

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE DEXAMETASONA EM COMPRIMIDOS PARA USO HUMANO E VETERINÁRIO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE FOTODIODOS

MARQUES, Wesley Queiroz¹; RESENDE, Erika Crispim²

¹Estudante do curso de Licenciatura em Química, PIVIC, Instituto Federal Goiano – Câmpus Iporá. E-mail: wesley.marques@ifgoiano.edu.br; ²Professora do Instituto Federal Goiano – Câmpus Iporá.

RESUMO: A dexametasona (DEX) é um esteroide que apresenta atividade anti-inflamatória e em função de seu amplo uso e dos seus efeitos adversos, vem sendo bastante estudada e diferentes métodos analíticos tem sido desenvolvidos. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método analítico para doseamento de dexametasona em comprimidos por CLAE. As condições cromatográficas foram: MeOH e água (65:35, v/v); 1,0mL/min; 40°C; coluna Shim Pack[®] VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5,0µm) e pré-coluna ODS (10 x 4,6 mm; 5,0 µm). A DEX apresentou T_R próximo a 5 min, assimetria entre 0,8 e 1,3 e NPT maior que 2000. O método não apresentou interferências no T_R do fármaco quando comparadas às análises do padrão. A precisão apresentou DPRs menores que 1%. O método foi linear na faixa de 32 a 48 µg/mL. O LD foi de 0,073 µg/mL e de 2,448 µg/mL para o LQ. Para os comprimidos de uso humano as recuperações foram de: 83,43% ($\pm 1,18$); 100,46% ($\pm 0,16$) e 120,85% ($\pm 0,18$) e para de uso veterinário: 75,41% ($\pm 0,17$); 101,38% ($\pm 2,52$) e 120,60% ($\pm 0,09$). O método mostrou-se robusto frente às diferentes condições testadas.

Palavras-chave: dexametasona, cromatografia, comprimidos.

INTRODUÇÃO

A dexametasona (DEX) é um esteroide derivado do núcleo ciclopentanoidrofenantreno, apresenta atividade anti-inflamatória, sendo o de maior potência dentre os glicorticoides de ação sistêmica (FERRONY et al., 2012). Nos medicamentos para uso humano está presente em várias formas de apresentação e em associação com outros fármacos. No uso veterinário é indicado para tratamento de reumatismo, alergias, dermatites inespecíficas, incluindo: eczemas; tratamento de inflamações variadas como artrites; parestesia posterior canina (KOROLKOVAS, 2001).

A dexametasona e betametasona são amplamente utilizadas na pecuária e na produção de animais aquáticos como promotores de crescimento. Entretanto esta prática é proibida nos Estados Unidos, na China e na Europa por causarem efeitos adversos sobre a saúde humana, incluindo obesidade, hipertensão e osteoporose (CUN et al., 2010; HUETOS et al., 1999; KAKLAMANOS et al., 2009).

A dexametasona, em função de seu amplo uso e dos seus efeitos adversos, vem sendo bastante estudada e diferentes métodos analíticos tem sido desenvolvidos para a determinação em medicamentos e na detecção de resíduos em matrizes biológicas (MI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

Dentro deste contexto, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método analítico para doseamento de dexametasona em comprimidos por CLAE atendendo a RE n° 899/2003 da ANVISA (ANVISA, 2003).

METODOLOGIA

Durante o desenvolvimento analítico, diferentes misturas de fase móvel foram testadas. Para a validação utilizou-se: MeOH e água (65:35, v/v); 1,0mL/min; 40°C; CLAE-PDA (Shimadzu[®]) equipado com bomba quaternária LC-20AT, forno CTO-20A, autoinjeter SIL-20AHT, detector DAD SPD-M20A, coluna Shim Pack VP-ODS (150 x 4,6 mm; 5,0µm-Shimadzu[®]), pré-coluna ODS (10 x 4,6 mm; 5,0 µm-Shimadzu[®]) e programa LC-Solutiton[®].

A solução estoque de dexametasona foi preparada a partir de um padrão (lote: SZBB118XV, 99,5%, Sigma Aldrich[®]) em metanol (1mg/mL).

Para a preparação das amostras, o peso médio de 20 comprimidos foi determinado. Uma massa do pó dos comprimidos equivalente a 4mg de dexametasona foi utilizada para a preparação das amostras. Todas as soluções foram filtradas em membrana de PTFE de 0,2 µm antes das injeções no cromatógrafo.

Durante o desenvolvimento analítico, vários parâmetros foram avaliados dentre eles o “*System Suitability*” que é a conformidade do sistema em gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis. Para isto foram avaliados os tempos de retenção (T_R), as assimetrias dos picos e os números de pratos teóricos (NPT). Em relação à validação, a seletividade do método foi realizada através de comparação entre soluções de amostras e as soluções padrão utilizando-se o detector de fotodiodo (PDA=*Photo Diodo Array*) que permitiu verificar a pureza dos picos.

A linearidade do método foi verificada a partir de três curvas de calibração a partir de diluições da solução padrão.

A precisão foi avaliada em dois níveis, repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) em dias consecutivos.

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) serão estimados com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva de calibração do padrão através das equações $LQ = DP \times 10/IC$ e $LD = DP \times 3/IC$. (DP= desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração e IC= média dos coeficientes angulares das respectivas curvas).

A exatidão foi determinada através do cálculo de porcentagem de recuperação das amostras em relação ao padrão.

A robustez foi verificada através de alterações na proporção de fase móvel: MeOH: água (65:35); (68,5:31,5) e (61,5:38,5); temperatura do forno: (40, 44 e 36°C); e razão do fluxo da fase móvel: (1,00; 0,90 e 1,10 mL/min).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No método selecionado para a validação a DEX apresentou T_R próximo a 5 min, assimetria entre 0,8 e 1,3 e NPT maior que 2000.

O método não apresentou interferências no tempo de retenção do fármaco quando comparadas às análises do padrão. As purezas dos picos ficaram acima de 99%.

A precisão entre as injeções está apresentada na tabela abaixo. Verifica-se que os DPRs foram menores que 1%.

Tabela 1: Resultados da precisão para comprimidos de dexametasona de uso humano e veterinário.

Parâmetros	Comprimido do uso humano.		
	Precisão interdia	Precisão intradia	Precisão intradia
TR(±DPR)	4,927 (± 0,0224)	4,905 (± 0,1745)	4,880 (± 0,1081)
Área(±DPR)	634679,83 (±0,1391)	654047,667 (±0,0914)	653309,67 (±0,1256)
Assimetria(±DPR)	1,185 (±0,1850)	1,183 (±0,0934)	1,175 (±0,1169)
Parâmetros	Comprimido de uso veterinário.		
	Precisão interdia	Precisão intradia	Precisão intradia

	Precisão interdia	Precisão intradia	Precisão intradia
TR(±DPR)	4,926 (± 0,0423)	4,896 (± 0,0606)	4,876 (± 0,0474)
Área(±DPR)	663524,8 (±0,1210)	655955,83 (±0,1553)	656218,0 (±0,1026)
Assimetria(±DPR)	1,182 (±0,1596)	1,181 (±0,1027)	1,176 (±0,0951)

Através da medida das curvas do padrão com de concentrações variando de 30 a 10% do valor de 40µg/mL os limites obtidos foram: 0,073 µg/mL para o LD e de 2,448 µg/mL para o LQ.

O método foi linear na faixa de estudo de 32 a 48 µg/mL para dados medidos em área. As equações obtidas para as curvas de calibração foram: $y = 6543,9933x - 5946,4667$; $R^2 = 0,9989$; $y = 6364,9560x - 2383,2143$; $R^2 = 0,9932$; $y = 7360,5067x - 20637,6667$; $R^2 = 0,9910$.

Na exatidão foram verificadas as recuperações das amostras nas concentrações de 80, 100 e 120% (32; 40 e 48µg/mL). Para os comprimidos de uso humano as recuperações foram de: 83,43% (±1,18); 100,46% (±0,16) e 120,85% (±0,18) e para de uso veterinário: 75,41% (±0,17); 101,38% (±2,52) e 120,60% (±0,09).

O método mostrou ser robusto frente às diferentes condições testadas. Os DPRs entre a s áreas das variações dos parâmetros foram menor que 5%, o NPT foi maior que 2000 e a assimetria dos picos foi menor que 1,3.

CONCLUSÕES

O método desenvolvido foi considerado simples, rápido, apresentando confiabilidade e segurança necessárias em procedimentos analíticos. Os parâmetros verificados garantiram robustez, exatidão, além de precisão e seletividade para a quantificação de comprimidos de dexametasona para uso humano e veterinário.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, RE n° 899, 29/05/2003, **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, Brasil, 2003.
- CUN, L.; YINLIANG, W.; TING, Y.; YAN, Z. J. *Chromatogr. A*, v. 1217, p.411–414, 2010.
- FERRONY, D.; ROGGIA, I.; ALVES, M. P. *Disc. Scientia*. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 51-62, 2012.
- KAKLAMANOS, G.; THEODORIDIS, G.; DABALIS, T. J. *Chromatogr. A*, v. 1216, p. 8072–8079, 2009.
- KOROLKOVAS, A.; DE FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- OLIVEIRA, T. M. B.F.; RIBEIRO, F. W. P.; SOARES, J. E.S.; LIMA-NETO, P. CORREIA, A. N. *Anal. Biochem.*, v. 413, p. 148–156, 2011.