

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVATIVA PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ESTRADIOL E PROGESTERONA EM PREPARAÇÕES GALÊNICAS

José Alves Terceiro Neto (Aluno de Iniciação Científica Voluntária – ICV), Profa.Dra. Maria das Graças F. de Medeiros (Orientador, Departamento de Bioquímica e Farmacologia/UFPI), Prof. Mrs. André Luis Menezes Carvalho (Co-orientador, UFPI).

Introdução

A terapia hormonal auxilia no tratamento dos sintomas da menopausa. Um novo conceito de terapia hormonal vem se difundindo, que são “os hormônios bioidênticos” que são aqueles que equivalem na sua estrutura molecular àqueles produzidos pelo corpo humano, tais como, progesterona, testosterona, estradiol, podendo ser de origem vegetal (a maioria) ou de origem sintética (BOSARGE E FREEMAN, 2009). Existe, assim, a necessidade de obtenção de um método analítico rápido, simples e barato, para o controle de qualidade desses hormônios nas formulações galênicas. O método espectrofotométrico por derivadas no ultravioleta tem sido largamente empregado nas análises de controle de qualidade de preparações farmacêuticas, devido a sua rapidez e simplicidade. Esta técnica é uma alternativa para determinação de fármacos que sofrem interferência de placebo ou que apresentam valores baixos de absorvidade (MARTINS, 2007). De acordo com PASCHOAL *et. al.* (2003), o método de espectrofotometria de derivadas pode ser utilizado no doseamento simultâneo de dois princípios ativos em diversas formas farmacêuticas, sendo um método alternativo menos dispendioso e também eficiente, se comparada ao método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Metodologia

Foi proposto o desenvolvimento de um método por espectrofotometria derivativa na primeira ordem utilizando a metodologia *ratio-spectra* e em seguida a metodologia *zero-crossing*, para a quantificação simultânea de estradiol e progesterona em diferentes carreadores, mas a metodologia não apresentou-se satisfatória, com valores de recuperação significativamente diferentes dos valores esperados.

Entretanto, foram validados e comparados metodologias por espectrofotometria na ordem zero e espectrofotometria derivada na primeira ordem para a quantificação de estradiol carregado em microemulsão.

As metodologias foram validadas de acordo com a RE 899 de 2003 (BRASIL, 2003) avaliando-se os parâmetros especificidade e seletividade, linearidade e intervalo, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

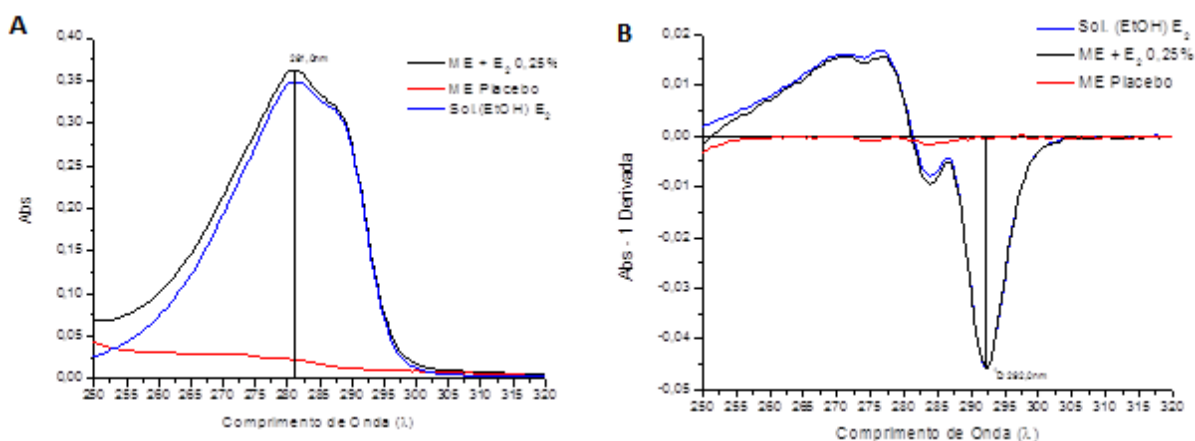
Resultados e Discussão

Especificidade e seletividade

A especificidade e seletividade dos métodos foi demonstrada pela sobreposição de espectros de varredura, 340 a 200nm, das amostras de Microemulsão placebo (ME Placebo), 160mg diluídos em 10 mL de etanol, Microemulsão com estradiol 0,25% (ME + E₂ 0,25%), 160mg diluídos em 10 mL de etanol, e solução etanólica de estradiol (Sol.(EtOH) E₂), na concentração de 40µg/mL.

A figura 1.0 demonstrada a especificidade e seletividade para espectrofotometria de ordem zero, com a sobreposição dos espectros de varredura. Percebe-se que o placebo possui alguma absorbância no comprimento de onda de interesse para a quantificação do estradiol (281,0nm), podendo ser responsável por um pequeno aumento no teor do estradiol quantificado.

Figura 1.0. Especificidade e Seletividade na Espectrofotometria de Ordem Zero e Derivada de 1ª Ordem.



Já a figura 1.0B demonstra a especificidade e seletividade para espectrofotometria derivada de 1ª ordem, com a sobreposição dos espectros de varredura. Percebe-se agora que no comprimento de onda de interesse para a quantificação do estradiol (¹D -292,0nm) a contribuição da absorbância do placebo é praticamente nula. Assim, espera-se uma melhora na exatidão do método após a aplicação da derivada de 1ª ordem, encontrando-se valores mais próximos do real na quantificação das microemulsões contendo estradiol.

Linearidade e intervalo

A curva de calibração do estradiol foi construída para a faixa de concentração de 4 a 112µg/mL, a qual foi feita em triplicata. A equação de regressão linear obtida foi $y=0,00847x+0,009396$ e $y=-0,00114x+0,000157$ (y = Absorbância; x = concentração em µg/mL), para os métodos de espectrofotometria de ordem zero e espectrofotometria derivada de 1ª ordem, respectivamente. Os coeficientes de correlação obtidos foram de $r^2= 0,99995$ e $r^2= 0,99996$, para os métodos de espectrofotometria de ordem zero e espectrofotometria derivada de 1ª ordem, respectivamente, demonstrando boa linearidade dos métodos.

Precisão

Os resultados obtidos no estudo de precisão intra e intercorridas, tanto para espectrofotometria de ordem zero quanto derivada de 1ª ordem, demonstraram a precisão dos métodos. Em ambos os ensaios foram observados valores de coeficiente de variação (CV) inferiores a 5%. (BRASIL, 2003).

Exatidão

Para o presente estudo foram investigados três níveis de concentração (32, 40 e 48 µg/mL) em triplicata, utilizando o ensaio do placebo contaminado.

O limite estabelecido do nível de recuperação aceitável para produtos farmacêuticos no Brasil está entre 80-120% (BRASIL, 2003). O ensaio de exatidão realizado para as diferentes

concentrações investigadas demonstrou a exatidão do método para a análise quantitativa do Estradiol a partir do sistema microemulsionado estudado. O nível de recuperação variou entre 103,30 a 105,67% para o método analítico por espectrofotometria de ordem zero, e 100,27% a 101,86% para o método analítico por espectrofotometria derivada de 1ª ordem. Assim, pode-se afirmar que o método por espectrofotometria derivada de 1ª ordem apresentou-se mais exato que o método de ordem zero, pois as análises apresentaram maior proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro.

Robustez

Neste estudo, a preparação das amostras foi feita através da dissolução da microemulsão em etanol por agitação manual do balão volumétrico, assim, dois parâmetros da metodologia foram alterados para a avaliação da robustez do método. O primeiro parâmetro foi a variação da marca do etanol (Vetec ou Dinâmica) utilizado como solvente, e o segundo parâmetro avaliado foi o tipo de agitação (Agitação manual ou com barra magnética) para a dissolução da amostra de microemulsão. Todas as análises foram realizadas em triplicata na concentração de 40 µg/mL.

A análise da robustez revelou que o método é seguro e não sofre alterações importantes com pequenas variações durante sua realização.

Conclusão

A espectrofotometria derivativa mostrou-se uma metodologia simples, rápida, facilmente aplicável e com alto poder resolutivo. A aplicação de derivada na primeira ordem nos espectros de varredura para quantificação de apenas um hormônio, estradiol, carregado em microemulsão, mostrou-se um método satisfatório para a quantificação do mesmo, apresentando resultados superiores aos da espectrofotometria de ordem zero, como um método mais específico, sensível (LD e LQ menores), e exato, com valores de recuperação mais próximos dos valores reais.

Referências

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RE. 899, 2003.
- BORSAGE, P. M., FREEMAN, S. Bioidentical Hormones, Compounding, and Evidence-Based Medicine: What Women's Health Practitioners Need to Know. **The Journal for Nurse Practitioners**. v.5, n. 6, p. 421-427, 2009.
- MARTINS, J. D. et. al. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007.
- PASCHOAL, L. R. et. al. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 39, n. 1, jan./mar. 2003.

Palavras-Chave: Espectrofotometria derivativa. Estradiol. Validação.