
Verificação da estabilidade de solução padrão de etinilestradiol utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Fernanda Fernandes FARIAS, Stela Fernandes HIDALGO, Valéria Adriana Pereira MARTINS, Helena Miyoco YANO, Luz Marina TRUJILLO

Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos – Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz

Os contraceptivos têm grande relevância na saúde da mulher principalmente como coadjuvante do planejamento familiar, sendo o etinilestradiol ((17 α)-19-Norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17-diol [57-63-6]), o componente estrogênico utilizado em quase todas as formulações modernas de contraceptivos orais combinados¹. O etinilestradiol possui peso molecular de 296,4 g/mol, alta lipofilicidade, baixa solubilidade em água (4,8 mg/L a 20 °C) e pKa de 10,34².

O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza gratuitamente, mediante prescrição médica, contraceptivos contendo etinilestradiol + levonorgestrel (0,03 mg + 0,15 mg), conforme consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais³.

Devido à ampla utilização e importância para o SUS, medicamentos contendo etinilestradiol estão sujeitos à fiscalização em razão de queixas técnicas e ao monitoramento da qualidade por órgãos da Vigilância Sanitária. Em ocasiões diversas ocorreram os seguintes programas de monitoramento: Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos, coordenado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), e Programa Saúde da Mulher, coordenado pelo Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo. Contraceptivos contendo na formulação etinilestradiol também são analisados em

perícias judiciais, demandadas pelo Tribunal de Justiça do Estado de São Paulo, para instruir processos em casos de contestação da qualidade, eficácia e segurança por parte de um consumidor ou de uma instituição de saúde.

Neste contexto, o Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos (NFQM) do Instituto Adolfo Lutz (IAL), exerce papel fundamental de controle e de sustentação à fiscalização, por meio de testes laboratoriais em medicamentos colhidos para análises fiscais e quando encaminhados pelo Poder Judiciário⁴.

Este estudo surgiu frente à necessidade de conhecer a estabilidade da solução padrão de etinilestradiol usada nos ensaios de identificação e de teor do fármaco, em razão das análises de medicamentos contraceptivos que, na maioria das vezes, podem se estender por mais de uma semana durante as perícias judiciais.

O objetivo deste estudo foi verificar a estabilidade da solução de Substância Química de Referência (SQR) de etinilestradiol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em condições definidas pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição⁵, de modo a contribuir com dados de estabilidade das soluções de padrão de trabalho na rotina das análises do Núcleo.

Foi empregada SQR de etinilestradiol procedente da *United States Pharmacopeia* (USP), lote R0M195. Utilizou-se Cromatógrafo

Waters modelo Alliance 2695 (Mildford, MA, USA) e software Empower 3. O método foi composto por coluna cromatográfica Waters Spherisorb® C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) em temperatura ambiente; a fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila e água ultrapurificada na proporção 1:1 (v/v); fluxo 1 mL/min; volume de injeção de 25 µL e detecção UV a 280 nm⁵.

Foram pesados 10 mg de etinilestradiol e diluídos com fase móvel em balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se solução na concentração de 0,2 mg/mL (SQR1). Esta foi filtrada e injetada duas vezes em cromatógrafo líquido (dia 1). Em seguida, a solução foi mantida sob refrigeração entre 4 e 5 °C, conforme procedimento adotado na rotina laboratorial do NFQM. A cada dia preparava-se uma nova solução comparando-se com a solução inicial do primeiro dia. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 15. Toda a fase móvel foi preparada no primeiro dia de análise, a fim de evitar desvios quanto à composição.

A massa do padrão pesada em cada dia foi corrigida conforme certificado da SQR (USP Certificate), com valor de 99,8% de etinilestradiol. Os cromatogramas foram comparados entre si por meio da sobreposição pelo software Empower 3. Embora no 15º dia não tenha havido sobreposição exata do pico como nos demais dias, conforme apresentado na Figura 1, todos revelaram precisão nas áreas, sendo a diferença do tempo de retenção não significativa.

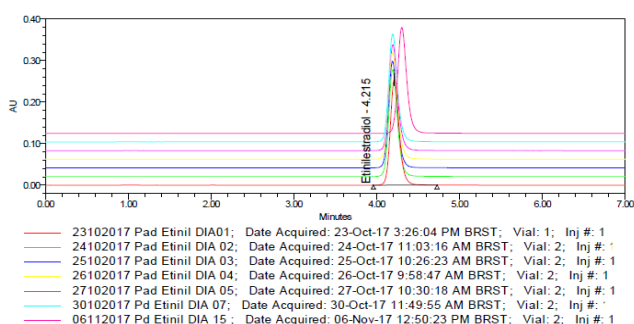


Figura 1. Sobreposição dos cromatogramas evidenciando os picos de etinilestradiol

Para evidenciar a estabilidade da solução utilizada ao longo de 15 dias, realizou-se um tratamento estatístico com auxílio do programa Minitab. Com os dados da Tabela 1, fez-se o teste para avaliação da normalidade de Ryan-

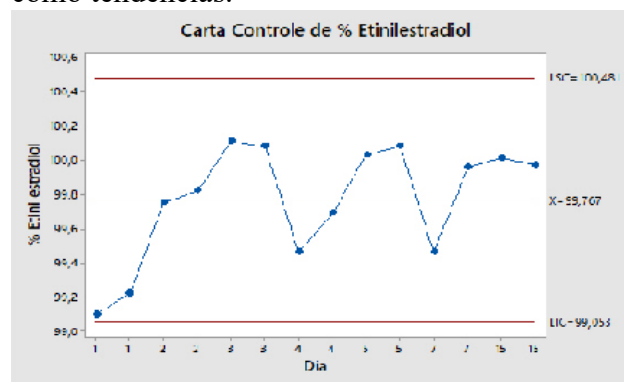
Joiner (similiar ao Shapiro-Wilk), considerando $\alpha = 0,01$. Ao obter um valor p igual a 0,088, ou seja, maior que α , pode-se concluir que os dados são provenientes de uma distribuição normal.

Tabela 1. Teores em porcentagem de etinilestradiol por dia de teste

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 7	Dia 15
Ethinilestradiol	99,10	99,75	100,11	99,46	100,03	99,46	100,01
(%)	99,22	99,82	100,08	99,69	100,08	99,96	99,97

Confirmando a normalidade dos dados, realizou-se o teste de Grubbs ($\alpha = 0,05$) para verificar a existência ou não de resultados anômalos (*outliers*). Com um valor p obtido igual a 0,453, conclui-se que não há nenhum *outlier* no nível de significância de 5%.

Por fim, os dados foram plotados em um gráfico do tipo carta controle para a verificação da existência de variações de causa especial, como tendências.



Legenda: LSC: Limite Superior de Controle;
LIC: Limite Inferior de Controle

Figura 2. Gráfico de dispersão dos teores de etinilestradiol por dia

Na Figura 2 pôde-se constatar que as diferenças do teor de etinilestradiol foram relacionadas apenas ao primeiro dia e que não houve tendência de redução do mesmo nos dias subsequentes. Assim, pela observação do gráfico é possível afirmar que não houve degradação do analito durante o período de estudo. A estabilidade das soluções foi, portanto, comprovada pelo período de 15 dias em acetonitrila e água (1:1), sob refrigeração entre 4 e 5 °C, para o ensaio de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição, 2010⁵.

O estudo demonstrou que a solução de etinilestradiol preparada para o ensaio de teor do fármaco por CLAE pode ser estocada pelo período proposto, otimizando a análise e com

perspectiva de redução de gastos com SQR e outros insumos.

REFERÊNCIAS

1. Lucena WS. O fármaco 17 α -etiniestradiol: seus possíveis efeitos a saúde humana e animal por exposições ambientais [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz; 2013.

2. Barreiro EJ, Fraga CAM. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. 3.ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2015.

3. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_rename_2017.pdf

4. Presidência da República (BR). Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 27 ago 1977. Seção 1:11145.

5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. v.1. Brasília (DF); 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf