

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para doseamento simultâneo de quatro fármacos utilizados no tratamento de doenças reumatológicas

Development and analytical methodology validation for simultaneous determination to four drugs utilized in disorder rheumatics treatment

Leila Bastos Leal¹; Priscila Barros Vasconcelos²; Danilo César Galindo Bedor³; Carlos Eduardo Miranda de Sousa⁴ & Davi Pereira de Santana⁵

RESUMO – Desenvolveu-se e validou-se método analítico simples, rápido, específico e seletivo para quantificação de prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Empregou-se cromatografia em fase reversa com coluna Phenomenex Gemini[®] C 18 (150x4,6mm), à temperatura de 30°C e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato de sódio monobásico pH 3,00 e acetonitrila, a um fluxo de 2,0mL/min e temperatura do forno 40°C. Os analitos foram detectados por UV a 230nm. Os tempos de retenção para a prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam, foram 3.04, 3.40, 4.16 e 6.56 minutos respectivamente. Este método apresentou linearidade na faixa de concentração estudada, entre 15-35mg/mL ($R^2=0,994$ para prednisona, $R^2=0,991$ para ciclobenzaprina, $R^2=0,993$ para diacereína e $R^2=0,993$ para meloxicam), com limite de detecção e quantificação de 0,7481 μ g/mL e 0,4937 μ g/mL para a prednisona, de 1,6633 μ g/mL e 2,5202 μ g/mL para a ciclobenzaprina, de 1,5565 μ g/mL e 2,3583 μ g/mL para a diacereína e de 1,0923 μ g/mL e 1,6550 μ g/mL para o meloxicam. O método analítico inédito desenvolvido neste trabalho demonstrou especificidade, seletividade, linearidade, robustez, precisão e exatidão adequadas permitindo sua aplicação no doseamento dos fármacos em estudo.

PALAVRAS-CHAVE – Prednisona, ciclobenzaprina, diacereína, meloxicam, CLAE, farmácia magistral.

SUMMARY – A simple, rapid and specific high-performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed and validated to estimate prednisone, cyclobenzaprine, diacerein and meloxicam. Reversed phase chromatography was conducted using a Phenomenex Gemini[®] C 18 (150x4.6mm) column at 30°C and a mobile phase of acetonitrile and pH 3.0 phosphate buffer, at a flow rate of 2mL/min. Analytes were detected at 230nm. The retention time of prednisone, cyclobenzaprine, diacerein and meloxicam were 3.04, 3.40, 4.16 and 6.56 minutes, respectively. This method showed to be linear in the range of 15-35mg/mL ($R^2=0.994$ for prednisone, $R^2=0.991$ for cyclobenzaprine, $R^2=0.993$ for diacerein and $R^2=0.993$ for meloxicam); loq and lod in 0.7481 μ g/mL and 0.4937 μ g/mL to prednisone, 1.6633 μ g/mL and 2.5202 μ g/mL to cyclobenzaprine, 1.5565 μ g/mL and 2.3583 μ g/mL to diacerein and 1.0923 μ g/mL and 1.6550 μ g/mL to meloxicam. The analytical method showed suitable specificity, sensitivity, linearity, robusty, precision and accuracy.

KEYWORDS – Prednisone, cyclobenzaprine, diacerein, meloxicam, HPLC, magistral pharmacy.

INTRODUÇÃO

Diante do crescimento do setor magistral nos últimos anos, inúmeras discussões a respeito da qualidade dos seus produtos vêm sendo realizadas, principalmente em função da RDC n° 33, de maio de 2000 que instituiu as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias, seguido pela RDC n° 354, de dezembro de 2003 que dispõe sobre a manipulação de produtos farmacêuticos que contenham substâncias de baixo índice terapêutico, além da Consulta Pública n° 31, de abril de 2005 que trata do regulamento técnico sobre

boas práticas de manipulação de medicamentos para uso em humanos em farmácias (Ferreira, 2000; SOUZA; RDC n° 33/00; RDC n° 354/03; Consulta Pública n° 31/05)

No Brasil, a opção por fórmulas manipuladas vem crescendo, como alternativa aos medicamentos industrializados, uma vez que o medicamento manipulado é específico, diferenciado, possui qualidade e via de regra, um custo reduzido, em relação aos medicamentos industrializados (Batistuzzo, 2002).

Dentre os vários benefícios do medicamento manipulado, podemos destacar a possibilidade da associa-

Recebido em 08/01/2007

¹Farmacêutica, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPE; ²Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPE; ^{3,4}Farmacêuticas, mestrandas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPE;

⁵Farmacêutico, Professor do Departamento de Farmácia da UFPE, Doutor em Tecnologia de Medicamentos.

ção entre fármacos nas diversas classes terapêuticas, incluindo as classes dos medicamentos utilizados no tratamento de doenças reumatológicas (Ferreira, 2000). Dentre os fármacos mais prescritos para tratamento de doenças reumatológicas utilizados em associação, temos:

- Ciclobenzaprina (C), potente relaxante muscular que atua no sistema nervoso central à nível cerebral;
- Prednisona (P), glicocorticóide com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressivas;
- Meloxicam (M), um potente antiinflamatório mono-esteroidal, derivado dos oxicans e seletivo para isoenzima COX-2 e a
- Diacereína (D), utilizada no tratamento sintomático e nas manifestações da osteoartrite (Goodman, 2003; Korolkovas, 2001/2002; Craig, 2005).

No entanto, uma vez manipulados em diversas concentrações e associações, além da utilização de excipientes de forma não padronizada entre as farmácias magistrais, esses procedimentos poderiam levar a possíveis interações droga-droga e/ou droga-excipientes, de forma a minimizar o efeito desses medicamentos a curto ou longo prazo. Assim sendo, como passo inicial para a avaliação da estabilidade destas misturas, o objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para o doseamento simultâneo da prednisona, ciclobenzaprina, meloxicam e diacereína.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

- Prednisona e Ciclobenzaprina; ambos obtidos da DEG Importação de Produtos Químicos Ltda,
- Meloxicam e Diacereína ambos obtidos da Galema;
- ACN,
- MeOH,
- DMF grau UV/HPLC;
- Água purificada Milli-Q.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japan), composto por bomba LC-10ADVP, auto-injetor SIL-10A, uma unidade de degaseificação DGV – 10AL, for no CTO-10A VP, detector SPD-10^a VP UV e unidade de controle SCL 10 A-VP.

Os dados das análises foram adquiridos e processados no software CLASS-VP (v.6.2).

METODOLOGIA

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Phenomenex Gemini[®] C 18 (150x4,6 mm; 5µm). A fase móvel consistiu num gradiente de concentração da mistura de Tampão Fosfato de Sódio (pH=3) e acetonitrila (Figura 1) com fluxo de 2mL/min e o volume de injeção no sistema cromatográfico foi de 25µL. As amostras dos fármacos isolados prednisona (1), ciclobenzaprina (2), diacereína (3) e meloxicam (4) (Figura 2) foram preparadas em metanol. Após varredura com a utilização de detector com arranjo de diodo (DAD) no intervalo de 200,00 a 400,00nm, 230nm foi

selecionado como o melhor comprimento de onda para determinação simultânea dos fármacos.

A validação da metodologia analítica foi determinada segundo os critérios descritos na norma RE 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

A seletividade/especificidade do método foi realizada através da análise de cada um dos fármacos na concentração média da curva de calibração (25µg/mL).

A linearidade foi avaliada pela aplicação de soluções constituídas de diluições autênticas dos fármacos em metanol nas concentrações de 15 a 35µg/mL, que foram injetadas em triplicata no cromatógrafo, avaliando-se segundo o modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio-padrão da curva de calibração e coeficiente angular, usando o fator multiplicador apropriado conforme sugerido pela RE 899/03.

A precisão intermediária foi avaliada em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária. Para a avaliação da repetitividade, uma mesma concentração foi injetada em 6 replicatas pelo mesmo operador

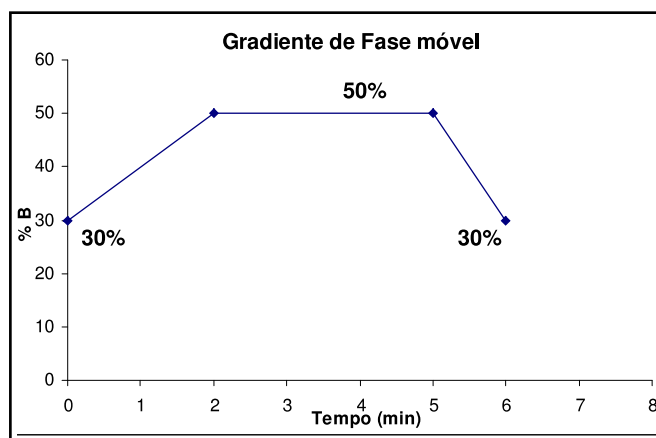


FIG. 1 - Gradiente de concentração da mistura de Tampão Fosfato de Sódio (pH=3) e acetonitrila.

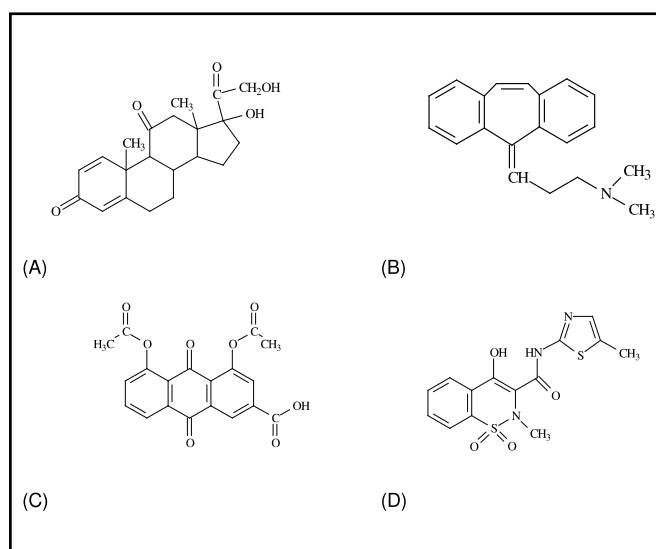


FIG. 2 - Estrutura química dos fármacos (A) prednisona, (B) ciclobenzaprina, (C) diacereína, (D) meloxicam.

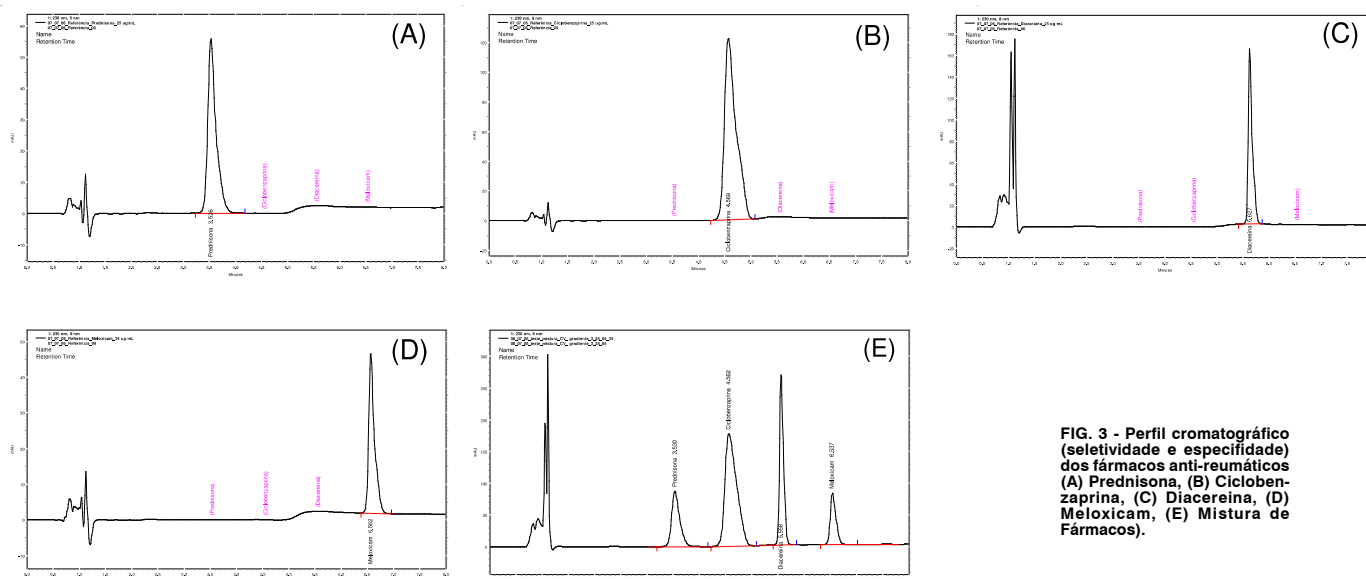


FIG. 3 - Perfil cromatográfico (seletividade e especificidade) dos fármacos anti-reumáticos (A) Prednisona, (B) Ciclobenzaprina, (C) Diacereína, (D) Meloxicam, (E) Mistura de Fármacos).

e os valores de área dos picos obtidos foram registrados e comparados avaliando a precisão do método através do desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%). A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre três injeções de uma mesma concentração realizada em dias diferentes e por analistas diferentes, inferindo-se os resultados através da análise de variância (ANOVA).

A exatidão do método para cada fármaco foi realizada em três replicatas nas concentrações 12.5µg/mL (50%), 25µg/mL (100%) e 67.5µg/mL (150%) e comparadas com o valor nominal através do teste t de Student.

O ensaio de robustez foi determinado a partir da variação dos seguintes parâmetros: lote da coluna cromatográfica e variação do fluxo de fase móvel e tempo de sonicação no preparo das amostras (5min, 10min, 15min).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método desenvolvido mostrou-se específico e seletivo para a prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam, obtendo-se boa separação entre os fármacos, com tempos de retenção de 3.54, 4.61, 5.56 e 6.54 minutos, respectivamente. (Figura 3).

A linearidade do método foi comprovada pela precisão e exatidão em cada um dos níveis de concentração da faixa estudada (15, 20, 25, 30 e 35µg/mL), e pelos coeficientes de correlação linear (R^2) de cada fármaco, os quais foram obtidos através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ($R^2=0,999$ para prednisona, $R^2=0,999$ para ciclobenzaprina, $R^2=0,999$ para diacereína e $R^2=0,999$ para meloxicam) (Tabela I).

Através da medida da linearidade, com os dados obtidos por área, foi calculado o limite de detecção e quantificação, onde se obteve os valores de 0,7481µg/mL e 0,4937µg/mL para a prednisona, 1,6633µg/mL e 2,5202µg/mL para a ciclobenzaprina, 1,5565µg/mL e 2,3583µg/mL para a diacereína e 1,0923µg/mL e 1,6550µg/mL para o meloxicam, respectivamente.

Os resultados da repetitividade de cada fármaco encontram-se na Tabela II e demonstram um coefi-

TABELA I
Precisão e exatidão da linearidade

Descrição Ativos	Concentração nominal (mg/mL)	Média (µg/mL) (± DP) (N = 3)	Precisão (%)	Exatidão (%)
Prednisona (A)	15	14,900 (± 0,153)	1,02	99,33
	20	20,130 (± 0,275)	1,36	100,65
	25	24,890 (± 0,078)	0,31	99,56
	30	30,060 (± 0,756)	2,52	100,20
	35	35,423 (± 0,217)	0,61	101,20
Ciclobenzaprina (B)	15	15,057 (± 0,496)	3,29	100,38
	20	20,100 (± 0,128)	0,64	100,50
	25	25,163 (± 0,707)	2,81	100,65
	30	30,230 (± 0,454)	1,50	100,76
	35	34,577 (± 0,199)	0,58	98,79
Diacereína (C)	15	15,297 (± 0,469)	3,07	101,98
	20	20,320 (± 0,196)	0,97	101,60
	25	24,580 (± 0,506)	2,06	98,32
	30	30,283 (± 0,835)	2,76	104,93
	35	35,200 (± 0,475)	1,35	100,57
Meloxicam (D)	15	15,217 (± 0,330)	2,17	101,44
	20	19,847 (± 0,310)	1,56	99,23
	25	24,747 (± 0,528)	2,13	98,98
	30	20,280 (± 0,310)	1,03	100,93
	35	34,900 (± 0,480)	1,38	99,71

ciente de variação inferior ao especificado pela Resolução RE n° 899 vigente, que especifica o limite do coeficiente de variância de 5,0%.

Os resultados de precisão intermediária de cada fármaco (prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam) demonstrados na Tabela III, avaliados através da ANOVA demonstram não haver diferença significativa ao nível de 95% de confiança entre todos os pares de valores.

TABELA II
Avaliação da repetitividade dos fármacos prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam

Amostra	Concentração			
	Prednisona	Ciclobenzaprina	Diacereína	Meloxicam
1	24,55	24,65	24,96	24,98
2	24,96	25,60	24,36	25,02
3	21,04	24,97	25,01	25,45
4	24,59	25,06	25,36	25,64
5	24,55	24,89	24,85	24,86
6	24,69	25,84	24,65	24,62
MÉDIA	24,56	25,17	24,86	25,10
DESPAD	0,3	0,5	0,3	0,3
CV%	1,26	1,81	1,35	1,38

Os resultados da Tabela IV demonstram que os percentuais de recuperação nas três concentrações analisadas estão todas dentro dos limites para cada fármaco. A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações diferentes (12,5, 25, 67,5µg/mL).

A análise pelo método t de Student mostrou que os resultados obtidos experimentalmente não diferem estatisticamente do valor nominal, não havendo diferença significativa ao nível de 95% de confiança para cada fármaco.

Para os dois lotes estudados, de colunas, verificou-se através do método t de Student que não há diferença estatisticamente significativa com um nível de 95% de confiança entre a média das concentrações.

O método de doseamento dos fármacos metronidazol é robusto, pois, de acordo com os resultados obtidos, não apresentou diferença relevante nos parâmetros avaliados. Adotou-se, porém, como tempo de agitação, apenas 5 min, uma vez que os outros testados não mostraram variação significativa.

CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um método inédito, sensível, seletivo, preciso, econômico, reprodutível, robusto e linear na faixa estudada de 15 a 35µg/mL, para detecção e quantificação simultânea de 4 ativos com estruturas químicas diferentes utilizados em conjunto no tratamento de doenças reumatológicas.

Foi utilizada uma coluna Phenomenex Gemini® C 18 (150x4,6mm, 5µm) e gradiente de fase móvel constituída pela mistura de Tampão Fosfato de Sódio (pH 3) e acetonitrila (CH₃CN), com fluxo de 2,0mL/min, detecção em UV no comprimento de onda de 230nm.

TABELA III
Avaliação da precisão intermediária da prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam

Ativos	Prednisona			Meloxicam			Diacereína			Ciclobenzaprina			
	Média (±DP) (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Média (±DP) (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Média (±DP) (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Média (±DP) (n=6)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
A - 1	DIA 1	25,06(± 0,23)	0,92	100,24	25,02(± 0,60)	0,36	100,08	24,21(± 0,97)	4,01	96,84	25,15(± 0,83)	3,30	100,60
	DIA 2	25,11 (± 0,16)	0,64	100,44	25,44 (± 0,46)	0,21	101,76	24,66 (± 0,21)	0,89	98,64	25,05 (± 0,45)	1,79	100,20
A - 2	DIA 3	25,10 (± 0,10)	0,40	100,40	25,38 (± 0,56)	0,32	101,52	24,69 (± 0,22)	0,91	98,76	25,80 (± 0,70)	2,84	99,20
	DIA 4	25,05 (± 0,31)	1,24	100,20	25,13 (± 0,42)	0,27	100,52	24,61 (± 0,26)	1,10	98,44	24,99 (± 0,29)	1,16	99,96

TABELA IV
Avaliação da exatidão da prednisona, ciclobenzaprina, diacereína e meloxicam

Ativos	Prednisona		Meloxicam		Diacereína		Ciclobenzaprina	
	Média(±DP) (n=6)	Exatidão (%)	Média(±DP) (n=6)	Exatidão (%)	Média (±DP) (n=6)	Exatidão (%)	Média(±DP) (n=6)	Exatidão (%)
50% (12,5µg/mL)	12,42(± 0,14)	103,50	12,54(± 0,34)	100,32	12,57(± 0,37)	100,53	12,38(± 0,37)	99,04
100% (25µg/mL)	24,89(± 0,46)	99,56	25,44(± 0,38)	101,76	25,27(± 0,42)	101,08	25,23(± 0,47)	100,92
150% (67,5µg/mL)	37,06 (± 0,65)	98,82	37,48(± 0,28)	99,93	37,40 (± 0,34)	99,74	37,17 (± 0,52)	99,12

Este novo método será utilizado para determinação simultânea dos referidos fármacos em misturas binárias, ternárias, quaternárias.

REFERÊNCIAS

1. Batistuzzo, J.A.O., Itaya, M., Eto, Y. Formulário Médio-Farmacêutico. 2a. ed. São Paulo: Tecnopress, 2002.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 31, de 15 de abril de 2005. DOU - Diário Oficial da União, 18 de abril de 2005. Disponível <http://www.anfarmag.org.br/integra.php?codigo=323>. Acesso em: 20/09/2006.
3. Ferreira, A. O Guia Prático de Farmácia Magistral. 2a. ed. Juiz de Fora, 2000.
4. Craig, Charles, R; Stitze, Robert, E. Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
5. Goodman, Louis Sanford; Gilman, Alfred Goodman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10a. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 808-809.
6. Korolkovas, A., Franca, F. F. C. Dicionário Terapêutico. São Paulo: Guanabara, 2001/2002.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos. Resolução RDC nº 33, de 19 de abril de 2000. DOU - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de abril de 2000. Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=20015&word=>. Acesso em: 17/09/2006.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Permite a manipulação de produtos farmacêuticos em todas as formas farmacêuticas de uso interno que contenham substâncias de baixo índice terapêutico, aos estabelecimentos farmacêuticos que cumprirem as condições especificadas. Resolução RDC nº 354, de 18 de dezembro de 2003. DOU - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de dezembro de 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9096&word=>. Acesso em: 20/09/2006.
9. Souza, H. G. Manipulação e saúde pública. Anfarmag, ano XI nº 55, Junho/Julho 2005.
10. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. DOU - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9096&word=>. Acesso em: 20/09/2006.

Endereço para correspondência

Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético - NUDFAC -
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco,
Rua Prof. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária,
50070-520 - Recife - PE

E-mails: Leila Bastos Leal
leilaleal2@yahoo.com.br
Davi Pereira de Santana
d_santana@yahoo.com.br