diferença marcante confirma que o sinal analítico observado é exclusivo da PMB, mesmo na presença das diferentes composições de excipientes das formulações sólida e líquida.

Os resultados confirmam que o método é seletivo para a determinação da PMB nas matrizes avaliadas, uma vez que não foi observada interferência oriunda de excipientes, solvente ou demais componentes das formulações. Dessa forma, o método desenvolvido é adequado e seguro para aplicação rotineira em análises de controle de qualidade farmacêutico.

Figura 8 – Espectros UV-Vis da pimobendana (PMB, 8,0 µg/mL) e dos placebos das formulações sólida e líquida registrados em HCl 0,1 mol/L.



Fonte: Elaborado pelo autor no software OriginPro® 8.5.

- (A): PMB vs. placebo da cápsula (Carbotil HR).
- (B): PMB vs. Placebo da cápsula (Pimo-C).
- (C): PMB vs. placebo Líquido Veículo Anidro.
- (D): PMB vs. placebo sólido (Pimo-S).
- (E): Placebos sólido (Pimo-S), concentrado (Pimo-C) e veículo anidro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9 ROBUSTEZ

A robustez do método espectrofotométrico foi avaliada por meio de um delineamento factorial completo 2^3 , totalizando 22 experimentos, planejados no software

Design-Expert® 13 (Stat-Ease). Foram avaliados três fatores deliberadamente alterados em torno da condição nominal do método: (A) concentração da solução de HCl (0,09 mol/L, 0,10 mol/L, 0,11 mol/L), (B) comprimento de onda de leitura (327 a 331 nm) e (C) fabricante do reagente de HCl (marcas A, B e C). A resposta monitorada foi a absorbância de solução de PMB a 8,0 μ g/mL, medida em 329 nm e os resultados estão ilustrados na Tabela 13 e 14.

Tabela 13 – Fatores e níveis avaliados no estudo de robustez do método espectrofotométrico para determinação de PMB.

Fator	Código	Descrição	Nível	Nível	Nível	Unidade
			baixo (-1)	central (0)	alto (+1)	
A	[HCl]	Concentração da solução de HCl	0,09	0,10	0,11	mol/L
B	λ	Comprimento de onda de leitura	327	329	331	nm
C	Marca	Fabricante do HCl	Marca A	Marca B	Marca C	---

Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados experimentais do delineamento foram ajustados a um modelo de segunda ordem do tipo *two-factor interaction* (2FI). A análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 14, indicou que o modelo não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$), indicando ausência de efeitos relevantes dos fatores principais de A (concentração de HCl) e B (comprimento de onda), bem como das interações AB e AC. O fator C (marca do reagente) apresentou efeito menos pronunciado, porém foi mantido no modelo por representar uma condição prática importante no contexto de controle de qualidade.

Tabela 14 – Resposta aos Fatores e níveis avaliados no estudo de robustez do método espectrofotométrico para determinação de PMB.

Experimentos (run)	Concentração molar de HCl	Comprimento de onda (nm)	Marca do HCl (a/b/c) *	Absorbância (mAU)
1	0,110	329	B	1,047
2	0,100	331	C	1,011
3	0,100	327	A	1,091
4	0,100	327	B	1,080
5	0,090	331	A	1,036
6	0,090	328	C	1,069
7	0,090	328	C	1,014
8	0,100	329	A	1,070
9	0,100	327	B	0,930
10	0,090	331	B	1,042
11	0,110	327	C	1,082
12	0,100	328	C	1,044
13	0,090	329	B	0,965
14	0,110	331	A	1,018
15	0,110	329	A	1,117
16	0,110	327	A	1,075
17	0,100	331	B	1,013
18	0,090	327	A	0,993
19	0,100	329	A	0,895
20	0,090	330	C	1,064
21	0,110	329	B	1,113
22	0,110	327	C	1,037

Fonte: Elaborada pelo autor

*As marcas A, B e C correspondem aos fabricantes avaliados conforme Tabela 1.

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) do modelo 2FI para a resposta absorbância na avaliação da robustez.

Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Teste F	p-valor	Significância
(2FI)	0,0203	9	0,0023	0,6155	0,7636	
A	0,0073	1	0,0073	2,00	0,1830	
B	0,0041	1	0,0001	0,0212	0,8865	
C	0,0014	2	0,0007	0,1842	0,8341	Não Significativo
AB	0,0054	1	0,0054	1,47	0,2489	
AC	0,0083	2	0,0041	1,13	0,3562	
BC	0,0025	2	0,0012	0,3343	0,7223	
Residual	0,0440	12	0,0037	*	*	
<i>“Falta de ajuste”</i>	0,0127	7	0,0018	0,2907	0,9309	Não Significativo
Erro	0,0313	5	0,0063	*	*	*
Total	0,0643	21	*			
R ²	0,3158	*	*	*	*	*

Fonte: Elaborada pelo autor

Os parâmetros de qualidade do ajuste encontram-se resumidos na Tabela 15. O coeficiente de determinação (R²), o R² ajustado e o R² predito apresentaram valores elevados e concordantes entre si, indicando bom poder de explicação do modelo e adequada capacidade preditiva. O coeficiente de variação (CV%) foi baixo, refletindo boa reproduzibilidade dos dados experimentais. Adicionalmente, o teste de falta de ajuste não foi significativo (p > 0,05), demonstrando que o modelo 2FI descrito é apropriado para representar o comportamento do sistema dentro da faixa estudada.

Tabela 16 – Estatísticas de ajuste do modelo de robustez obtido no Design-Expert® 13.

Parâmetro	Valor
R ²	0,3158
R ² ajustado	-0,1973
R ² predito	-0,7196
CV (%)	5,84
Precisão adequada	3,3119
Desvio padrão	0,0605

Fonte: Elaborada pelo autor

Os coeficientes estimados do modelo (Tabela 16) evidenciam que a variação simultânea da concentração de HCl e do comprimento de onda exerce o maior impacto sobre a absorbância, com efeitos positivos dentro da faixa de estudo. As interações AB e AC também apresentaram coeficientes relevantes, sugerindo que pequenas variações combinadas desses fatores podem alterar levemente o sinal analítico. Entretanto, tais

variações permaneceram dentro de limites aceitáveis e não comprometeram o desempenho do método.

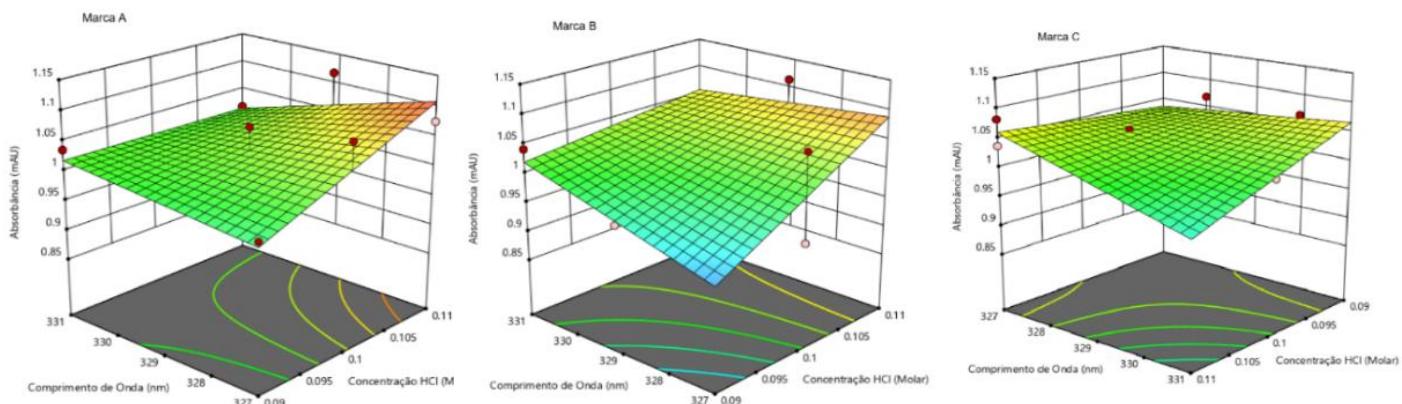
Tabela 17 – Coeficientes estimados do modelo 2FI para a resposta absorbância na avaliação da robustez.

Termo	Coeficiente estimado	Erro padrão	Intervalo de Confiança 95% inferior	Intervalo de Confiança 95% superior	VIF*
Intercepto	1,03	0,00143	0,9973	1,06	—
A	0,0199	0,0175	-0,0182	0,0581	1,17
B	-0,0053	0,0186	-0,0457	0,0352	1,18
C	0,0029	0,0191	-0,0388	0,0445	...
AB	-0,0317	0,0262	-0,0887	0,0253	1,39
AC	0,0100	0,0236	-0,0415	0,0615	...
BC	-0,0095	0,0244	-0,0626	0,0437	...

Fonte: Elaborada pelo autor

A visualização gráfica das superfícies de resposta em 3D (Figura 9) ilustra o comportamento da absorbância em função das combinações dos fatores avaliados. Observa-se que, na vizinhança da condição nominal do método (HCl 0,10 mol/L, 329 nm, marca intermediária), a resposta permanece estável, sem gradientes acentuados, o que confirma a robustez do método frente a pequenas variações deliberadas desses parâmetros.

Figura 9 – Superfícies de resposta em 3D para a absorbância da pimobendana (8,0 µg/mL) em função dos fatores de robustez obtidas no Design-Expert® 13. (A–C) Diferentes combinações entre concentração de HCl, comprimento de onda e marca do reagente avaliadas na faixa de 0,09–0,11 mol/L e 327–331 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor no software *Design-Expert® 13*.

Os gráficos de efeitos principais e de interação obtidos no estudo de robustez do método espectrofotométrico para determinação da PMB evidenciam que as variações dos fatores avaliados (concentração de HCl, comprimento de onda e marca do reagente) não produziram alterações significativas na resposta analítica. A absorbância medida em 329 nm manteve-se estável em todas as combinações estudadas, demonstrando que o sinal instrumental é pouco sensível às flutuações controladas.

De forma geral, os resultados do delineamento fatorial indicam que pequenas variações nos parâmetros experimentais não comprometem o desempenho do método, desde que mantidas dentro da faixa investigada. Assim, o método pode ser considerado robusto em relação ao preparo da solução de HCl, ao ajuste do comprimento de onda e à marca do reagente ácido utilizada na preparação do solvente.

5.10 APLICABILIDADE DO MÉTODO

A aplicabilidade do método espectrofotométrico desenvolvido foi avaliada por meio da análise de diferentes apresentações farmacêuticas contendo PMB, incluindo cápsulas, solução oral anidra e formulações produzidas em laboratório, além de seus respectivos placebos.

Os teores obtidos estão apresentados na Tabela 18, contemplando formulações produzidas em laboratório e produtos comerciais. Os valores encontrados situaram-se dentro da faixa usualmente aceita para produtos farmacêuticos (95–105%), apresentando baixa variação entre determinações e coerência com o conteúdo rotulado.

Tabela 18 – Análise de teor das diferentes formulações contendo pimobendana (PMB) utilizando o método espectrofotométrico proposto.

Amostra	Forma Farmacêutica	Excipientes	Teor encontrado
			± DPR (%)
Produzida*	Cápsula	Com Carbotil HR	98,44 ± 0,18
		Com Pimo-C	94,82 ± 0,53
Produzida*	Xarope sem açúcar	Veículo Anidro*	100,11 ± 0,11
		Pimo-S	102,54± 0,31
Comercial	Xarope	desconhecido	101,03±0,12
Comercial	Cápsula	desconhecido	101,55 ± 0,16
Comercial	Cápsula	desconhecido	104,32 ± 0,11
Comercial	Cápsula	desconhecido	102,03 ± 0,62

*: Produzida no laboratório de Farmacotécnica da UFMS, seguindo manuais farmacotécnicos da ANFARMAG (Anfarmag 2022) e o manual de Farmácia veterinária e Formulações Líquidas de Uso Oral.

Os resultados demonstram que o método é plenamente capaz de quantificar a PMB em diferentes matrizes, sem interferência de excipientes ou componentes da formulação, fato previamente corroborado nos estudos de seletividade. Além disso, o método mostrou-se prático e aplicável a rotinas de controle de qualidade, destacando-se por:

- ✓ simplicidade operacional, exigindo apenas diluição e leitura espectrofotométrica;
- ✓ rapidez analítica, com tempo total de análise inferior a 5 minutos;
- ✓ baixo custo, quando comparado a métodos cromatográficos;
- ✓ compatibilidade com rotinas industriais e laboratoriais, inclusive para análises seriadas;
- ✓ robustez comprovada, assegurando desempenho confiável mesmo sob pequenas variações experimentais.

Dessa forma, o método proposto atende às exigências regulatórias e apresenta desempenho adequado para a quantificação rotineira da PMB em formulações sólidas e líquidas, sendo apropriado para laboratórios acadêmicos, industriais e oficiais.

6. CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico desenvolvido demonstrou desempenho analítico sólido, preciso e confiável para a quantificação da PMB em formulações farmacêuticas sólidas e líquidas. A validação completa, conduzida de acordo com as normas da

ANVISA, ICH e AOAC, evidenciou linearidade exemplar, sensibilidade adequada, excelente precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis para métodos espectrofotométricos.

Os estudos de seletividade confirmaram que o sinal analítico em 329 nm é atribuível para a PMB, sem interferência significativa de excipientes ou componentes das matrizes avaliadas.

Adicionalmente, o método demonstrou robustez frente às variações deliberadas impostas no delineamento fatorial, assegurando sua estabilidade em condições práticas de laboratório.

A aplicação do método a amostras comerciais e produzidas em laboratório comprovou sua utilidade e confiabilidade no controle de qualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANFARMAG – Associação Nacional de Farmacêuticos Magistras. Panorama Setorial 2024. São Paulo: ANFARMAG, 2024. Disponível em: <https://www.anfarmag.org.br>
2. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 20th ed. Official Methods of Analysis, Washington, DC;2017.
3. ARAÚJO, Yasmim Maiara Gonçalves de; ALMEIDA, Bernardus Kelner Carvalho de; SILVA, Roberto Rômulo Ferreira da; VIEIRA FILHO, Marcos Antônio; GOMES, Danielle Inácio; OLIVEIRA, Anne Caroline de Jesus; PIMENTEL, Muriel Magda Lustosa. Cardiomiopatia dilatada em cães: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 2573–2589, jan./fev. 2024. DOI: 10.34119/bjhrv7n1-207
4. ASAOKURA, Makoto; NAGAKURA, Akihito; TARUI, Sachiyo; MATSUMURA, Riichiro. Simultaneous determination of the enantiomers of pimobendan and its main metabolite in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, Amsterdam, v. 614, p. 135–141, 1993
5. BAGUL, Mohini; SONAWANE, Bhushan; MUNIPALLI, Vijay Kumar; WARDE, S. U.; HARIHARN, C.; NAYAK, Smita; VAIDHUN, Bhaskar. Development and validation of novel HPTLC method for the estimation of Pimobendan in tablet dosage form. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research (JETIR)*, v. 11, n. 7, p. 494-502, 2024.
6. BARON TOALDO, M. et al. Effects of pimobendan on left atrial transport function in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Hoboken, v. 35, n. 1, p. 10–21, 2021. DOI: 10.1111/jvim.15976.
7. BOEREN, Marinus Maria Martinus; PARIDAANS, Rudolf Johannes; PETKUNE, Sanita; LUSIS, Viesturs; MUCENIECE, Dzintra. *Crystalline pimobendan, process for the preparation thereof, pharmaceutical composition*

- and use.* Estados Unidos: United States Patent and Trademark Office, US 8,680,101 B2, 25 mar. 2014.
8. BOYLE, Kimberly L.; LEECH, Elizabeth. A review of the pharmacology and clinical uses of pimobendan. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 22, n. 4, p. 398–408, 2012. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2012.00768.
 9. BRASIL. Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004. Aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comercializem. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 23 abr. 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em: 23 dez. 2025.
 10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 8 de junho de 2005. Regulamenta as práticas e a fiscalização dos estabelecimentos que manipulam produtos de uso veterinário e dispõe sobre as boas práticas de manipulação. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 9 jun. 2005. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em: 23 dez. 2025.
 11. BRASIL, RDC no 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
 12. CHERNIENKO, Alina; LESYK, Roman; ZAPRUTKO, Lucjusz; PAWEŁCZYK, Anna. IR-EcoSpectra: exploring sustainable *ex situ* and *in situ* FTIR applications for green chemical and pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 14, p. 100951, 2024. DOI: 10.1016/j.jpha.2024.02.005.
 13. DOBARIYA, V. H.; MULTANI, N. K. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of pimobendan in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 3, n. 3, p. 135-140, 2013.
 14. DUNCKER, Dirk J.; HARTOG, Johannes M.; LEVINSKY, Leon; VERDOUW, Pieter D. Systemic haemodynamic actions of pimobendan (UD-CG 115 BS) and its O-demethylmetabolite UD-CG 212 Cl in the conscious pig. *British Journal of Pharmacology*, Oxford, v. 91, n. 3, p. 609–615, 1987.
 15. FARSETTE, Anna Beathriz Nascimento; ALBERIGI, Bruno; ABEN-ATHAR, Carolina do Vale; PAULINO, Jéssica da Silva; ALVES, Arthur Carlos da Trindade; BARROS, Matheus de Almeida; DIAS NETO, Ramiro das Neves. Hypertrophic phenotypic cardiomyopathy in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 51, supl. 1, p. 880, 2023. DOI: 10.22456/1679-9216.126767.
 16. GORDON, S. G. et al. Use of pimobendan in cats: a practical evidence-based review. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, London, v. 27, p. 1–15, 2025. DOI: 10.1177/1098612X251386638.
 17. GUN, C., MADY, C. Inotrópicos não digitálicos. In: Batlouni M, Ramires JAF. *Farmacologia e terapêutica cardiovascular*. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 101-15
 18. GUDAPATI, Atchuta Ramakrishna; PAKALAPATI, Srinivasarao; RUMALLA, Chidananda Swamy; TAMMINA, Benarji Patrudu. Stability indicating LC-MS method development and validation for the study of the forced degradation behavior of pimobendan drug. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 10, n. 4, p. 526–530, 2020. DOI: 10.5330/ijpi.2020.4.91.

19. GUZMAN, David Sanchez-Migallon; BEAUFRÈRE, Hugues; KUKANICH, Butch; BARKER, Steven A.; BRANDÃO, João; PAUL-MURPHY, Joanne; TULLY JUNIOR, Thomas N. Pharmacokinetics of single oral dose of pimobendan in Hispaniolan Amazon parrots (*Amazona ventralis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, Lawrence, v. 28, n. 2, p. 95–101, 2014. DOI: 10.1647/2012-061
20. HAMBROOK, L. E.; BENNETT, P. F. Effect of pimobendan on the clinical outcome and survival of cats with non-taurine responsive dilated cardiomyopathy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, London, v. 14, n. 4, p. 233–239, 2012.
21. HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2017.
22. HERMANS, Kathleen; GEERTS, Tom; CAUWERTS, Kristel; SALHEEN, M. T. S.; BAERT, Koen. Tolerability of pimobendan in the ferret (*Mustela putorius furo*). *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, Gent, v. 78, p. 53–55, 2008.
23. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO): Orientação sobre validação de métodos analíticos: INMETRO. Distrito Federal (BSB), 2020
24. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005. validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline 1–17.
25. JERICO, M. M. et al. Tratado de medicina interna de cães e gatos. Rio de Janeiro: Guanabara, 2015.
26. JULIA, Catherine A.; DAVIS, Jennifer L.; McKENZIE, Harold C.; COUNCIL-TROCHE, McAlister. Oral administration of pimobendan in healthy horses results in low plasma concentrations. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 86, e0302, 2025. DOI: 10.2460/ajvr.25.08.0302. Keene, B. W., et al. (2019). "ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33(3): 1127-1140.
27. KURIYA, Shin-ichiro; OHMORI, Shigeru; HINO, Mayuko; SENDA, Chiaki; SAKAI, Kenji; IGARASHI, Takashi; KITADA, Mitsukazu. Simple method for determination of the active metabolite of the inotropic drug pimobendan in rat liver microsomes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Amsterdam, v. 744, p. 189–193, 2000.
28. LEÃO, J.; WINCK, V. L.; PETZHOLD, C. L.; COLLARES, F. M.; ANDRADE, D. F. de; BECK, R. C. R. Pimobendan controlled release guar gum printlets: Tailoring drug doses for personalised veterinary medicines. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 655, p. 124017, 2024.
29. OZAWA, Sarah M.; SANCHEZ-MIGALLON GUZMAN, David; HAWKINS, Michelle G.; DIAO, Stephanie M.; MASRI, Acacia E.; GUNTHER-HARRINGTON, Catherine T.; KNYCH, Heather K. Pharmacokinetics of pimobendan following oral administration to New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 83, n. 4, p. 356–364, 2022. DOI: 10.2460/ajvr.21.03.0032.
30. PETRUS, Lilian Caram. Abordagem prática do tratamento da insuficiência cardíaca congestiva em cães. *Boletim Pet*, v. 3, p. 1–20, 2019.
31. REKIS, Toms et al. A Maze of Solid Solutions of Pimobendan Enantiomers: An Extraordinary Case of Polymorph and Solvate Diversity. *Crystal Growth & Design*, v. 18, p. 264-273, 2018.

32. Ribani, Marcelo & Bottoli, Carla Beatriz Grespan & Collins, Carol & Fontes, Jardim & Costa, Melo. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 27. 10.1590/S0100-40422004000500017.
33. SAENKLUB, Nakkawee; BOONYARATTANASOONTORN, Tussapon; KIJTAWORN RAT, Anusak; CHANTASART, Doungdaw. Preliminary Bioequivalence of an Oral Pimobendan Solution Formulation with Reference Solution Formulation in Beagle Dogs. *Veterinary Sciences*, v. 9, n. 3, p. 141, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9030141>
34. SANTOS, Maiara da S.; COLNAGO, Luiz Alberto. Validação de método quantitativo por RMN de ^1H para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v. 36, n. 2, p. 324-330, 2013.
35. Sousa, P., et al. (2019). "Pimobendan: Contexto Historico E Aplicacão Clínica Em CÃes." *Enciclopédia Biosfera* 16(29): 1195-1210.
36. YUAN, Si-Yu; YU, Hai-Bo; YANG, Zhen; QIN, Yi-Ping; REN, Ji-Hua; CHENG, Sheng-Tao; REN, Fang; LAW, Betty Yuen Kwan; WONG, Vincent Kam Wai; NG, Jerome P. L.; ZHOU, Yu-Jiao; HE, Xin; TAN, Ming; ZHANG, Zhen-Zhen; CHEN, Juan. Pimobendan inhibits HBV transcription and replication by suppressing HBV promoters activity. *Frontiers in Pharmacology*, Lausanne, v. 13, e837115, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.837115.