

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para o Doseamento de Sibutramina em Cápsulas

Isabel C. Fração DIEFENBACH ¹, Milene FRIEDRICH ¹, Celso F. BITTENCOURT ¹,
Marcos R. SANTOS ² & Ana L. Venquiarute ESCARRONE ³

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Avenida Roraima, N° 1000.
Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, 97105-900, Brasil

² Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Rio Grande do Sul, Brasil.
Rua dos Andradas N° 1614. C.E.P. 970-032. Santa Maria. Rio Grande do Sul. Brasil

³ Universidade Católica de Pelotas - UCPEL Rua Félix de Acunha, 412,
Centro. 96010-010 Pelotas - Rio Grande do Sul (RS) - Brasil.

RESUMO. A Sibutramina é classificada terapeuticamente como anorexígeno, sendo indicada para tratamento da obesidade e redução do peso corpóreo, em conjunto com dieta e exercícios. Encontra-se disponível comercialmente no Brasil na forma farmacêutica de cápsulas. Não existem, até o momento, monografias em códigos oficiais para o controle de qualidade desse fármaco em sua forma farmacêutica. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método espectrofotométrico na região do ultravioleta para quantificação de sibutramina em cápsulas. A análise do teor de sibutramina foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta no comprimento de onda de 223 nm utilizando metanol e água como solventes. A validação do método analítico seguiu as normas da RE N° 899 e da International Conference on Harmonization – ICH. O método analítico validado demonstrou ser adequado, simples e rápido para a quantificação das cápsulas.

SUMMARY. “Development and Validation of an Analytical Methodology for Determination of Sibutramine in Capsules”. Sibutramine is therapeutically classified as an anorexigen, being recommended in the treatment of obesity and reduction of body weight, in combination with diet and exercise. It is commercially available in Brazil in the pharmaceutical form of capsules. As far of we know, there are no monographs in official codes for drug quality control in this pharmaceutical form. The present study aimed to develop and validate a spectrophotometric method in the ultraviolet area for sibutramine quantification in capsules. The analysis of the sibutramine content was accomplished by spectrophotometry in the ultraviolet area at 223 nm using methanol and water as solvent. The validation of the analytic method followed the RE 899 norms and International Conference on Harmonization - ICH. The validated analytic method proved to be adequate, simple and fast for the quantification of the capsules.

INTRODUÇÃO

A obesidade há muito associada à falta de força de vontade e de autocontrole, é agora reconhecida pelos profissionais da área de saúde como uma doença médica crônica e grave, com várias causas subjacentes e um número significativo de complicações associadas, com morbidade e mortalidade aumentadas ¹.

A sibutramina (Fig. 1) é o primeiro agente antiobesidade de ação central que atua como inibidor da recaptação em duas vias neurotransmissoras. Produz seus efeitos terapêuticos, pri-

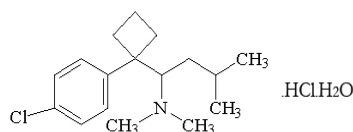


Figura 1. Estrutura química do cloridrato de sibutramina monoidratado.

mariaamente, pela inibição de recaptação de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) ².

No mercado brasileiro este fármaco encontra-se disponível com nomes comerciais como

PALAVRAS-CHAVE: Espectrofotometria; Sibutramina; Validação.

KEY-WORDS: Sibutramine, Spectrophotometry, Validation.

* Autor a quem a correspondência deve ser enviada: E-mail: isabel.diefenbach@terra.com.br

Reductil® (Abbott), Plenty® (Medley), Cloridrato de sibutramina monoidratado (Medley), além de outros produtos que estão em lançamento e os formulados pelas farmácias magistrais. As principais apresentações farmacêuticas disponíveis no comércio são cápsulas de 10 e 15 mg, de preparação industrial, e cápsulas obtidas por manipulação. Embora esse fármaco se encontre comercializado em nível mundial, não se encontrou descrita metodologia para análise quantitativa dessa forma farmacêutica, quer em códigos oficiais ou na literatura científica consultada.

A justificativa para realização deste trabalho se dá a partir da constatação da inexistência de metodologia analítica oficial para análise da sibutramina e de sua forma farmacêutica. Considerando que não existe monografia farmacopéica para este fármaco, esta pesquisa busca contribuir para o controle de qualidade da especialidade farmacêutica.

Todos os métodos para determinação quantitativa de fármacos devem ser validados para a garantia da segurança dos resultados. Diversos guias contendo diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos estão disponíveis atualmente³⁻⁵. Segundo esses guias, os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método são: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, robustez, limite de quantificação e limite de detecção.

Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método de análise para determinação quantitativa de sibutramina em cápsulas industrializadas, empregando espectrofotometria na região do ultravioleta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substâncias químicas e reagentes

Foi utilizado como substância química de referência matéria-prima proveniente da Opção Fênix Distribuidora de Insumos Ltda (São Paulo/SP, Brasil) devidamente caracterizada e identificada utilizando diferentes metodologias analíticas, como determinação da faixa de fusão, métodos espectroscópicos (RMN ¹H e RMN ¹³C) e espectrofotométricos (ultravioleta e infravermelho). Os demais reagentes como metanol apresentam grau espectroscópico.

Condições espectrofotométricas

Foi utilizado espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo 1650 PC. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 223 nm utilizado metanol e água como solventes.

Solução padrão

A solução padrão de sibutramina foi preparada dissolvendo-se 20 mg da SQR (substância química de referência) em balão volumétrico de 100 ml com metanol. Diluiu-se 5 ml desta solução para 100 ml com água, obtendo solução trabalho de 10 µg/ml.

Solução amostra

Determinou-se o peso do conteúdo de 20 cápsulas, conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição⁶. Misturaram-se os conteúdos das cápsulas. Foram transferidos, desta mistura, o equivalente a 20 mg de sibutramina, para balões volumétricos de 100 ml, solubilizando-se com auxílio de 50 ml de metanol. Após agitação por 30 min e banho ultra-sônico por mais 20 min, completaram-se os volumes com o mesmo solvente. Centrifugou-se uma porção da solução resultante por 5 min. Transferiram-se alíquotas de 5 ml da solução sobrenadante para balões volumétricos de 100 ml, completando-se o volume com água, a fim de se obter solução de trabalho de 10 µg/ml.

Validação

Para a validação da metodologia analítica foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção e quantificação.

Linearidade

A partir da solução metanólica de sibutramina SQR de 100 µg/ml transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 ml para balões volumétricos de 100 ml. Completaram-se os volumes, com água, obtendo-se soluções com concentrações de 6, 8, 10, 12, 14 e 16 µg/ml. As leituras foram obtidas a 223 nm, utilizando água como branco. Com os valores das absorvâncias plotados no eixo y em função da concentração (eixo x) foi calculado o coeficiente de correlação e a equação da reta.

Precisão

Este parâmetro foi avaliado através dos métodos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada pela análise de seis determinações a 100% da concentração teste, ou seja, 10 µg/ml. A precisão intermediária foi determinada em triplicata, durante três dias, por dois analistas diferentes.

Exatidão

A exatidão foi avaliada através do percentual

Balão volumétrico de 100 ml	Volume (ml) da solução amostra (100 µg/ml)	Volume (ml) da solução SQR (100 µg/ml)	Concentração (µg/ml)
A	5,0	-	5,0
R1	5,0	2,5	7,5
R2	5,0	5,0	10,0
R3	5,0	7,5	12,5
R4	5,0	10,0	15,0
SQR	-	5,0	5,0

Tabela 1. Preparo das soluções para o ensaio de exatidão.

de recuperação de uma quantidade conhecida de SQR adicionada à amostra de cápsulas conforme Tabela 1.

Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade da solução de sibutramina SQR e através da variação do comprimento de onda de detecção. Para a análise da estabilidade da solução de sibutramina foi utilizada solução de sibutramina SQR, na concentração de 10 µg/ml, a 4 °C e a temperatura ambiente. Após os tempos de 0 e 24 h, leituras foram realizadas em 223 nm, utilizando o mesmo diluente como branco. Para avaliar a influência da variação do comprimento de onda de detecção a análise foi realizada utilizando detecção em 222, 223 e 224 nm. Para este ensaio foi preparada solução de sibutramina SQR, na concentração de 10 µg/ml. Após, leituras foram realizadas em 222, 223 e 224 nm, utilizando o mesmo diluente como branco.

Especificidade

O ensaio de especificidade foi realizado através da análise das cápsulas, a fim de determinar possíveis interferências dos excipientes contidos nesta formulação, em relação à metodologia analítica desenvolvida. Para isto, foi realizado um placebo com os excipientes das cápsulas.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração do fármaco que o processo analítico pode diferenciar, mas não quantificar com precisão sob condições experimentais e o LQ representa a menor concentração da substância em análise avaliada pelo método, com exatidão e precisão aceitáveis. Estes parâmetros foram calculados a partir dos dados da curva de calibração, de acordo com a RE 899 e o ICH através das equações [1] e [2], onde: DP é o desvio padrão médio do in-

tercepto e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = 3 \times DP/IC \quad [1]$$

$$LQ = 10 \times DP/IC \quad [2]$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linearidade

A determinação da linearidade foi executada através da elaboração da curva de calibração. Segundo a RE 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva de calibração é de 0,99, sendo obtido um valor de 0,9999 no experimento. A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (Fig. 2).

A análise da variância (ANOVA) dos valores de absorvância, cujos elementos estão determinados na Tabela 2, demonstrou regressão linear significativa, não havendo desvio significativo da linearidade.

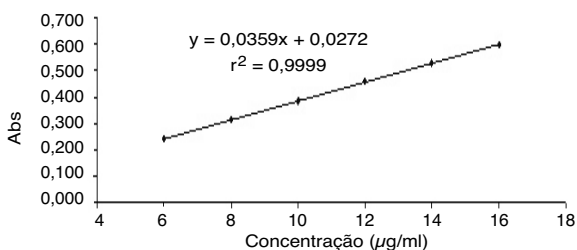


Figura 2. Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta da sibutramina SQR obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Precisão

Neste trabalho, a precisão foi determinada através dos métodos de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados obtidos com o parâmetro repetibilidade para a forma farmacêutica está exposto na Tabela 3.

Observando os resultados expostos nas Tabelas 3 e 4, podemos concluir que o método

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre concentrações	5	0,27009	0,054018	4789,78*	3,11
-regressão linear	1	0,27008	0,27008	23947,63*	4,75
-desvio da linearidade	4	0,00001	0,000004	0,32**	3,26
Resíduo	12	0,00014	0,000011		
Total	17	0,27023			

Tabela 2. Análise da variância das absorvâncias determinadas para obtenção da curva de calibração da sibutramina. * Significativo ($p < 0,05$). ** Não significativo ($p > 0,05$).

Análise	Cápsulas (Teor %) 10 µg/ml
1	98,57
2	99,96
3	99,12
4	100,52
5	101,07
6	99,68
Média	99,82
DP	0,37
CV%	0,91

Tabela 3. Resultados da repetibilidade para as cápsulas.

tem uma boa repetibilidade, visto que o coeficiente de variação (CV) é inferior ao especificado pela RE 899, a qual especifica o limite do coeficiente de variação em 5,0%.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos com a precisão intermediária para as cápsulas.

As Tabelas 5 e 6 mostram os valores dos tratamentos estatísticos por análise de variância (ANOVA) obtidos na precisão intermediária.

A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão intermediária do método (Tabelas 5 e 6).

Exatidão

A exatidão foi demonstrada através do percentual de recuperação. A média do percentual de recuperação foi de 99,64% para as amostras das cápsulas, demonstrando que o ensaio é exato para a finalidade determinada.

Robustez

Na análise dos resultados referentes à robustez do método, observou-se que a solução de sibutramina SQR submetida ao teste de estabilidade, na concentração de 10 µg/ml, estocada a 4 °C e a temperatura ambiente não apresentou variação significativa no valor da leitura de sua absorvância em relação ao valor original, após 24 h. Não houve alteração no máximo de absorvância.

Ainda na análise dos resultados referentes à robustez do método, observou-se que a solução de sibutramina SQR, na concentração de 10 µg/ml, não apresentou variação significativa no valor da leitura de sua absorvância pela modificação do comprimento de onda de 223 para 222 e 224 nm. Em todos os comprimentos de onda testados o coeficiente de variação das absorvâncias obtidas foram menores que 2%.

De acordo com as análises dos resultados, pôde-se observar que o método proposto apresenta robustez.

Concentração	Teor %					
	Analista 1			Analista 2		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
10 µg/ml	99,63	99,84	99,25	99,44	98,92	100,23
	99,53	99,62	100,48	99,30	99,70	99,78
	99,25	99,88	99,87	99,18	100,22	100,25
Média	99,47	99,78	99,87	99,31	99,61	100,09
DP	0,1970	0,1400	0,6150	0,1301	0,6543	0,2658
CV%	0,20	0,14	0,62	0,13	0,66	0,27

Tabela 4. Precisão intermediária para as cápsulas em diferentes dias e diferentes analistas.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F.C	F.T
Analista 1					
Entre dias	2	0,260956	0,130478	0,8964*	5,14
Resíduo	6	0,873267	0,145544		
Total	8	1,134222			
Analista 2					
Entre dias –	2	0,9264489	0,463244	2,6948*	5,14
Resíduo	6	1,0314	0,1719		
Total	8	1,957889			

Tabela 5. Análise da variância das absorvâncias dos resultados obtidos nos doseamentos de sibutramina durante três dias pelo Analistas 1 e 2. * Não significativo ($p>0,05$).

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F.C	F.T
primeiro dia					
Entre dias e Analistas	1	0,040017	0,040017	1,4360*	5,14
Resíduo	4	0,111467	0,027867		
Total	5	0,151483			
segundo dia					
Entre dias e Analistas	1	0,041667	0,041667	0,1861*	5,14
Resíduo	4	0,895467	0,223867		
Total	5	0,937133			
terceiro dia					
Entre dias e Analistas	1	0,0726	0,0726	0,3234*	5,14
Resíduo	4	0,897733	0,224433		
Total	5	0,970333			

Tabela 6. Análise da variância das absorvâncias dos resultados obtidos nos doseamentos de sibutramina no primeiro, segundo e terceiro dia pelos Analistas 1 e 2.* Não significativo ($p>0,05$).

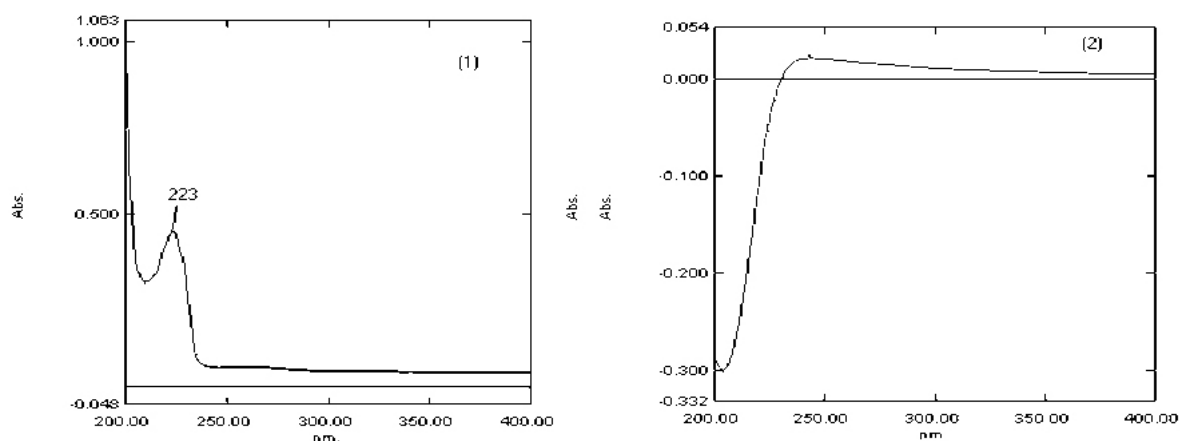


Figura 3. Espectros de absorção molecular na região do ultravioleta das soluções de sibutramina SQR (1) e amostras simuladas de excipientes das cápsulas (2), na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes das cápsulas na determinação quantitativa da sibutramina. De acordo com os es-

pectros obtidos para a SQR e a respectiva amostra simulada das cápsulas (Fig. 3), constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência dos excipientes no comprimento de onda de máxima absorção.

Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da sibutramina. Os valores obtidos para o LD e LQ foram de 0,40 µg/ml e 1,22 µg/ml, respectivamente, indicando boa sensibilidade do método.

CONCLUSÕES

O método para determinação de sibutramina na sua forma farmacêutica, cápsulas, foi validado conforme a resolução 899/2003 e pelas recomendações internacionais. Os resultados obtidos mostram que o método é simples, preciso e exato para a determinação de sibutramina, conferindo a confiabilidade exigida para um método analítico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray, G.A. (1989) *Disease-a-month* **35**: 454-537.
2. Bray, G.A., D.H. Ryan; D. Gordon; S. Heidingsfelder; F. Cerise & K.A. Wilson (1996) *Obes. Res.* **4**: 263-70.
3. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1996) *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. U.S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research.
4. The United States Pharmacopeia 29 ed. (2006) United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland, U.S.A.
5. Brasil (2003) *Guia para validação de métodos analíticos*. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899.
6. Farmacopéia Brasileira IV (1988) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. Atheneu SP, Brasil.