

5

Resultado e discussão: Avaliação dos métodos

A avaliação de desempenho do método analítico espectrofluorimétrico para prednisolona e triancinolona acetinado foi realizada em três etapas. Primeiramente, obtiveram-se os parâmetros analíticos de mérito relevantes para avaliação da sensibilidade, precisão e resposta linear. Em segundo lugar, estudou-se o potencial interferente (interferência espectral e de matriz) de algumas substâncias comumente presentes em formulações farmacêuticas associadas aos antiinflamatórios sintéticos em questão. Finalmente, os métodos foram testados por meio da análise de formulações farmacêuticas comerciais, onde a recuperação obtida foi comparada com valores de referência ou por meio de determinações feitas com o método de referência utilizada no Jockey Club Brasileiro (HPLC-UV).

5.1.

Parâmetros analíticos de mérito

Parâmetros analíticos de mérito para a avaliação de sensibilidade, linearidade de resposta e de precisão foram obtidos por meio da construção de curvas de calibração para os dois glicocorticóides sintéticos, utilizando as condições experimentais otimizadas para o máximo sinal fluorescente estipulados no capítulo anterior. As curvas analíticas mostradas para a prednisolona e para triancinolona acetinado foram construídas com a média de três curvas preparadas em dias diferentes (Figura 23A e 23B).

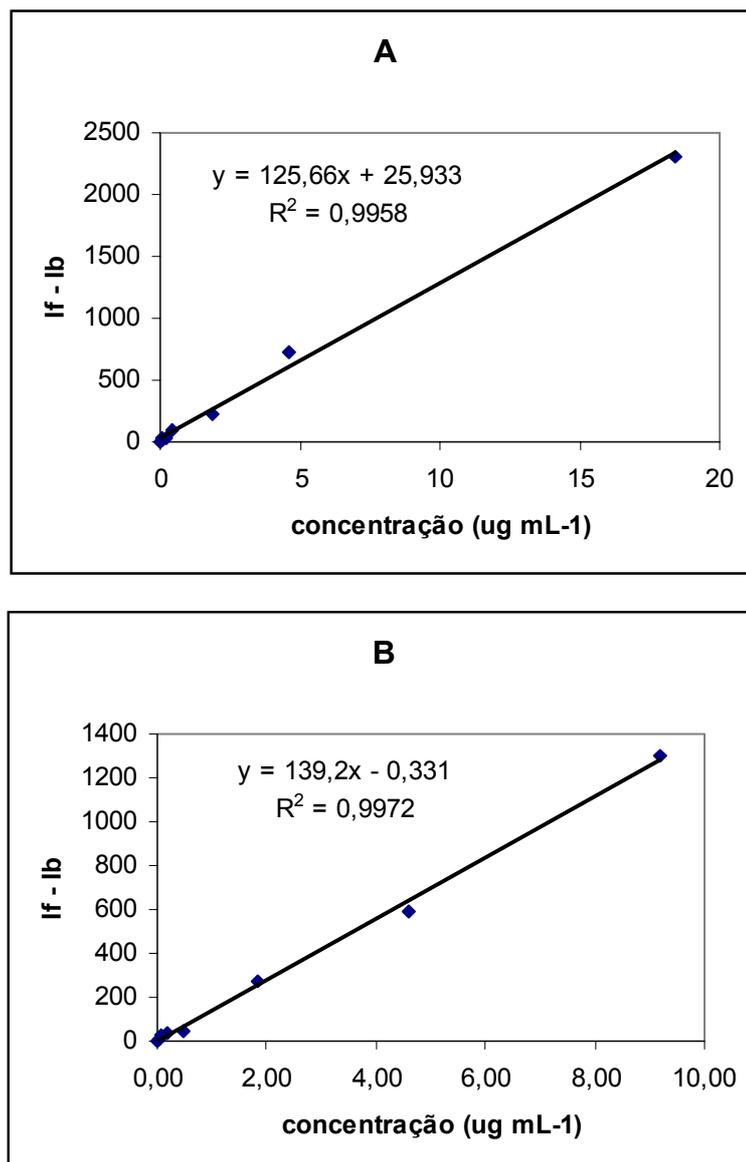


Figura 23: Curvas analíticas de calibração (A) da prednisolona e (B) da triancinolona acetone após procedimento de indução fotoquímica de fluorescência.

5.1.1.

Sensibilidade

A qualidade e credibilidade de um trabalho analítico se fundamentam nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medição. Se o analista não se preocupa em estabelecer determinados parâmetros,

difícilmente conseguirá obter máximo desempenho de um método analítico e conseqüentemente dados que tenham um significado real.

A sensibilidade dos métodos foi avaliada pelos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ). O LD pode ser definido como a menor concentração ou quantidade de uma substância química que pode ser identificada por um procedimento analítico com um nível de confiança especificado, ou ainda, que pode ser estatisticamente diferenciado do ruído. Existem normalmente dois critérios mais aceitos e amplamente usados na literatura analítica, o critério ks_b , e o critério ks_b/m . O critério ks_b , é aquele onde a quantidade de analito que produz uma resposta analítica é igual a três vezes o desvio padrão da medição de 10 ou 16 brancos seria o valor equivalente ao LD. Alternativamente, quando o sinal do branco é relativamente elevado esse critério pode ser expresso pela sua variante $B + ks_b$, onde B é o sinal médio do branco. No entanto, o critério usado mais comumente, e considerado o mais apropriado por levar em consideração a sensibilidade propriamente dita (inclinação da curva analítica, m) além variação estatística do branco, é o critério ks_b/m . O valor de k depende do limite de confiança adotado e em geral é igual a 2 ou 3. Assim, pelo último critério, o LD é melhorado não somente pela minimização do sinal do branco e de sua variação estatística mas também pela maximização da resposta analítica do analito (Long & Winefordner, 1983).

Em geral, o LD é uma estimativa, e não é necessariamente observado por meio da medição instrumental. Assim, nesse caso, o LQ, que é definido por $10s_b/m$ ou $10s_b$ (dependendo do critério adotado) é um parâmetro mais adequado para estimar a quantidade mínima de analito que é realmente medida pelo método. Nesse nível de concentração ou quantidade, o erro associado à medida é de 30% com 99% de probabilidade de observação do mesmo (Taylor, 1987).

Os LD e LQ para o método espectrofluorimétrico após derivação fotoquímica da prednisolona e triancinolona acetonido podem ser observados na Tabela 6, onde valores da ordem de $\eta\text{g mL}^{-1}$ foram obtidos. Esses valores são significativamente menores que os reportados para os métodos baseados na determinação espectrofotométrica e sem a necessidade de pré-concentração de analito.

Tabela 6: Parâmetros de mérito relativos à sensibilidade

Parâmetro	Prednisolona	Triancinolona acetinado
Limite de detecção (LD) (ng mL ⁻¹)	6	5
Limite de quantificação (LQ) (ng mL ⁻¹)	19	17

5.1.2.

Resposta linear

A linearidade é a capacidade de um método analítico gerar sinais diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra. Assim, dentro de uma faixa analítica especificada, é possível relacionar o valor de uma variável dependente – valor medido – através do conhecimento da variável independente – concentração. Embora seja possível utilizar respostas quadráticas para se calcular uma concentração ou quantidade de analito desconhecida, a resposta linear é a mais comum e a mais prática. A linearidade da resposta analítica é determinada pela construção de uma curva analítica, que é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento a várias concentrações de um dado analito. O número de calibradores (pontos da curva) é definido em função da faixa de concentração de interesse, devendo ser de, no mínimo, seis, embora dependendo da extensão da faixa, o uso de quatro ou cinco pontos ainda é considerado adequado. A análise de regressão normalmente utilizada é a dos mínimos quadrados, na qual a variável independente refere-se à concentração teórica da substância em questão. A regressão deve ser representada graficamente e através de transformações matemáticas bem definidas (equação da reta), enquanto que a correlação pode ser expressa através do coeficiente de correlação (r) ou do coeficiente de determinação (r^2). Qualquer que seja o método de calibração, a curva deverá apresentar o seguinte tratamento estatístico: equação de regressão e coeficiente de correlação ou determinação.

Muito embora valores de r^2 acima de 0,9 já sejam metrologicamente adequados para se definir uma resposta linear, adotou-se aqui nesse trabalho o valor de pelo menos 0,99. No caso das curvas analíticas dos glicocorticóides sintéticos, as respostas lineares

se estenderam por três ordens de grandeza (de 1×10^{-7} a 5×10^{-5} mol L⁻¹). Na Tabela 7, pode-se verificar as equações da reta e os valores de coeficiente de determinação para as duas substâncias em questão.

Tabela 7: Parâmetros de mérito relativo à linearidade da resposta analítica.

Parâmetros de mérito	Prednisolona	Triancinolona acetonido
Equação da curva analítica (conc., µg mL ⁻¹ vs fluorescência)	$y = 125,66x + 25,93$	$y = 139,20x - 0,33$
Coeficiente de determinação (r^2)	0,996	0,997
Faixa linear dinâmica (ordem de magnitude)	3	3

5.1.3.

Precisão

Todas as medidas físicas possuem certo grau de incerteza. Quando se faz uma medição procura-se manter esta incerteza em níveis baixos e toleráveis, de modo que o resultado possua uma confiabilidade aceitável. A aceitação ou não dos resultados de uma medição, assim como sua apresentação, dependerá de tratamento estatístico, e tais resultados só terão valor se forem acompanhados pela estimativa dos erros inerentes à determinação.

A precisão do método foi avaliada pela repetitividade, que é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra usando o mesmo instrumento e o mesmo operador. Seu valor depende de erros indeterminados, aleatórios, estes impossíveis de serem eliminados. A medida da precisão pode também ser expressa através do cálculo do desvio padrão relativo e do limite de repetitividade, sendo que quanto maior a dispersão das medidas menor a precisão das mesmas (Chasin *et al.*, 1998). Para o cálculo da precisão em termos de repetitividade, foram efetuadas

medições de 10 soluções de analito com concentração conhecida, e no nosso caso igual a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada solução, o valor da adotado para a medição foi a média de dez leituras consecutivas de intensidade fluorescente, que foram armazenadas na memória do computador do instrumento. O sinal fluorescente médio foi então a média dos sinais das 10 soluções, de onde se obteve o respectivo desvio padrão (s). A partir da média do sinal fluorescente, do desvio padrão e do número de medições pôde-se calcular o desvio padrão relativo (DPR) e o limite de repetitividade (r_r), este último dado pela Equação 10 abaixo:

$$(10) \quad r_r = t \sqrt{2} \cdot s$$

Onde o valor de t é 2,23 (para n = 10), o que significa 95% de probabilidade na tabela t de Student (NBS Handbook). Metrologicamente vale lembrar que DPR's de até 20 % são suficientes para a validação de um método analítico (Chasin, 1994)

Assim, o DPR e o limite de repetitividade das medições de soluções de prednisolona e de triancinolona acetinado após derivação podem ser considerados bastante adequados para o método, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros de mérito relativo à precisão.

Parâmetros de mérito	Prednisolona	Triancinolona acetinado
Desvio padrão relativo (DPR)	14 %	16 %
Limite de repetitividade (r_r)	13,5	10,0

5.2.

Avaliação de potenciais substância interferentes

O resultado das análises de amostras onde se encontra(m) o(s) analito(s) de interesse pode ser afetado por componentes da matriz, que provocam interferências que induzem respostas espectroanalíticas diferentes para o analito presente na amostra em relação ao analito presente nos padrões utilizados como referência no procedimento de quantificação (calibração).

Nesse trabalho, o potencial interferente de duas substâncias (benzocaína e polimixina B) foi avaliado. Essas duas substâncias foram selecionadas em virtude de serem componentes associados aos antiinflamatórios glicocorticóides em algumas formulações comerciais. Outro fator relevante na seleção foi a pronta disponibilidade dos mesmos no laboratório.

Pode-se, de modo simplificado, resumir essas interferências em duas classes: a interferência espectral e a interferência da matriz. No caso da luminescência molecular, as interferências espectrais só acontecem se houver sobreposição total ou parcial de ambas as bandas de excitação e emissão do analito e da substância concomitante interferente. Fato esse que torna as técnicas luminescentes mais seletivas que as técnicas baseadas na simples medição da radiação transmitida após absorção de energia radiante. No caso da interferência espectral, existe um aumento do sinal esperado para o analito de interesse, e essa interferência, em geral, não pode ser corrigida por procedimento de adição do analito devido à dificuldade de se obter um branco adequado para correção de sinal. Para a benzocaína e para a polimixina B, verificou-se que após submeter soluções dessas substâncias ao mesmo procedimento de derivação fotoquímica aplicada aos glicocorticóides, nenhum sinal fluorescente diferente do sinal do branco foi observado na região espectral de interesse, como pode ser verificado nas Figuras 24 e 25.

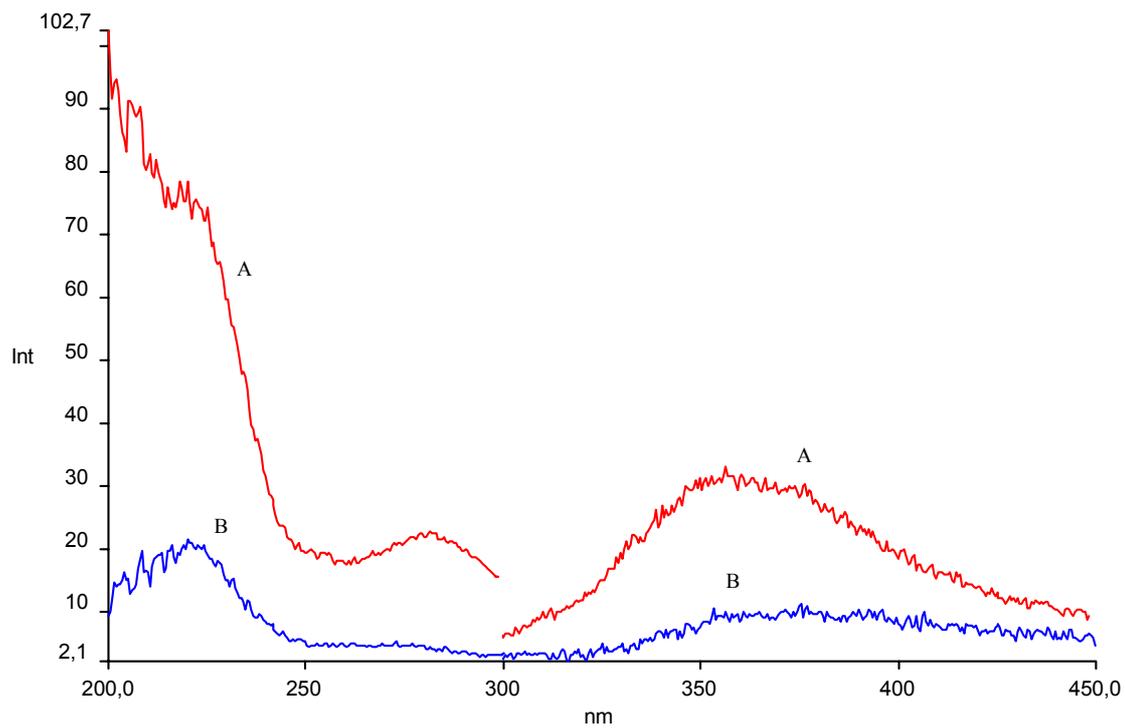


Figura 24: Espectro de fluorescência (A) da benzocaína em comparação ao do branco (B).

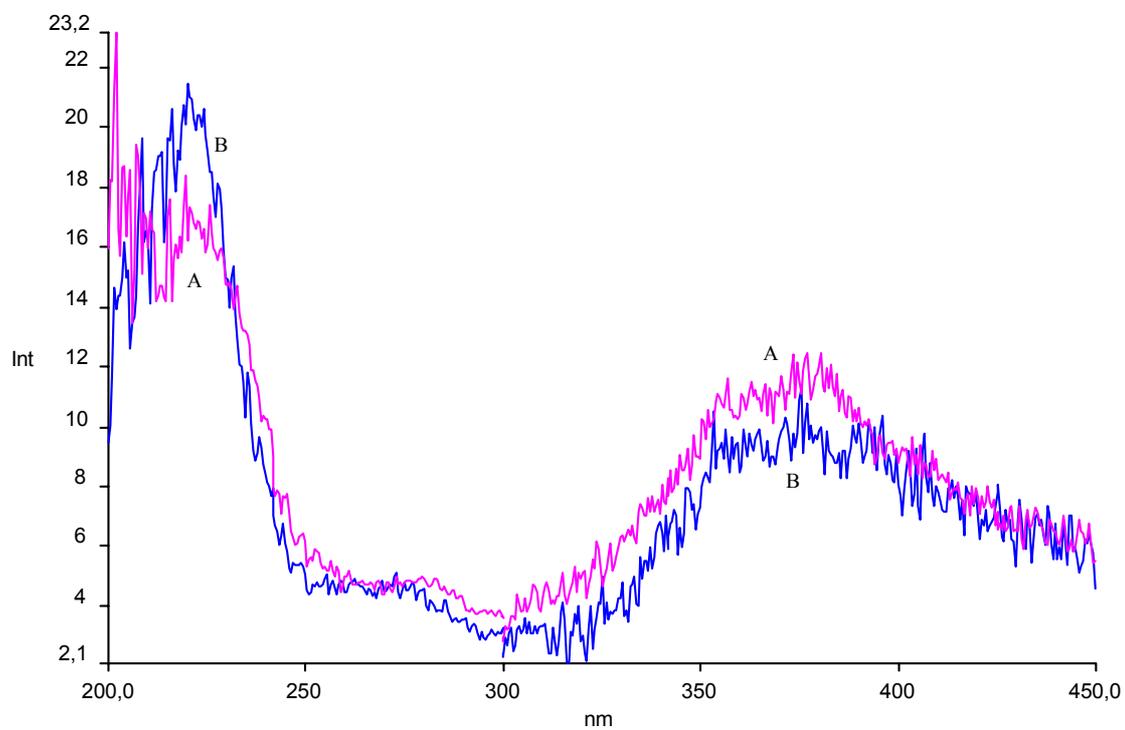


Figura 25: Espectro de fluorescência (A) da polimixina B em comparação ao do branco (B).

No caso da interferência de matriz, duas possibilidades são possíveis, ambas com decréscimo do sinal esperado para o analito em questão. Primeiro a interferência de matriz pode ocorrer devido ao chamado efeito filtro, onde a radiação utilizada para a excitação do analito é total ou parcialmente absorvida pela banda de absorção da substância interferente, quando essa banda de absorção se sobrepõe total ou parcialmente à banda de excitação do analito. Assim, como a energia radiante de excitação que chega ao analito da amostra é diferente da que chega ao analito dos padrões, a luminescência medida é também diferente por ser esta proporcional ao número de espécies excitadas. Efeito de filtro pode também ser observado na presença de excesso de analito, mas como se trabalhou com concentrações dentro da resposta linear das substâncias, esse efeito passa a ser desconsiderado. A outra causa da interferência de matriz, no caso da luminescência, é o efeito desativador de estado excitado (quenching), já descrito no capítulo 2. Nesse caso, moléculas da substância concomitante se chocam com as do analito e esse choque favorece a troca de energia entre as espécies, desativando a molécula do analito do estado excitado para o fundamental sem a emissão de radiação.

Um estudo foi realizado comparando-se o sinal da fluorescência induzida na solução padrão de prednisolona com o sinal obtido de soluções contendo a mesma concentração do analito presente no padrão ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) com quantidades diferentes de benzocaína ou polimixina B. Apenas a prednisolona foi estudada pois essas substâncias concomitantes estão presentes apenas nas formulações que contém esse glicocorticoide. As concentrações relativas do analito e dos potenciais interferentes nas soluções são mostrados nas Tabelas 9 e 10, onde as razões entre as intensidades fluorescentes do padrão de analito (I_{pred}) e das misturas ($I_{\text{benz} + \text{pred}}$ ou $I_{\text{poliB} + \text{pred}}$) são indicadas. As concentrações relativas escolhidas para o experimento são próximas (até um fator de 10 vezes) às indicadas na formulação farmacêutica.

Tabela 9: Estudo do efeito interferente da benzocaína na fluorescência da prednisolona após derivação fotoquímica.

Relação entre as concentrações de prednisolona e benzocaína $C_{\text{prednisolona}}/C_{\text{benzocaína}}$	Razão entre a fluorescência da prednisolona e a fluorescência da prednisolona na presença de benzocaína $(I_{\text{pred}}/I_{\text{benz} + \text{pred}})$
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 0 \mu\text{g mL}^{-1}$	1
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$	1,04
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,95
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 12 \mu\text{g mL}^{-1}$	1,09

Tabela 10: Estudo do efeito interferente da Polimixina B na fluorescência da prednisolona após derivação fotoquímica.

Relação entre as concentrações de prednisolona e polimixina B $C_{\text{prednisolona}}/C_{\text{poliB}}$	Razão entre a fluorescência da prednisolona e a fluorescência da prednisolona na presença de polimixina B $(I_{\text{pred}}/I_{\text{poliB} + \text{pred}})$
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 0 \mu\text{g mL}^{-1}$	1
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,92
$1 \mu\text{g mL}^{-1} : 1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$	1,1

Nos dois casos, não foi verificada nenhuma interferência de matriz como pode ser avaliado pelos valores de $I_{\text{pred}}/I_{\text{benz} + \text{pred}}$ e $I_{\text{pred}}/I_{\text{poliB} + \text{pred}}$ próximos da unidade e dentro da variação estatística do método. O espectro de absorção na região UV-visível de ambas as substâncias também não mostram bandas de absorção significantes depois de submetida ao procedimento de derivação fotoquímica.

5.3.

Análise de medicamentos comerciais (testes de recuperação em amostras reais)

O método analítico espectrofluorimétrico após indução fotoquímica foi testado por meio de análise de alguns medicamentos comerciais disponíveis no mercado. A recuperação do analito foi calculada tomando como referência o valor estabelecido na bula do medicamento ou o valor obtido utilizando um método de referência (no caso foi utilizado o método de referência utilizado no Jockey Club Brasileiro por HPLC-UV).

A recuperação é definida como a quantidade de analito presente ou adicionado à amostra que é efetivamente observada por meio de uma medição. Esse parâmetro é usado para avaliar a eficiência do método em relação à exatidão dos valores do analito presentes na amostra, a partir dos sinais analíticos medidos. A recuperação é calculada pela equação 10.

$$(10) \quad \text{Recuperação \%} = (\text{média do valor obtido} / \text{valor de referência}) \times 100$$

Foram escolhidos seis medicamentos para a realização desse teste, sendo dois comprimidos, duas suspensões injetáveis, uma pomada e um creme. A identidade, composição e apresentação de cada uma das formulações podem ser verificadas na Tabela 11.

Tabela 11: Descrições dos medicamentos analisados segundo as respectivas bulas.

Nome (apresentação)	Analito (quantidade)	Princípios ativos associados (quantidade)	Informações sobre o veículo (componentes inativos)
Prelone (comprimido)	Prednisolona (5 mg/unidade)	não	Celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, estereato de magnésio, glicolato de amido sódico, lactose, óleo vegetal hidrogenado, silicato de magnésio.
Predsim (comprimido)	Prednisolona (20 mg/unidade)	não	Lactose, amido de milho, polividona, estearato de magnésio.
Predmicin (pomada)	Prednisolona (4 mg/g)	Polimixina B (na forma de sulfato) – 10000 UI/g Benzocaína – 5 mg/g Clioquinol – 30 mg/g	Emulsão antiespumante, metilparabeno, propilparabeno, metabissulfito de sódio, lauril sulfato de sódio, oleato de decila, álcool cetosteárico, BHT, EDTA dissódico dihidratado, essência lavanda, álcool cetosteárico etoxilado, água de osmose.
Omcilon – A “M” (creme)	Triancinolona acetinado (1 mg/g)	Sulfato de neomicina – 2,5 mg/g Gramicidina – 0,25 mg/mL Nistatina – 100000 UI/g	0,2% metilparabeno 0,02% propilparabeno outros veículos
Vetalog (suspensão injetável)	Triancinolona acetinado (6 mg/mL)	não	Não declarado
Theracort 20 (suspensão injetável)	Triancinolona acetinado (20 mg/mL)	não	Não declarado

Para a análise dos comprimidos, partiu-se da metodologia de preparação de amostra referenciada na USP XXII, na qual uma amostragem de 10 comprimidos é macerada em gral de porcelana, e, em seguida uma massa do medicamento correspondente a 10 mg do analito é pesada e dissolvida em solvente orgânico que solubilize o princípio ativo de interesse. Para os medicamentos escolhidos, esta técnica gerou um erro experimental alto, pois a etapa de pesagem foi imprecisa, uma vez que o comprimido macerado absorve umidade do ambiente. Desta forma passou-se a utilizar um procedimento adaptado, onde um comprimido inteiro, previamente pesado, foi macerado até completa pulverização, e sua massa total foi ressuspensa e transferida com metanol para balão volumétrico de 100 mL (no caso do Predsim) e 50 mL (para o Prelone) e posteriormente seu volume final completado com metanol. A solução obtida foi deixada em banho ultra-sônico por 20 min. para favorecer a extração do analito e, para separar o material insolúvel, centrifugou-se o material por 15 min. a 2000 rpm. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro e depois, acondicionado em vidro âmbar na geladeira. Desta solução tomou-se uma alíquota de 24 μ L para 5 mL da mistura reacional, que foi submetida ao procedimento padronizado de derivação fotoquímica. Junto com as amostras foram preparados padrões de calibração para a construção da curva analítica de calibração. Para se garantir que a variação estatística entre comprimidos de uma mesma caixa do medicamento fosse considerada, o procedimento foi repetido para dois outros comprimidos e o resultado final foi a média das três determinações. Junto com as amostras foram preparados padrões de calibração para a construção da uma curva analítica de calibração.

Para efetuar as determinações da prednisolona e da triancinolona acetato em pomadas e cremes foram testadas extrações com metanol, etanol, acetona e clorofórmio. Para a pomada Predmicin (princípio ativo prednisolona) foi mais eficiente a extração usando etanol a quente (método descrito na USP XXII). Para tanto se pesou uma massa de 0,25 g de amostra que foi extraída com 5 mL de etanol em banho ultra-sônico por 20 min com aquecimento. Posteriormente, essa suspensão foi filtrada em papel de filtro, sendo este lavado com etanol e transferido para balão volumétrico de 10 mL que, em seguida, foi avolumado. Desta solução tomou-se uma alíquota de 48 μ L para 5 mL da mistura reacional, que foi submetida ao procedimento padronizado de derivação

fotoquímica. Junto com as amostras foram preparados padrões de calibração para a construção de uma curva analítica de calibração.

Para a determinação de triancinolona acetato em suspensões injetáveis, todo o conteúdo de uma ampola do medicamento foi diluído diretamente em 100 mL de água ultrapura em balão volumétrico. Desta solução tomou-se uma alíquota de 14 μ L para 5 mL da mistura reacional, que foi submetida ao procedimento padronizado de derivação fotoquímica. Junto com as amostras foram preparados padrões de calibração para a construção de uma curva analítica de calibração.

Os resultados de recuperação dos analitos prednisolona e triancinolona acetato são mostrados respectivamente nas Tabelas 12 e 13. Para as suspensões injetáveis, estes cálculos utilizaram a média de 5 determinações de uma única ampola. Para os comprimidos, são mostradas as médias de 3 amostras distintas com 3 repetições cada uma (3 comprimidos). Para a pomada é mostrada a média de 5 extrações.

As recuperações de todas as determinações efetuadas foram calculadas utilizando-se como referência o resultado obtido com o método desenvolvido no Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro para determinação de prednisolona e triancinolona acetato utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fotométrica (HPLC-UV). Para tanto 1 mL das soluções resultantes das extrações dos medicamentos, antes da derivação fotoquímica, foram filtradas com unidade filtrante HV MILLEX 0,45 μ de poro e transferidas para um vial de amostragem. Em seguida, as amostras foram injetadas no HPLC-UV, com coluna da C₁₈ - SymmetryShield RP18 3,5 μ m (4,6 x 150mm) da Waters (USA), utilizando parâmetros segundo o método cromatográfico CORTNOV.M que utiliza fase móvel de acetonitrila/água 33/67 v/v, com eluição isocrática e vazão da fase móvel de 1 mL min.⁻¹. O volume de injeção foi de 5 μ L e comprimento de onda para monitoração de sinal pelo detector foi de 240 nm. As amostras foram quantificadas por uma curva analítica.

Utilizando a quantificação por curva analítica e comparando os valores determinados com o valor obtido pelo o método HPLC-UV, pôde-se verificar recuperações excelentes para os medicamentos Predmicin, Predsim, Theracort e Vetalog. Estes resultados estão dentro da faixa de 90 à 110 % e são considerados aceitável pela USP. Devido à recuperação do medicamento Prelone ter sido baixa com o uso da curva analítica, utilizou-se a técnica de quantificação pelo método de adição de analito, o que proporcionou resultados bem mais satisfatórios, como pode ser observado

na Tabela 13. Esse fato pode ser atribuído a alguma interferência de matriz causada pela co-extração de algum componente do comprimido. Como essa interferência diminuiu o sinal relativo do analito, a adição de analito pôde, então, ser usada com sucesso. A curva de adição do analito para o Prelone é mostrada na Figura 26.

A análise do creme Omcilon-A “M” não foi possível (resultado não mostrado na tabela 13), pois, com todos os solventes testados para a extração do analito, o sinal fluorescente obtido foi muito alto, possivelmente proporcionado pelos outros componentes da formulação que foram co-extraídos com a triancinolona acetônico. Infelizmente este tipo de interferentes não pode ser corrigido e nem avaliado, uma vez que o laboratório não dispunha de padrões correspondentes aos aditivos do medicamento, potenciais interferentes.

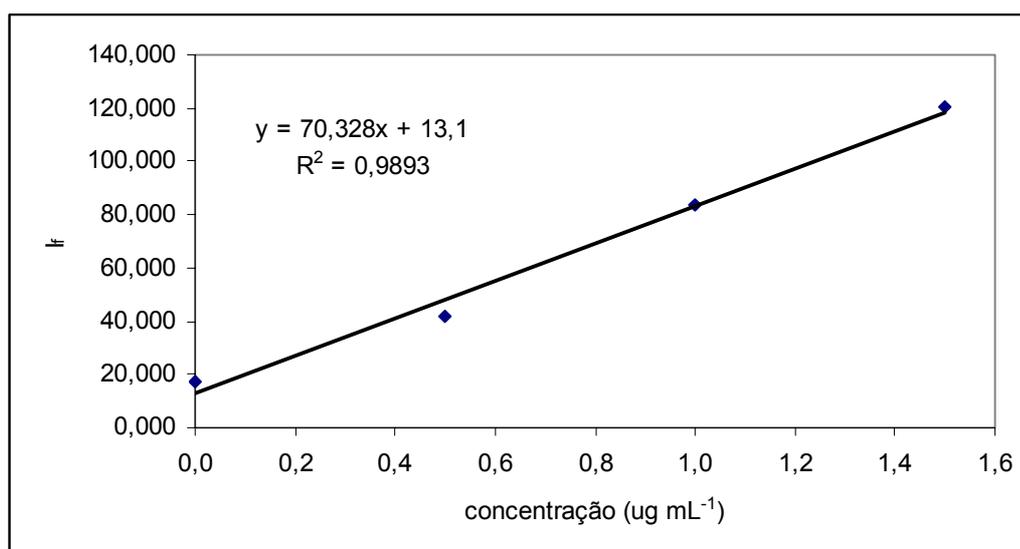


Figura 26: Curva de adição de analito para análise do Prelone (comprimido) utilizando a indução fotoquímica de fluorescência.

Tabela 12: Recuperações^a obtidas para a prednisolona em formulações comerciais.

Formulação farmacêutica	Recuperação (%)	Método de calibração
Predsim	100 ± 7 (n = 3)	Curva analítica
Prelone	104 ± 6 (n = 4)	Adição do analito
	86 ± 12 (n = 3)	Curva analítica
Predimicin	99 ± 5 (n = 5)	Curva analítica

^aValores de referência obtidos com o método HPLC-UV.

Tabela 13: Recuperações^a obtidas para a triancinolona acetato em formulações comerciais.

Formulação farmacêutica	Recuperação (%)	Método de calibração
Vetalog	97 ± 14 (n = 5)	Curva analítica
Theracort	103 ± 6 (n = 5)	Curva analítica

^aValores de referência obtidos com o método HPLC-UV.