

**ADEQUABILIDADE DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ACETATO DE DEXAMETASONA IFA E  
CREME POR ESPECTOFOTOMETRIA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICIÊNCIA**

*Suitability of Analytical Methodology for Measurement of Content of Acetate  
Dexamethasone IFA and cream by Spectrophotometry and High Performance Liquid  
Chromatography*

MOAB ALVES DA LUZ<sup>1</sup>

SEVERINO GRANGEIRO JÚNIOR<sup>2</sup>

MARCOS ANDRÉ CUNHA DE OLIVEIRA<sup>3</sup>

AMANDA DAMASCENO LEÃO<sup>4</sup>

Autor Responsável: M.A.Luz. E-mail: moab.luz@bol.com.br

1. Acadêmico de graduação do curso de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS/IMIP).
2. Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco; Farmacêutico Industrial no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco; Tutor da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS/IMIP).
3. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco; Farmacêutico Industrial no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco; Tutor da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS/IMIP).
4. Farmacêutica pela Universidade Federal da Paraíba; Mestranda pela Universidade Federal de Pernambuco.

## **RESUMO**

A finalidade da adequação dos métodos é comprovar que as análises empregadas nos testes de controle de qualidade dos medicamentos são seguras e eficazes. Baseado neste aspecto, o presente trabalho realizou a adequação do método para a quantificação do Acetato de Dexametasona no insumo farmacêutico ativo e produto acabado. Para isto foram utilizadas as metodologias da Farmacopeia Brasileira: determinação de teor do insumo farmacêutico ativo por espectrofotometria e da British Pharmacopeia: determinação de teor de Acetato de Dexametasona produto acabado por HPLC. Desta forma por apresentar linearidade, especificidade e precisão as metodologias farmacopéicas foram consideradas validadas.

Palavras-chave: DEXAMETASONA, adequação de metodologia, LAFEPE.

## **ABSTRACT**

The purpose of the adequacy of the methods is to prove that the analyzes used in drug quality control tests are safe and effective. Based on this aspect, this paper carried out the suitability of the method for the quantification of dexamethasone acetate in the active pharmaceutical ingredient and finished product. For this the methodologies of the Brazilian Pharmacopoeia: determination of the active pharmaceutical ingredient content by spectrophotometry and British Pharmacopeia: Determination of Dexamethasone Acetate finished product by HPLC content. Thus to present linearity, specificity and accuracy the pharmacopoeial methodologies were considered validated.

Keywords: DEXAMETHASONE, adequacy methodology, LAFEPE.

## INTRODUÇÃO

Boas Práticas de Fabricação (BPF) é a parte da garantia da qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. A fim de atingir os objetivos de forma confiável, é imprescindível um sistema da Garantia da Qualidade totalmente estruturado e corretamente implantado que incorpore as BPF. (ANVISA, 2010).<sup>1</sup> O fabricante é o responsável pela qualidade dos medicamentos fabricados, por assegurar a inexistência de riscos que comprometam a segurança, qualidade ou eficácia do medicamento (ANVISA, 2010).<sup>1</sup>

Neste contexto, o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), tem a qualidade de seus medicamentos no centro de suas preocupações, realizando periodicamente um conjunto de ações para atestar que todas as metodologias farmacopéicas empregadas para as análises no controle da qualidade seguem rigorosas normas de BPF. Assim investe na modernização de suas rotinas, equipamentos e instalações ao dotar de um parque industrial com alta tecnologia.

Sendoo setor de controle de qualidade a pedra fundamental nesse processo, este setor, promove o cumprimento de todas as etapas necessárias nas avaliações sobre as matérias primas, produtos intermediários e produtos a granel, bem como outros controles em processo, calibrações, validações e adequações de método. Conferindo a estes os parâmetros exigidos e de acordo com a RE 899/2003, como precisão, linearidade e repetibilidade dos métodos empregados, atribuindo assim resultados confiáveis na qualidade final do produto.<sup>2</sup>

Um dos muitos produtos produzidos pelo LAFEPE e que sofre todo esse processo é o Creme de Acetato de Acetato de Dexametasona, um pró-fármaco com potente ação anti-inflamatória difundida, pertencente à classe dos glicocorticoides. Desta forma, a presente monografia deu sua contribuição para avaliação da metodologia empregada para a adequação do método analítico na quantificação de Acetato de Dexametasona (IFA) no produto acabado Dexametasona Creme.

Este estudo tem como objetivo apresentar os resultados da adequação da metodologia analítica para a quantificação de Acetato de Dexametasona IFA e creme, que neste caso, seguiu os parâmetros preconizados na RE 899/2003<sup>2</sup> da ANVISA, foram reproduzidas algumas análises para na avaliação da metodologia como: especificidade, linearidade e precisão para garantir a adequação do método aqui relatado, reproduzidos segundo a Farmacopeia Brasileira e British Pharmacopeia.<sup>3</sup>

## **EMBASAMENTO TEÓRICO**

A validação visa garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretações sobre a amostra. Segundo a Farmacopeia Americana (USP 35), validação é o processo que fornece uma evidência documentada, através de estudos de laboratório, de que as características de desempenho ou parâmetros analíticos do método alcançam os requisitos para aplicações analíticas pretendidas.<sup>4</sup>

Os métodos de controle de qualidade devem ser validados antes de serem

adotados na rotina, levando-se em consideração as instalações e os equipamentos disponíveis, devem ser realizadas revisões periódicas das especificações para que sejam atualizadas conforme as novas edições da farmacopéia nacional ou outros compêndios oficiais. As farmacopéias, os padrões de referência, as referências de espectrometria e outros materiais de referência necessários devem estar à disposição no laboratório de controle de qualidade. RDC 17/2010 (ANVISA)<sup>1</sup>

De acordo com a resolução RE n° 899/2003 (ANVISA)<sup>2</sup>, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Este será considerado validado, desde que sejam avaliados os parâmetros especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez assegurando a confiabilidade dos resultados.

Para garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar calibrados e os analistas devem ser qualificados e treinados. Devem também se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente.

(RE 899/2003)<sup>2</sup>

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a análise quantitativa de misturas e possibilita verificar possíveis produtos de degradação, sendo, portanto, amplamente utilizado no controle de qualidade de fármacos e medicamentos, por apresentar separadamente todos os compostos. Segundo Watson (2005)<sup>5</sup>, a combinação CLAE monitorada pela detecção ultravioleta origina métodos precisos, exatos e específicos.

Os parâmetros e os testes a serem realizados, estão relacionados na RE 899/2003

e são classificados de acordo com o quadro 1 e 2:

Quadro 1. Categoria segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Quadro 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade:

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

O método de quantificação a ser utilizado na avaliação deve cumprir com os parâmetros de validação (MALESUIK, 2006)<sup>6</sup>. Seguindo a RE 899, alguns dos parâmetros referentes à categoria I foram analisados. Neste caso, por se enquadrar na categoria I, a adequação do método para quantificação do Acetato de Dexametasona IFA e creme, foram reproduzidos os seguintes ensaios: precisão, especificidade e linearidade.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Podendo ser avaliada em três níveis.

- Repetibilidade (precisão intra-ensaio) – consiste na determinação de uma amostra repetidas vezes sob as mesmas condições de teste em um curto intervalo de tempo, com mesmo analista, mesma instrumentação, com no mínimo 6 determinações 100% da concentração.
- Precisão intermediária - concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
- Reprodutibilidade – refere-se à precisão entre laboratórios.

Segundo a Resolução vigente, a precisão de um método analítico deve ser expressa em desvio padrão ou desvio padrão relativa (coeficiente de variação - CV%), segundo a equação 1:

$$\text{Precisão (CV\%)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com o método empregado, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (RE 899/ANVISA)<sup>2</sup>.

## **Especificidade/Seletividade**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, podem-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo, metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado).



## **Linearidade**

A linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa. Segundo Brittain (2008)<sup>7</sup>, a linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação, sendo que, a linearidade está relacionada com a variação da inclinação da reta dos mínimos quadrados.

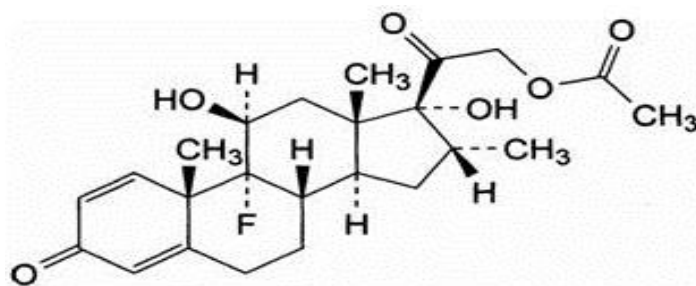
Desta forma foram verificados parâmetros da adequação da metodologia analítica em relação ao teor do Acetato de Dexametasona insumo farmacêutico ativo (IFA) e forma farmacêutica creme, demonstrando que os resultados das análises executadas permitiram uma avaliação específica da qualidade do produto, assegurando a implantação do método escolhido.

Prepararam-se soluções mãe em triplicata. Cada solução mãe deve originar uma curva de linearidade. As três curvas serão tratadas por Análise de Variância (ANOVA), para obtenção da equação de reta. Será verificado se a curva é linear e também se não há falta de ajuste. Desta forma, leva-se em consideração o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) deve ser = 0,99.

A Dexametasona é um esteroide, derivado do núcleo ciclopentanoidrofenantreno que apresenta atividade glicocorticoide e antiinflamatória. Os efeitos antiinflamatórios são decorrentes da estimulação da biossíntese da proteína lipomodulina que, por sua vez, inibe a ação enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub>. Deste modo é impedida a liberação de ácido araquidônico e, em consequência, não se forma seus metabolitos, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos que são mediadores da inflamação.(Korolkovas,2001).

Característica química do Acetato de Dexametasona:

figura 1. Estrutura química do Acetato de Dexametasona.



Fonte: <https://www.google.com.br/search?q=acetato+de+dexametasona+estrutura>

Quadro 3. Propriedades físico-químicas da Dexametasona.

Fórmula Molecular	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> F <sub>05</sub>
Peso Molecular	392,462g/mol
Ponto de Fusão	262°C
Solubilidade em Água(25°C)	89 mg/L
Nome IUPAC	9-fluoro-11β,17,21-triidroxi-16α-metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona

Fonte: Farmacopeia brasileira 5ª edição.

## 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### ANÁLISES POR ESPECTOFOTOMETRIA

Quadro 4. Equipamentos e instrumentos calibrados utilizados na análise por espectrofotometria.

<b>NOME</b>	<b>TAG</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>MODELO/ CAPACIDADE MÁXIMA</b>	<b>Nº DA CALIBRAÇÃO</b>
Balança	32BAL005	SARTORIUS	CP225D MAX. 220g	14/02/14
Espectrofotômetro	32esp001	SHIMADZU®	-	17/04/13
Pipeta	-	PYREX®	1,0ml	-
Balão Volumétrico	-	PYREX®	25 50 e 100 ml's	-
Alcoômetro	-	INCOTERN®	100°C	-
Termômetro	-	INCOTERN®	250°C	-
Proveta	-	PYREX®	1000 ml	-
Ultrassom	32SON001	UNIQUE®	-	07/13

## 1.1 Substância Química de Referência, amostras e reagentes.

### 1.1.2 Substância Química de Referência

A substância química de referência (SQR) é o padrão secundário de Acetato de Dexametasona.

### 1.1.3 Amostras e reagentes

Quadro 5. Substâncias e solventes utilizados na análise por espectrofotometria.

<b>NOME</b>	<b>LOTE</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>DATA DE VALIDADE</b>
Acetato de Dexametasona padrão secundário	16729	LAFEPE	03/15
Acetato de Dexametasona IFA	17357	Lepuge Insumos Farmacêuticos	26/04/16
Álcool Etilico	171396	SYNTH	28/08/16

### 1.1.4 Condições Espectrofotométricas

Quadro 6. Faixa de comprimento de onda utilizada na análise por espectrofotometria.

<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
<b>Solvente</b>	Álcool Etilico
<b>Detector</b>	UV 238,5 nm

## 2 Preparo das soluções

### 2.1 Preparo do Solvente

Preparo do Álcool à 96° GLP: foi medido o volume referente a 1,0L de álcool SR de 99,5°GLP, utilizando-se da proveta e aferido com o auxílio do alcoômetro o grau do álcool etílico, foi aferido a temperatura e efetuado os cálculos através do uso da tabua da força real dos líquidos espirituosos.

#### 2.1.1 Preparo da Solução Padrão de Dexametasona

Foi pesado com exatidão em triplicata, 50mg de Acetato de Dexametasona e transferido para balão volumétrico de 100 ml, depois sonicado no aparelho de ultrassom por 15 min., completou-se o volume com solvente e foi homogeneizado.

### 3linearidade

A Linearidade foi realizada a partir de três soluções mãe autênticas com a concentração de 500µg/ml, sendo as amostras preparadas da seguinte forma:

Tabela 1. Concentrações das soluções para linearidade na análise por espectrofotometria.

Concentração %	P1	P2	P3	Conc. final
50	1,0ml/50ml	1,0ml/50ml	1,0ml/50ml	10µg/ml
80	0,8ml/25ml	0,8ml/25ml	0,8ml/25ml	16µg/ml
90	0,9ml/25ml	0,9ml/25ml	0,9ml/25ml	18µg/ml
100	1,0ml/25ml	1,0ml/25ml	1,0ml/25ml	20µg/ml
110	1,1ml/25ml	1,1ml/25ml	1,1ml/25ml	22µg/ml
120	1,2ml/25ml	1,2ml/25ml	1,2ml/25ml	24µg/ml
150	3,0ml/50ml	3,0ml/50ml	3,0ml/50ml	30µg/ml

## **4 Repetibilidade**

### **4.1 Preparo das Soluções Padrão do Acetato de Dexametasona**

Em quadruplicata, foi pesado com exatidão, 50mg de Acetato de Dexametasona Padrão Secundário, diluídos com Álcool e transferido para balão volumétrico de 50 ml, sonicado no aparelho de ultrassom por 15 min., completado o volume com Álcool e homogeneizado. Retirado desta solução uma alíquota de 1,0ml e transferido para balão volumétrico de 50,0ml. .Concentração final das soluções 20µg/ml. Leitura realizada posteriormente no espectrofotômetro.

### **4.2 Preparo das Soluções de Acetato de Dexametasona Matéria prima para Precisão**

A etapa foi realizada por dois analistas, o primeiro, pesou com exatidão, em sextuplicata, 50,0mg de Acetato de Dexametasona Matéria prima, e transferiu para balão volumétrico de 50,0ml, sonicado no aparelho de ultrassom por 15 min., completado o volume com solvente e homogeneizado. Foi retirada desta solução uma alíquota de 1,0ml e transferida para balão volumétrico de 50,0ml. Concentração final das soluções 20µg/ml.

O segundo analista, pesou com exatidão, em quadruplicata, 50mg de Acetato de Dexametasona Matéria prima, e transferiu para balão volumétrico de 50 ml, sonicado no aparelho de ultrassom por 15 min., completado o volume com solvente e homogeneizado. Foi retirada desta solução uma alíquota de 1,0ml e transferida para balão volumétrico de 50,0ml. Concentração final das soluções 20µg/ml. Leitura realizada posteriormente no espectrofotômetro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5 Resultados da Precisão

#### 5.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada utilizando-se seis amostras (n=6) a 100% sob as mesmas condições de teste, em um curto intervalo de tempo preparadas pelo mesmo analista, seguem os resultados da repetibilidade do Acetato de Dexametasona matéria prima.

Tabela 2. Resultado da repetibilidade.

Amostra	% Acetato de Dexametasona
1	97,6
2	99,1
3	100,7
4	99,2
5	96,4
6	99,4
Media	98,7392
DP	1,5098
CV%	1,5291

Foi observado que a repetibilidade atendeu as especificações estabelecidas visto que o coeficiente de variação 1,5291 para Acetato de Dexametasona esta dentro da faixa especificada nas diretrizes da RE 899. (até 5%).

#### 5.1.1.2 Precisão intermediária

Para a precisão intermediária, as análises (preparo das amostras) foram preparadas no mesmo laboratório e com as mesmas condições da repetibilidade, mas realizadas em dias diferentes e por analistas distintos.

O segundo analista preparou 04 amostras (n=4) a 100%. Na tabela 02 e 03, seguem os resultados da precisão intermediária e teste t Student respectivamente.

Tabela 3. Resultado da precisão intermediária por espectrofotometria.

Amostra	% Acetato de Dexametasona	
	Analista-1	Analista-2
1	100,7	97,24
2	99,2	96,58
3	96,4	99,19
4	99,4	98,66
Media	98,9266	97,9171
DP	1,8175	1,2110
CV%	1,8372	1,2368

Tabela 4. Resultado das amostras presumindo variâncias equivalentes para Acetato de Dexametasona

Analistas	Analista-1	Analista-2
<b>Media</b>	98,93	97,92
<b>Variância</b>	3,303	1,467
<b>Star T</b>	0,9244	
<b>P(T&lt;=t)</b>	0,3909	
<b>bi-caudal</b>		
<b>t crítico</b>	2,4469	
<b>bi-caudal</b>		

Estatisticamente, para a repetibilidade foi apresentado como resultado um CV inferior a 5% e com 95% de confiança. Portanto, pode ser concluído que o método foi preciso e a precisão intermediária após aplicação do teste t Student, apresentou t calculado 0,9244 para analista 1 e 2 respectivamente e este foi menor que o t tabelado 2,4469, com 95% de confiança. Portanto, pode ser concluído que o método foi preciso.



## 5.2 Resultados da Especificidade

A especificidade foi comprovada através das análises realizadas com a utilização frente ao solvente (Álcool Etilico 96°). Foi verificado que durante a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 238,5nm não houve interferência na absorbância detecção referente ao Acetato de Dexametasona.

## 5.3 Resultados da Linearidade

A linearidade da resposta do detector do espectrofotômetro para este método foi determinada analisando 07 diferentes concentrações (50; 80; 90; 100; 110; 120 e 150%) fornecendo os resultados (equação da reta, R) do insumo farmacêutico ativo Acetato de Dexametasona.

Figura 2. Gráfico de regressão linear do método de quantificação para Acetato de Dexametasona

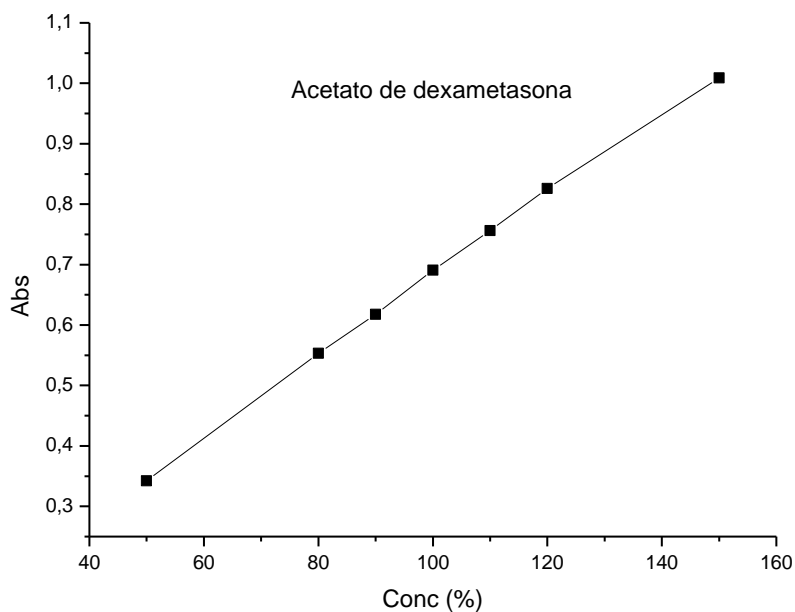


Tabela 4. Resultado da linearidade.

SQR	Equação da reta	R
Acetato de Dexametasona	$y = 0,0067x + 0,0151$	0,9989

Tendo como base os resultados obtidos, pode ser observada uma relação linear entre a concentração da SQR e a resposta obtida, estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) com 95% de confiança, o método foi considerado linear por apresentar coeficiente de correlação  $R = 0,9989$ , que encontrasse compatível com o proposto com a RE 899 de no mínimo 0,99.

**6. ANÁLISE DA QUANTIFICAÇÃO DO ACETATO DE DEXAMETASONA  
CREME POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Quadro 7. Equipamentos e instrumentos calibrados utilizados na análise por HPLC.

<b>NOME</b>	<b>TAG</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>MODELO/ CAPACIDADE MÁXIMA</b>	<b>Nº DA CALIBRAÇÃO</b>
Balança	32BAL007	Mettler Toledo®	XS205 Range Dual	25/02/14
Balão volumétrico	-	Pyrex®	100 e 50ml	-
Pipeta Volumétrica	-	Pyrex®	5ml	-
Membrana PVDF Millipore	-	Millipore Indústria e Comércio Ltda	0,45µm	-
Ultrassom	33SON001	UNIQUE®	_____	29/05/13
HPLC	32CLA004	HITACHI®	VWR Chromaster	26/09/13
Fase Estacionária	_____	Merck®	Coluna LiChroCART® RP-C18 (5 µm) - 250 x 4,6mm	_____

## 6.1 Substância Química de Referência, amostras e reagentes.

### 6.1.1 Substância Química de Referência

A substância química de referência (SQR) é o Padrão Secundário do Acetato de Dexametasona.

#### 6.1.1.2 Amostras e reagentes

Quadro 8. Substâncias e solventes utilizados na análise por HPLC.

NOME	LOTE	FABRICANTE	DATA DE VALIDADE
Acetato de Dexametasona padrão secundário	16729	LAFEPE®	03/15
Acetato de Dexametasona creme	17357	Lepuge Insumos Farmacêuticos®	26/04/16
Metanol Para HPLC	1721207	Merck®	31/12/16

#### 6.1.1.3 Condições Cromatográficas

Quadro 9. Condições cromatográficas na análise por HPLC.

Características	Descrição
Fase Estacionária	Coluna LiChroCART® RP-C18 (5 µm) - 250 x 4,0mm
Fase Móvel	Metanol / Água Purificada (65:35)
Fluxo	1,2 mL/min.
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	10 minutos
Temperatura	40° C
Detector	UV 240 nm

## **7 Preparo das soluções**

### **7.1 Fase móvel**

Mistura de Metanol para HPLC e Água purificada (65:35).

#### **7.1.1 Diluente**

Metanol para HPLC.

#### **7.1.2 Solução padrão**

Foi pesado 20mg de Acetato de Dexametasona SQR e transferido para um balão volumétrico de 100,0ml, adicionado 50,0ml de metanol para HPLC e sonicado a solução obtida por 10min. Foi completado o volume com metanol para HPLC e homogeneizado. Em seguida, pipetado 5,0ml da solução anterior e transferido para balão volumétrico de 50,0ml, completado o volume com Fase móvel e homogeneizado. Foi filtrado através da membrana de 0,45 $\mu$ m e injetado no cromatógrafo líquido. Concentração final 0,02  $\mu$ g/mL.

#### **7.1.3 Solução amostra**

Foi pesado em um Becker de vidro, 2g de Dexametasona Creme (equivalente a 2mg de Acetato de Dexametasona) e acrescentado 40,0ml de Metanol para HPLC. Foi sonicado, agitando com bastão de vidro até dissolver totalmente. A solução formada foi transferida para um balão volumétrico de 100,0ml, completado o volume com Metanol para HPLC e homogeneizado. Foi filtrada através da membrana de 0,45 $\mu$ m e injetada no cromatógrafo líquido. Concentração final 0,02  $\mu$ g/ml.

#### **7.1.4 Teste de adequabilidade do sistema**

A adequabilidade do sistema foi realizada com a injeção de 20µL da Solução padrão de Acetato de Dexametasona sendo avaliados os pratos teóricos, fator de calda e desvio padrão relativo da replicata.

#### **7.1.5 Procedimento Teor**

A coluna foi acondicionada deixando a fase móvel passar até a estabilização do sistema; foi injetado separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra, registrados os cromatogramas e medidas as áreas sob os picos. Foi calculado o teor de Acetato de Dexametasona na amostra, a partir das respostas obtidas das soluções padrão e amostra.

Especificação: Entre 90% e 110%, calculado em relação à substância anidra e livre de solventes.

### **Repetibilidade**

#### **4.1 Preparo das Soluções Padrão do Acetato de Dexametasona Creme**

Em quadruplicata, foi pesado em um Becker de vidro, 2g de Dexametasona Creme (equivalente a 2mg de Acetato de Dexametasona) e acrescentado 40,0ml de Metanol para HPLC. Foi sonicado, agitando com bastão de vidro até dissolver totalmente. A solução formada foi transferida para um balão volumétrico de 100,0ml, completado o volume com Metanol para HPLC e homogeneizado. Foi filtrada através da membrana de 0,45µm e injetada no cromatógrafo líquido. Concentração final 0,02 µg/ml.

#### **4.2 Preparo das Soluções de Acetato de Dexametasona Creme para Precisão**

A etapa foi realizada por dois analistas, o primeiro, com o auxílio de um béquer, pesou com exatidão, em sextuplicata, 2g de Dexametasona Creme (equivalente a 2mg de Acetato de Dexametasona), diluiu com Metanol, foi sonicado no aparelho de ultrassom por 15 min., transferido para balão volumétrico de 100ml, completado o volume com Metanol e homogeneizado. Foi filtrada através da membrana de 0,45 $\mu$ m e injetada no cromatógrafo líquido. Concentração final 0,02  $\mu$ g/ml.

O segundo analista, pesou com exatidão, em quadruplicata, com o auxílio de um béquer, 2g de Dexametasona Creme (equivalente a 2mg de Acetato de Dexametasona), diluiu com Metanol, foi sonicado no aparelho de ultrassom por 15 min., transferido para balão volumétrico de 100ml, completado o volume com Metanol e homogeneizado. Foi filtrada através da membrana de 0,45 $\mu$ m e injetada no cromatógrafo líquido. Concentração final 0,02  $\mu$ g/ml.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8 Resultados dos Parâmetros estudados

#### 8.1 Teste de adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi realizada com a injeção de 20 µL da solução de padrão de Acetato de Dexametasona.

Tabela 5. Resultados da adequabilidade sistemana análise por HPLC.

Nome	Tempo de retenção	Pratos teóricos (USP)	DPR (replicata)	Fator de calda
Acetato de Dexametasona	6,10	6096	0,18	1,17

Todos os parâmetros analisados no teste de adequabilidade encontram-se de acordo com os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira 5º edição.<sup>8</sup>

#### 8.2 Resultados da Precisão

##### 8.2.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada utilizando-se seis amostras (n=6) a 100% da solução de Acetato de Dexametasona (0,02 µg/ml) sob as mesmas condições de teste, em um curto intervalo de tempo preparadas pelo mesmo analista. Na Tabela 2, seguem os resultados da repetibilidade do Acetato de Dexametasona.



Tabela 6. Resultados da repetibilidade da análise por HPLC.

Amostra	% Acetato de Dexametasona Creme
1	99,8
2	98,9
3	100,0
4	99,7
5	99,4
6	99,8
Media	99,6164
DP	0,3995
CV%	0,4011

A repetibilidade atende a resolução vigente, visto que o coeficiente de variação 0,401% para Acetato de Dexametasona está inferior ao valor máximo aceitável de 5%.

#### 8.2.1.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada utilizando-se 04 amostras (n=4) a 100% preparadas por um segundo analista, utilizando as mesmas condições da repetibilidade. Nas tabelas 8 e 9, seguem os resultados da precisão intermediária e teste t Student respectivamente.

Tabela 7. Precisão intermediária Acetato de Dexametasona análise por HPLC.

Amostra	% Acetato de Dexametasona	
	Analista-1	Analista-2
<b>1</b>	100,05	100,10
<b>2</b>	99,72	100,16
<b>3</b>	99,43	100,65
<b>4</b>	99,86	99,63
<b>Media</b>	99,77	100,13
<b>DP</b>	0,262	0,4155
<b>CV%</b>	0,2627	0,4149

Tabela 8. Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes na análise por HPLC

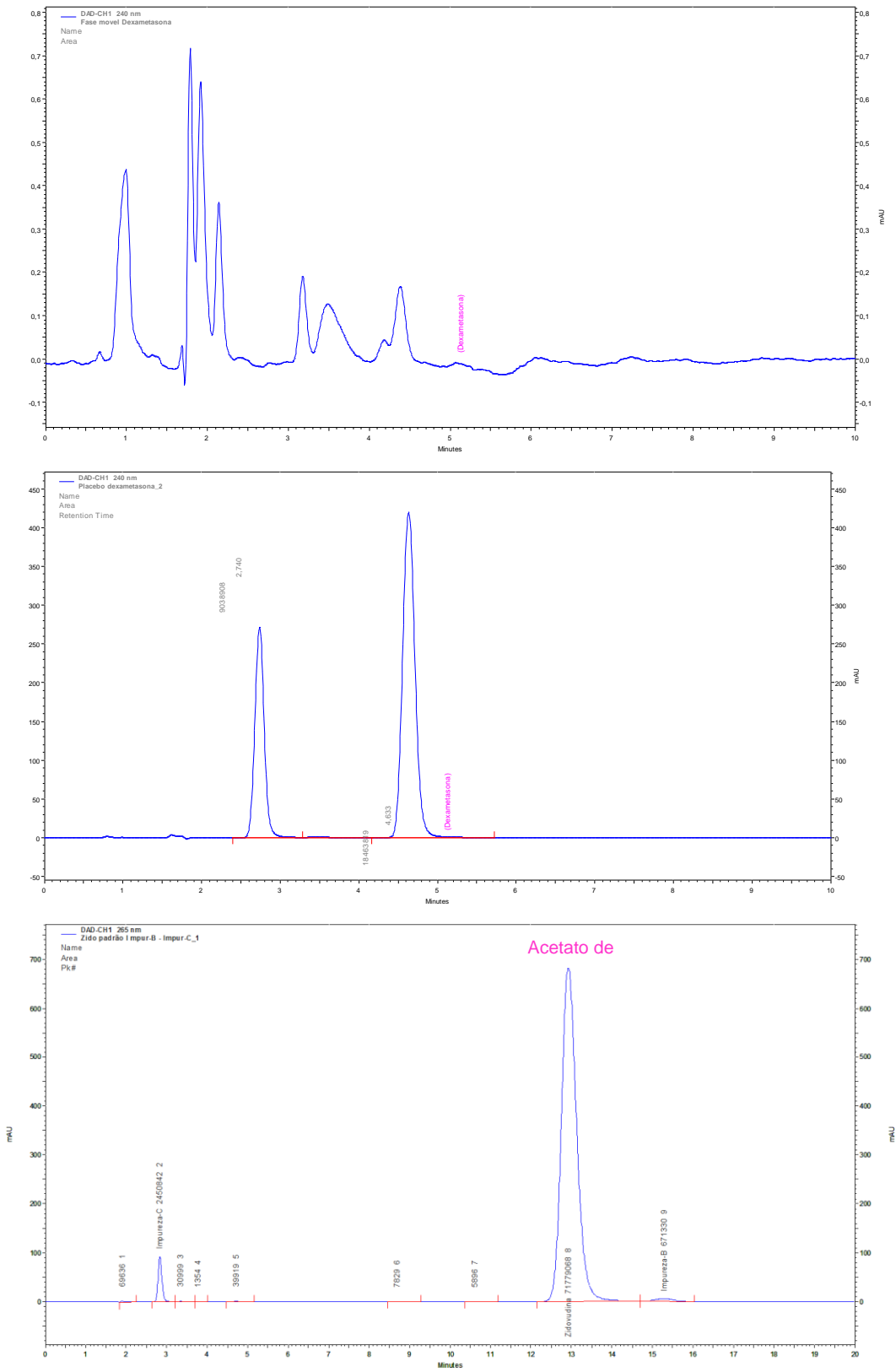
Analistas	Acetato de Dexametasona	
	Analista-1	Analista-2
<b>Media</b>	99,77	100,13
<b>Variância</b>	0,07	0,17
<b>Star T</b>	- 0,77	
<b>P(T&lt;=t) bi-caudal</b>	0,18	
<b>t crítico bi-caudal</b>	2,45	

Estatisticamente, para a repetibilidade foram apresentados valores de Coeficientes de Variação inferiores a 5% e com 95% de confiança. Para a precisão intermediária, após aplicação dos testes t Student, o t calculado para o cálculo de Acetato de Dexametasona foi de -0,77; valor inferior ao t tabelado de 2,45, com 95% de confiança. Portanto, o método foi preciso.

## 8.2 Especificidade/ seletividade

A especificidade foi comprovada através das análises realizadas com a injeção do placebo do creme de Acetato de Dexametasona e da fase móvel. Foi verificado que durante a corrida cromatográfica não houve detecção referente ao placebo, nem à fase móvel no tempo de retenção do ativo Acetato de Dexametasona.

Figura 3. Cromatograma da especificidade entre Fase móvel (1) placebo (2) e Acetato de Dexametasona (3).



### 8.3 Linearidade

A linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa (BARROS NETO, 2002).<sup>9</sup>

Tabela 9. Resultados da linearidade quantificação do Acetato de Dexametasona Creme

Solução padrão	Equação da reta	R
Acetato de Dexametasona	$y = 28190x - 50770$	0,999

Tendo como base os resultados obtidos, pode ser observada uma relação linear entre a concentração da SQR e a resposta obtida, estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com 95% de confiança, o método foi considerado linear por apresentar coeficiente de determinação  $R = 0,999$ ; que encontrasse compatível com o proposto com a RE 899 de no mínimo 0,99.

## **CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos, os métodos foram considerados adequados para a determinação do teor de Acetato de Dexametasona IFA e Creme, por seguir os parâmetros preconizados pela RE 899/2003<sup>2</sup> da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo considerado preciso, linear e específico.

## REFERÊNCIAS

1. BRASIL. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 17**, de 16 de abril de 2010. **RDC Nº17**. Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo., n. 73, p. 1-50, Abril de 2010.
2. BRASIL. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RE 899**, de 29 de maio de 2003. **RE 899**. Guia para validação de métodos analíticos, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo., n. 1, p. 1-15, Junho de 2003.
3. PHARMACOPOEIA COMMISSION BRITISH **British Pharmacopoeia**. 2011. ed. TSO (The Stationery Office): PHARMABOOKS E
4. USP (United States Pharmacopeia Methods <1225>, Rockville, 2011.
5. WATSON, D. G.. *Pharmaceutical Analysis*. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. 2º Edition, Edimburgo: Elsevier Churchill Livingstone, p. 221 – 233, 2005.
6. MALESUIK, M. D.; CARDOSO, S. G.; LANZANOVA, F. A.; BAJERSKI, L.; DORIGONI, E.. Desenvolvimento de testes de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e capsulas magistrais contendo anlodipino. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 27, n. 1, p. 37 – 49, 2006.
7. BRITTAIN, H. G.. Validação de Métodos Analíticos não-cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, p. 4 – 9, 2008.
8. BRASIL. Farmacopéia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa.5ª ED. vol. 1, 2010.
9. BARROS NETO, B.; SCARMINIO,I.S.; BRUNS, R.E.. *Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria*. Campinas: Editora da Unicamp – SP, 2001.

**AUTORIZAÇÃO PARA ELABORAÇÃO DE FICHA CATALOGRÁFICA  
CURSO DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

DATA: 27/05/15

TÍTULO OU TEMA:

Adequabilidade da metodologia Analítica para  
quantificação do teor de acetato de dexametasona 1FA e creme  
por espectrofotômetro e CLAE.

AUTOR (ES):

Maria Alice da Luz

ORIENTADOR E COORIENTADOR:

[Assinatura]

ASSINATURAS

ESTUDANTE(S):

[Assinatura]

ORIENTADOR E COORIENTADOR:

[Assinatura]