

Revista da Graduação

Vol. 5

No. 1

2012

16

Seção: Faculdade de Farmácia

**CO-VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO
DE TEOR DE FOLINATO DE CÁLCIO, EM FORMULAÇÃO
FARMACÊUTICA**

**Fernanda Luiza Egevarth Mörschbacher, Airtton Monza da
Silveira, Angélica Abido, Olivia Werner Oliveira**

Este trabalho está publicado na Revista da Graduação.

ISSN 1983-1374

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/11413>

Co-validação de metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação de teor de folinato de cálcio, em formulação farmacêutica

Fernanda Luiza Egevarth Mörschbacher¹

Airton Monza da Silveira²

Angélica Abido³

Olivia Werner Oliveira⁴

fernanda_lem@yahoo.com.br, airton.silveira@puccrs.br, angerlz@yahoo.com.br, oli_wo@hotmail.com

RESUMO

O presente trabalho consiste na co-validação de metodologia analítica para quantificar folinato de cálcio em formulação farmacêutica sob forma de pó estéril injetável, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, especificidade e seletividade. Os resultados obtidos se mostraram satisfatórios, considerando os critérios de aceitação da Resolução 899/2003 da ANVISA, demonstrando que o método cromatográfico é linear, preciso, específico e seletivo.

Palavras – Chave: Folinato de Cálcio; Co-validação; CLAE.

ABSTRACT

The present work consists of the co-validation of analytical methodology to quantify calcium folinate in a pharmaceutical formulation in the form of sterile powder for injection, using the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). The parameters were evaluated for linearity, precision, specificity and selectivity. The results obtained were satisfactory, considering the acceptance criteria of Resolution 899/2003 of ANVISA, demonstrating that the chromatographic method is linear, precise, specific and selective.

Keywords: Calcium Folate; Co-validation; HPLC.

INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como uma enfermidade multicausal crônica, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células. Seu desenvolvimento envolve alterações do DNA celular, que se acumulam com o tempo. Quando essas células lesadas escapam dos mecanismos envolvidos na proteção do organismo contra o crescimento e a disseminação das mesmas, é estabelecida uma neoplasia. (OLIVEIRA et al., 2010).

Importante causa de doença e morte no Brasil, o câncer é a segunda causa de morte por doença (PINHO et al., 2004; BRASIL, 2009), representando quase 17% dos

óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 (BRASIL, 2009).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as estatísticas apontam para a ocorrência de cerca de 490.000 casos novos de câncer por ano. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (BRASIL, 2009).

O desenvolvimento de fármacos com ações sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação é importante do ponto de vista clínico, pois estes agentes são muito estudados e clinicamente empregados (ALMEIDA et al., 2005). Dentre os

¹ Acadêmica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do RS – Porto alegre.

² Professor da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do RS – Porto alegre.

³ Farmacêutica no Laboratórios Libra do Brasil S.A. – Porto Alegre.

⁴ Farmacêutica no Laboratórios Libra do Brasil S.A. – Porto Alegre.

antimetabólitos usados clinicamente para o tratamento de câncer pode ser citado o metotrexato.

Pertencente ao grupo de medicamentos conhecidos como antimetabólitos (USP, 2011), o metotrexato é um agente antineoplásico usado para tratar vários tipos de câncer, entre os quais: leucemia linfóide aguda, câncer de mama, leucemia meníngea, neoplasias trofoblásticas gestacionais, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão, linfomas não-Hodgkin e osteossarcoma (MICROMEDEX, 2011).

O metotrexato tem alta afinidade pela hidroxifolato redutase, enzima necessária para a conversão do ácido dihidrofólico em sua forma ativa (ácido tetrahidrofólico), importante para formação de purinas e timidinas. Consequentemente há inibição da síntese do DNA, ou seja, os componentes celulares, especialmente o DNA, não são duplicados e ocorre morte celular (BITTENCOURT, 2006). Isto interfere no crescimento de células normais do corpo que também podem ser afetadas (USP, 2011). Esse efeito pode ser contrabalançado pela administração de ácido fólico, forma reduzida de ácido fólico (BITTENCOURT, 2006).

Quando há risco de toxicidade pelo metotrexato, administra-se ácido fólico, que promove a recuperação da atividade celular, resultando na restauração de folatos reduzidos para a síntese de DNA (LELES, 2008).

O ácido fólico é geralmente administrado sob a forma de folinato de cálcio.

O folinato de cálcio, de nome químico (*N*-[4-[[[2-amino-5-formil-1,4,5,6,7,8-hexaidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-glutâmico (1:1)) (Figura 1) é um antídoto aos antagonistas do ácido fólico, de fórmula molecular $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ e peso molecular 511,5 g/mol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).

Figura 1

O folinato de cálcio é usado como antídoto (MICROMEDEX, 2011; USP, 2011) para efeitos nocivos do metotrexato, o qual é administrado em doses elevadas. Além disso, o folinato de cálcio também é utilizado para prevenir ou tratar certos tipos de anemia, e também é usado juntamente com fluoruracila para tratar o câncer do cólon (intestino) (USP, 2011).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2011).

Metodologias analíticas que não estão descritas em farmacopéias ou formulários oficiais deverão ser validadas. Quando o método já se encontra validado ou apresenta monografia oficial, é necessário realizar apenas

uma validação parcial do método (co-validação), de modo a comprovar que estes resultados podem ser reproduzidos com os equipamentos disponíveis no laboratório onde será aplicada a metodologia. (BRASIL, 2003).

Quando a metodologia é transferida da matriz para suas subsidiárias no Brasil, a metodologia será considerada validada, desde que seja avaliada a linearidade, precisão, especificidade e seletividade (BRASIL, 2003).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a validação parcial (co-validação) da metodologia analítica para determinação do teor de folinato de cálcio em formulação farmacêutica, a qual foi transferida da matriz em Montevideu para a sua filial no Brasil, no Laboratório Libra do Brasil S.A., localizada em Porto Alegre.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

O padrão secundário de folinato de cálcio foi fornecido pelo Laboratório Libra Montevideu, com certificado de análise, e quantificado frente a um padrão primário USP. Foram utilizadas amostras de Lifolin[®], pó estéril injetável, lote 0110548. Os reagentes utilizados no preparo da fase móvel foram acetonitrila grau HPLC, água purificada através de sistema Milli-Q para uso em CLAE. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência da marca Shimadzu constituído de bomba LC – 10 AT VP, FCV – 10 AL VP, degaseificador DGU – 14A, forno CTO-10AS VP, controladora SCL-10A VP e detector SPD-M10A VP (arranjo de fotodiodos), com gerenciamento de dados externos por meio de programa computacional - Software CLASS-VP versão 6.14 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Foi utilizada uma coluna Kromasil C18, 250 mm de comprimento com 4,0 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 5 µm.

1.2 METODOLOGIA

A co-validação da metodologia analítica foi realizada segundo os critérios propostos pela resolução da ANVISA RE n° 899, de 29/5/2003. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão intermediária, repetibilidade e seletividade/especificidade.

O fluxo do eluente foi de 2,0 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 15 µL e a detecção foi realizada em comprimento de onda de 254 nm. A coluna foi mantida a uma temperatura de 40 °C.

A fase móvel foi constituída de uma mistura de 15 mL de uma solução de hidróxido de tetrabutilamônio 1 M (em metanol), 125 mL de acetonitrila e água Milli-Q em quantidade suficiente para 1000,0 mL de solução. O pH da solução foi ajustado a 7,5 (±0,1) utilizando-se uma solução de fosfato monobásico de sódio 2 N. Antes da

utilização, a fase móvel foi filtrada através de filtro 0,45 µm e degaseificada.

Para a avaliação da linearidade, foram construídas três curvas de calibração contendo cinco níveis de concentração (0,044, 0,132, 0,220, 0,308 e 0,352 mg/mL) em cada uma delas, sendo a última diluição realizada com fase móvel. As amostras foram filtradas através de membrana com 0,45 µm de poro antes das análises e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas obtidas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação.

A repetibilidade (precisão intra-corrída) do método foi avaliada preparando-se seis soluções de igual concentração teórica, correspondente a 100% da concentração do teste, durante o mesmo dia e sob as mesmas características experimentais. Foram realizadas seis corridas para cada solução do padrão e três corridas para cada solução amostra. O resultado das análises foi expresso como desvio padrão relativo (DPR).

A avaliação da precisão intermediária (precisão inter-corrídas) foi realizada por meio da determinação do teor de quatro soluções da amostra de igual concentração teórica, preparadas por dois analistas diferentes e em dois dias diferentes, calculando-se posteriormente o DPR (%) dos resultados das determinações.

A precisão do sistema analítico foi avaliada por meio DPR obtido do resultado de dez corridas de uma mesma solução amostra e padrão, contendo o correspondente a 100 % da concentração final da solução, com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A especificidade foi avaliada a partir da comparação dos resultados das eluições cromatográficas das seguintes amostras: diluente, amostra, padrão, e amostra armazenada em estufa a 60 °C por 24 horas. Em laboratório terceirizado, soluções da amostra foram contaminadas com soluções ácidas, básicas e oxidantes. Foi avaliada a pureza do pico, a qual garante que não há sobreposição de dois ou mais picos e que estejam fornecendo um falso resultado.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 SELETIVIDADE / ESPECIFICIDADE

O pico referente à folinato de cálcio está apresentado nas Figuras 2 e 3. Como pode ser observado, o tempo de retenção do fármaco foi de aproximadamente 5,7 minutos. A assimetria foi de 0,97, a eficiência do sistema foi em torno de 1700 pratos teóricos e pureza do pico igual a 1,0000, verificada com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos.

Figura 2

Figura 3

Na Figura 4, pode-se observar que não há picos que possam interferir no pico do princípio ativo, ou seja,

que tenham os mesmos tempos de retenção. Os resultados do ensaio de estresse estão demonstrados na tabela 1, os quais mostram que a amostra apresentou variação maior que 10% na recuperação com a adição de agente oxidante.

Figura 4

Tabela 1

2.2 LINEARIDADE

O estudo da linearidade do método analítico foi realizado por meio de análise de variância ANOVA (Tabelas 2 e 3 e Figura 5), verificando-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$) com injeção de concentrações compreendidas entre 0,044 e 0,352 mg/mL, em triplicata. O coeficiente de correlação linear encontrado para a curva média foi de 1,00, sendo que o mínimo aceitável, segundo a RE 899 de 2003 da ANVISA, é de 0,99 (BRASIL, 2003). Estes valores foram calculados considerando a equação da reta ($y = ax + b$), onde x é a concentração teórica da amostra em mg/mL e y é o valor da área obtida nas leituras das amostras. A curva de calibração média pode ser observada na Figura 6.

Tabela 2

Tabela 3

Figura 5

Figura 6

2.3 REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR). Segundo a RE 899/2003, o método é considerado preciso quando o DPR é inferior a 2,0% (BRASIL, 2003). O método apresentou-se preciso com um DPR de 0,56 % para o padrão de leucovorina e 1,68 % para a amostra (Tabela 4), ambos inferiores ao especificado na resolução.

Tabela 4

2.4 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão intermediária foi avaliada em dois dias consecutivos, por dois analistas diferentes. Este parâmetro foi avaliado a partir da análise do teor de quatro soluções de amostra de igual concentração teórica. De acordo com a RE 899/2003, em relação à precisão inter-corrídas, se aceita um coeficiente de variação de até 5,0 % entre os resultados encontrados pelos dois analistas, com análises realizadas em dias diferentes (BRASIL, 2003). O método apresentou-se preciso com um desvio padrão

relativo (DPR) de 0,89%, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5

2.5 PRECISÃO DO SISTEMA

Segundo a legislação vigente, o sistema é considerado preciso quando o coeficiente de variação entre as leituras da mesma amostra for igual ou inferior a 2,0 % (BRASIL, 2003). Foram avaliadas as áreas e o tempo de retenção de dez corridas consecutivas da solução de padrão de leucovorina e da solução da amostra. A partir da análise dos resultados obtidos, os quais estão demonstrados na Tabela 6, pode-se considerar o sistema preciso.

Tabela 6

CONCLUSÃO

A metodologia analítica proposta para quantificação de folinato de cálcio por CLAE mostrou-se seletiva/específica, precisa e linear na faixa de concentração entre 0,044 e 0,352 mg/mL, sendo adequada para avaliação do fármaco na forma farmacêutica de pó estéril injetável e comprovando que esta metodologia pode ser reproduzida com os equipamentos disponíveis e condições utilizadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Vera Lúcia de; LEITÃO, Andrei; REINA, Luisa del Carmen Barret; MONTANARI, Carlos Alberto; DONNICI, Claudio Luis. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**, Belo Horizonte, vol. 28, n. 1, p. 118-129, jan./fev. 2005.

BITTENCOURT, Henrique Neves Silva. BRUNSTEIN, Cláudio Garcia. Fármacos antineoplásicos. In: FUCHS, Flávio Danni. WANNMACHER, Lenita. FERREIRA, Maria Beatriz C. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 502-531.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 02. jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Volume 2. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 04 – JULHO/2011. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 28/08/2011.

LELES, Raphael Nunes. **Monitoração Terapêutica do Metotrexato sob Altas Doses, em Pacientes Portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade da Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2008.

MICROMEDEX. New York: Thomson Healthcare. 1974-2011. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em 01/10/2011.

USP. UNITED STATES Pharmacopeia and the National Formulary (USP 34 - NF 29). Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention, 2011.

OLIVEIRA, Helena Simões Dutra de; BONETI, Rochele da Silva; PIZZATO, Alessandra Campani. Imunonutrição e o tratamento do câncer. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 3, n. 2, p. 59-64, jul./dez. 2010.

PINHO, Nivaldo Barroso de et al. **Manual de nutrição oncológica: bases clínicas**. São Paulo: Atheneu; 2004. 218 p.

AGRADECIMENTOS

Figuras e Tabelas

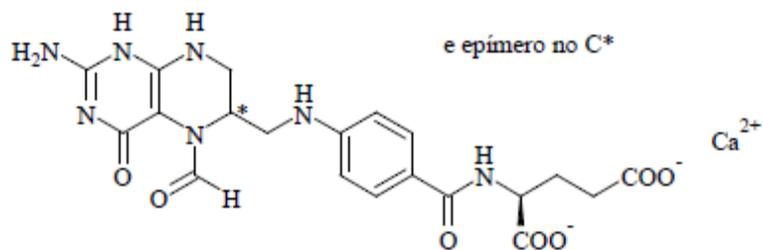


Figura 1 - Estrutura química do folinato de cálcio
Fonte: Farmacopéia Brasileira V

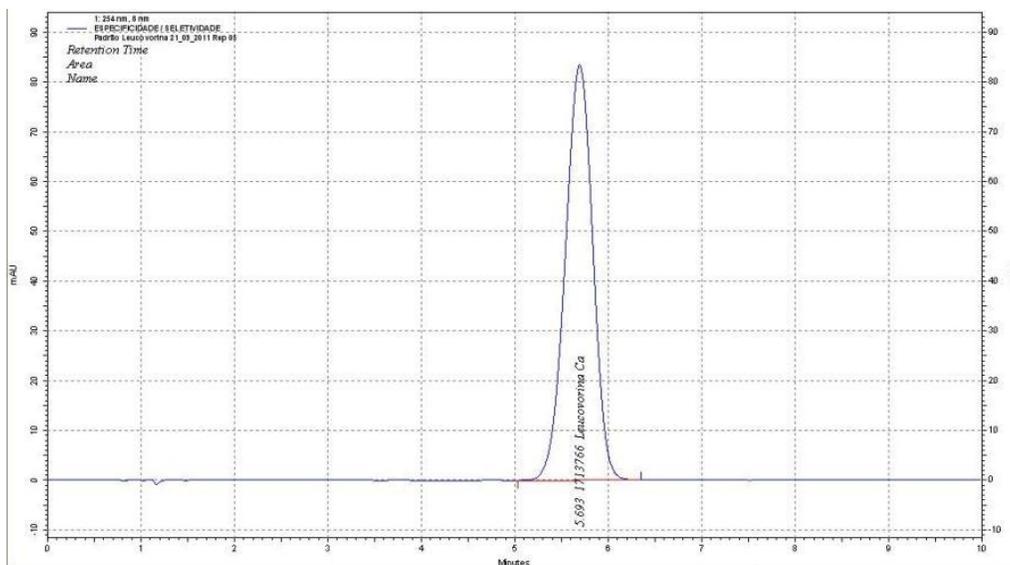


Figura 2 - Cromatograma do folinato de cálcio

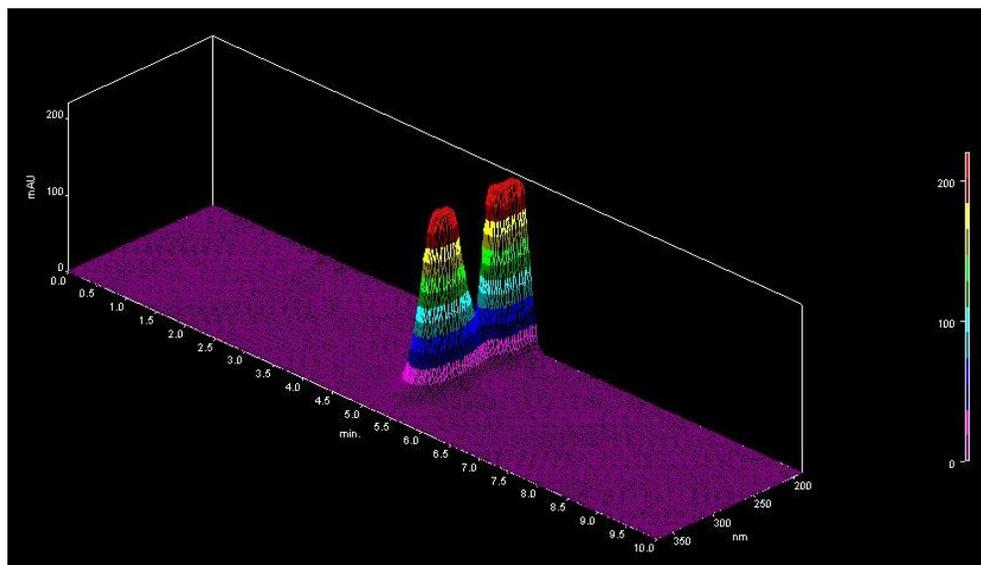


Figura 3 - Cromatograma em três dimensões do folinato de cálcio

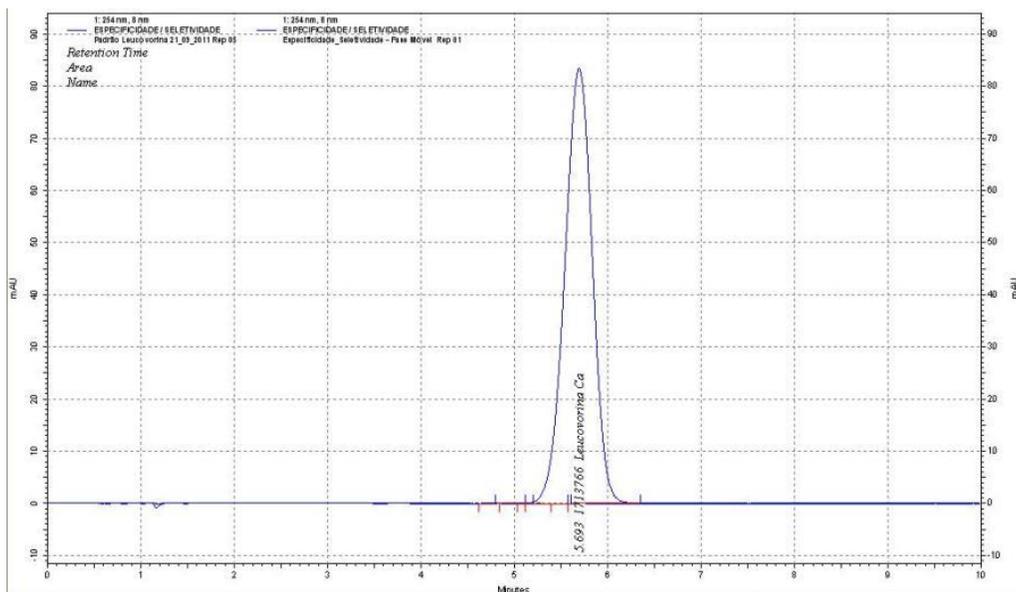


Figura 4 - Sobreposição de cromatogramas – folinato de cálcio e “branco” (fase móvel). Na cor azul, o cromatograma referente ao folinato de cálcio e o “branco” (fase móvel) representado na cor roxa.

Tabela 1 – Resultados das amostras armazenadas sob condições de estresse: Temperatura, Hidrólise alcalina, Hidrólise ácida e Oxidação ao oxigênio

Agente	Condições	Diferença de quantificação (%)	Pureza cromatográfica (%)
Temperatura	60 °C / 24 horas – embalagem primária	1,2	99,7
Hidrólise alcalina	Adição de 1 mL de solução de NaOH em solução de amostra	3,2	99,9
Hidrólise ácida	Adição de 1 mL de solução de HCl em solução de amostra	3,6	99,9
Oxidação ao oxigênio	Adição de 1 mL de solução de H ₂ O ₂ em solução de amostra	74,0	99,4

Tabela 2 - Regressão linear da curva de folinato de cálcio (ANOVA)

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	10952,50	2858,76	3,8312	0,0313349	1854,66	20050,36
Variável X 1	7953657,68	11872,77	669,9072	7,33539E-09	7915873,22	7991442,15

Tabela 3 - Teste F

	GI	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	4,0685E+12	4,0685E+12	448775,7667	7,33539E-09
Resíduo	3	27197298,45	9065766,151		
Total	4	4,06852E+12			

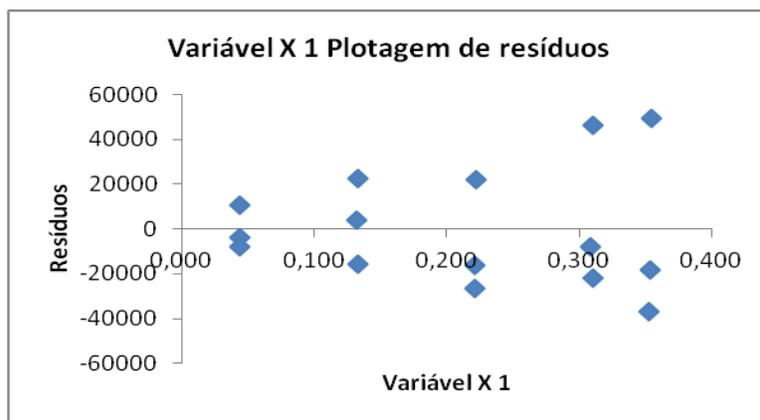


Figura 5 - Variável X1 plotagem de resíduos

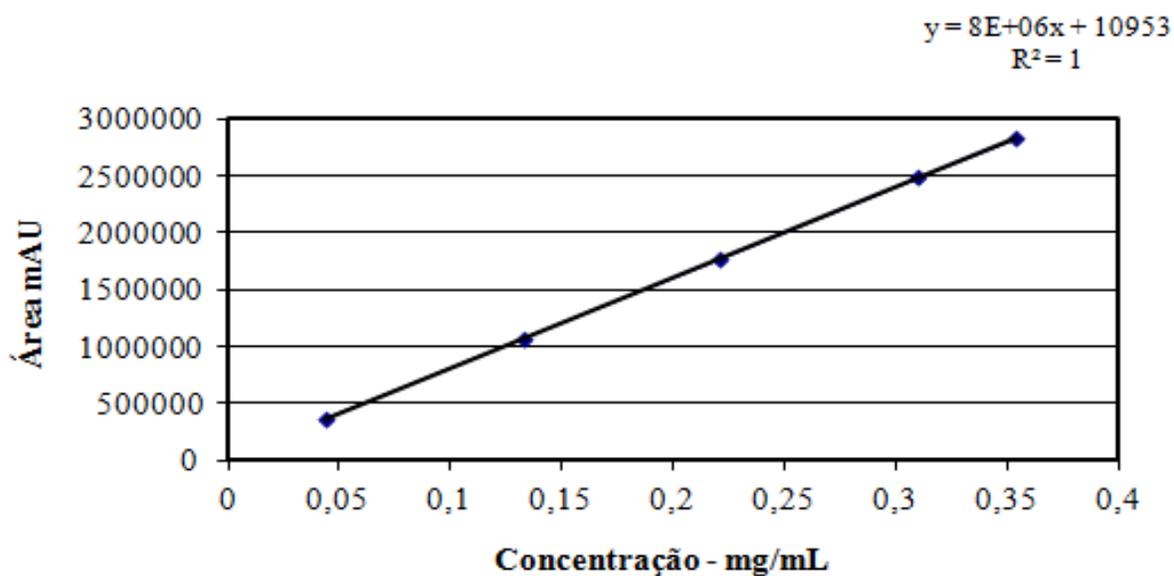


Figura 6 - Curva de calibração de folinato de cálcio

Tabela 4 - Resultados de repetibilidade

Solução	DPR (%) Padrão de folinato de cálcio (6 corridas para cada solução)	DPR (%) Amostras de Lifolin® (3 corridas para cada solução)
1	0,14	0,68
2	0,80	0,71
3	0,10	0,39
4	0,11	0,06
5	0,65	0,12
6	0,60	0,44
DPR (%)	0,56*	1,68**

* média de 36 corridas; ** média de 18 corridas

Tabela 5 - Resultados de precisão intermediária – Analistas 1 e 2

Amostra	Teor (%)		DPR (%) (3 corridas para cada amostra)	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
	1	108,02	108,75	0,1511
2	106,00	107,10	0,0247	0,7058
3	107,10	106,75	0,0288	0,2187
4	106,17	107,88	0,0391	0,0827
Média (%)	106,82	107,62	0,80	0,84
Média entre analistas (%)	107,22		0,8867	

Tabela 6 - Resultados de precisão do sistema – áreas e tempos de retenção

Corrida	Áreas		Tempos de retenção	
	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra
1	1790550	1760381	5,533	5,220
2	1787018	1753505	5,528	5,224
3	1784336	1757618	5,535	5,206
4	1790938	1753446	5,529	5,212
5	1786317	1753684	5,534	5,214
6	1788111	1755436	5,527	5,212
7	1792804	1753678	5,532	5,212
8	1792337	1753212	5,527	5,205
9	1787042	1751763	5,526	5,204
10	1787227	1753484	5,519	5,203
Média	1788668	1754621	5,529	5,211
DPR (%)	0,16	0,15	0,09	0,13