

Artigo de pesquisa tecnológica/ <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.96964>

Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para determinação simultânea de atorvastatina, losartana e metformina em formulações farmacêuticas magistrais

Mirella Carla Galana Gerlin¹, Teófilo Fernando Mazon Cardoso¹, João Batista Gomes de Souza², Adriano Cesar de Moraes Baroni¹, Marcos Serrou do Amaral³, Nájla Mohamad Kassab^{*1}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79070-900, Campo Grande (MS), Brasil.

²Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79070-900, Campo Grande (MS), Brasil.

³Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, 79070-900, Campo Grande (MS), Brasil.

*nmkassab@gmail.com

Recibido: 4 de julio de 2021

Corregido: 11 de enero de 2022

Aceptado: 18 de enero de 2022

RESUMO

Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para determinação simultânea de atorvastatina, losartana e metformina em formulações farmacêuticas magistrais

Objetivos: Desenvolver e validar um método analítico para a análise simultânea de atorvastatina (ATO), losartana (LOS) e metformina (MTF) em formulações farmacêuticas magistrais por CLAE. **Método:** O método foi desenvolvido empregando o cromatógrafo a líquido modelo Dionex® Ultimate 3000, acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) e a validação se deu conforme compêndios de validação internacional e nacional. Os seguintes parâmetros foram analisados: linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, LD e LQ. A separação cromatográfica foi realizada na coluna Sigma-Aldrich¹ C18, fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3,0 e vazão de 0,3 mL·min⁻¹, modo isocrático. As detecções foram realizadas nos comprimentos de onda de 225 nm (LOS), 236 nm (MTF) e 246 nm (ATO). **Resultados:** O método foi linear, com coeficientes de correlação linear (r) > 0,99 para

todos os fármacos, preciso (DPR entre medidas < 2 %), exato (recuperação entre 98-102 %). As variações propostas no estudo de robustez não tiveram influência significativa nos resultados, exceto a coluna cromatográfica. O método foi seletivo, pois os excipientes não interferiram nas análises. A sensibilidade do método foi demonstrada através da determinação teórica dos LD e LQ. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem que o método cromatográfico desenvolvido e validado nessa pesquisa poderá ser empregado nas análises de rotina dos laboratórios de controle de qualidade de medicamentos contendo esses fármacos de forma isolada ou combinados em formulações farmacêuticas de uso oral.

Palavras-chave: Anti-hipertensivos; antidiabéticos; antilipêmicos, controle de qualidade; HPLC

SUMMARY

Development and validation of an analytical method by HPLC for the simultaneous determination of atorvastatin, losartan and metformin in compounded pharmaceutical formulations

Aims: To develop and validate an analytical method for the simultaneous analysis of atorvastatin (ATO), losartan (LOS), and metformin (MTF) in pharmaceutical compounding by HPLC. **Method:** The method was developed using a liquid chromatograph model Dionex® Ultimate 3000, coupled to a diode array detector (DAD), and validation was carried out according to international and national validation compendiums. The following parameters were analyzed: linearity, precision, accuracy, robustness, selectivity, LD, and LQ. Chromatographic separation was performed on a Sigma-Aldrich® C18 column, mobile phase MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3.0, and flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, isocratic mode. Detections were performed at 225 nm (LOS), 236 nm (MTF), and 246 nm (ATO) wavelengths. **Results:** The method was linear, with linear correlation coefficients (r) > 0.99 for all drugs, precise (DPR between measurements < 2 %), accurate recovery (between 98-102 %). The variations proposed in the robustness study had no significant influence on the results, except for the chromatographic column. The method was selective, as the excipients did not interfere in the analyses. The sensitivity of the method was demonstrated through the theoretical determination of LD and LQ. **Conclusion:** The results obtained suggest that the chromatographic method developed and validated in this research can be used in the routine analyzes of quality control

laboratories of drugs containing these drugs alone or combined in pharmaceutical formulations for oral use.

Keywords: Antihypertensive; antidiabetics; antilipemic, quality control; HPLC

INTRODUÇÃO

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) constituem importante problema de saúde pública no mundo, por serem a principal causa de morte da população. As DCNTs respondem pelas incapacidades dos indivíduos, baixa qualidade de vida, sobrecarga dos sistemas de saúde, aumento dos gastos com assistência médica e previdência social. [1, 2]. As DCNTs têm preocupado a comunidade científica, pois a projeção para o ano de 2030 é de que estas responderão por 52 milhões de mortes global [3, 4]. A hipertensão arterial (HA), hipercolesterolemia e diabetes mellitus são consideradas as principais DCNTs [5].

O tratamento medicamentoso a custo aceitável possibilita controlar as DCNT, reduzindo a morbimortalidade melhorando a qualidade de vida das pessoas [6]. Fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos associados em uma mesma formulação, têm sido frequentemente prescritos e preparados de forma magistral [7]. A possibilidade de adquirir medicamentos com menor custo, diferentes dosagens e forma farmacêutica individualizada tem feito os consumidores procurarem as farmácias de manipulação [8-10]. Todavia, potenciais interações podem afetar a natureza química dos compostos, a solubilidade, a estabilidade das formulações e, podem ainda, afetar a segurança, eficácia e biodisponibilidade do medicamento [11].

Várias pesquisas relacionadas ao controle de qualidade vêm sendo realizadas, como o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis [12-14]. Apesar disso, não foi encontrado na literatura científica, até o momento, métodos analíticos para associação ternária de fármacos antidiabéticos, anti-hipertensivos e antilipêmicos na mesma formulação. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) para a determinação quantitativa e simultânea de atorvastatina (ATO), losartana (LOS) e metformina (MET) em formulações farmacêuticas magistrais.

O LOS, quimicamente chamado de 2-Butyl-4-chloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-metanol, é um fármaco da classe dos antagonistas do receptor de angiotensina II (tipo AT1) utilizado para o tratamento da HA [3], apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade [15]. Trata-se de um fármaco

que possui dois pKas: $pK_{a1} = 3,85$ (base) e $pK_{a2} = 5,85$ (ácido), com aparência de um pó branco cristalino ou quase branco, facilmente solúvel em água, ligeiramente solúvel em isopropanol e pouco solúvel em acetonitrila, possui porcentagem de umidade $\leq 0,5\%$, com faixa de fusão em torno de $263\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $265\text{ }^{\circ}\text{C}$ [16]. A forma molecular do losartana é $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClKN}_6\text{O}$ e massa molar de $422,91\text{ g/mol}$ [10]. A figura 1A ilustra a estrutura química do LOS.

O ATO, quimicamente chamado de $[R-(R^*,R^*)]-2-(4\text{-Fluorofenil})-\beta,\delta\text{-dihidroxi}-5-(1\text{-metiletil})-3\text{-fenil}-4-[(\text{phenilamino})\text{carbonil}]-1H\text{-pirrol}-1\text{-ácido heptanóico}$, é um fármaco da classe das estatinas, inibidor seletivo e competitivo da HMG-CoA redutase que reduz a produção do colesterol total [14, 17, 18]. É considerado um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade [4, 19, 20]. Apresenta-se como pó branco a quase branco, possui pK_a $4,31$ [21, 22], sendo muito pouco solúvel em água, pouco solúvel em etanol, levemente solúvel em acetonitrila e facilmente solúvel em metanol, com faixa de fusão entre $159,2$ e $160,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, pK_a $4,46$ e apresenta massa molar de $558,64\text{ g/mol}$ e fórmula molecular $\text{C}_{66}\text{H}_{68}\text{CaF}_2\text{N}_4\text{O}_{10}$ [11]. A figura 1B ilustra a estrutura química do ATO.

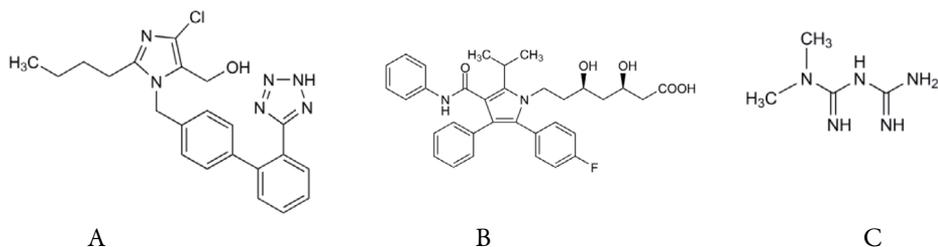


Figure 1. Estrutura química do Losartana (A), Atorvastatina (B) e metformina (C).

O MTF ou N,N -Dimetilimidodicarbonimidico diamida é um fármaco hipoglicemiante da classe das biguaninas empregado no tratamento de diabetes mellitus não insulino-dependente para controle glicêmico, que age através da diminuição da absorção intestinal de glicose [23, 24]. Esse fármaco é descrito como um pó branco cristalino, facilmente solúvel em água, pouco solúvel em álcool etílico, com faixa de fusão de $222\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $226\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20]. Possui dois pKas: $2,8$ e $11,5$, com massa molar de $=129,2\text{ g/mol}$ e fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5$ [11]. MTF é considerado fármaco alta solubilidade e baixa permeabilidade [22-24]. A figura 1C mostra a estrutura química da metformina.

MATERIAL E MÉTODOS

Substâncias padrão de referência (SPR) e solventes

As matérias-primas empregadas como SPR ou padrão secundário de referência foram: atorvastatina cálcica (ATO) com pureza de 98,75 % e metformina (MET) com 100,02% de teor, foram adquiridas da distribuidora Gemini¹, enquanto Losartana potássica (LOS) foi adquirida da SM Empreendimentos Farm LTDA², com pureza declarada de 99,12 %. Todas as matérias-primas vieram acompanhadas do certificado de análise dos fornecedores e foram empregadas como tal, sem qualquer processo de purificação.

As amostras comerciais em forma de cápsula gelatinosa dura foram adquiridas em três farmácias de manipulação do comércio local. A composição das três fórmulas continha a associação dos mesmos fármacos nas mesmas dosagens teóricas: ATO (40 mg), LOS (50 mg) e MTF (500 mg). As formulações continham como os excipientes principais lauril sulfato de sódio, aerosil, celulose microcristalina, amido e carbonato de cálcio. Metanol (MeOH) da marca Sigma-Aldrich³ e Dinâmica⁴ foram de grau espectroscópico e água ultrapura foi obtida por sistema de filtração Direct-Q 3 UV⁵ (18,2 $\mu\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, 25 °C - Merck Millipore⁶, a qual empregada para o preparo de água acidificada a pH 3,0 com ácido ortofosfórico (grau analítico - Dinâmica⁴).

EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O método foi desenvolvido e validado em um cromatógrafo modelo Dionex⁷ Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA), equipado com detector de arranjo 33 de diodos (DAD) modelo Ultimate 3000 conectado ao software Chromeleon⁸ 7.1 - Chromatography Data System, com “loop” fixo de 20 μL . As condições experimentais para a separação cromatográfica foram otimizadas com uma coluna Sigma-Aldrich³ C18 (100 mm x 4,6 mm, 5,0 μm), no modo isocrático e em temperatura ambiente (25 \pm 1,0 °C) com vazão de 0,3 mL \cdot min⁻¹. A fase móvel foi constituída por MeOH:H₂O ácida (78:22 v/v), pH 3,0 ajustada com ácido ortofosfórico, com o peagâmetro Hanna Instruments⁹ modelo pH/ORP Edge. Os comprimentos de onda empregados foram 246 nm para ATO, 225 nm para LOS e 236 nm para MTF. A injeção foi de 20 μL e o tempo de corrida analítica foi menor que 8 minutos.

A melhor condição cromatográfica foi determinada pela análise da conformidade do sistema, avaliando os parâmetros de pureza dos picos, o número de pratos, os fatores de assimetria, resolução e o tempo de retenção, conforme preconizado nos guias de validação de métodos cromatográficos [8].

Validação do método analítico

Para a validação do método cromatográfico desenvolvido, foram utilizados os seguintes guias como direcionamento: RDC 166/2017, a qual dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos, a *Internacional Conference on Harmonization (ICH)* e a *Association of Official Analytical Chemists International (AOAC)*, segundo os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), robustez e seletividade. Os resultados foram estatisticamente analisados através dos softwares Microsoft Excel¹ (Microsoft, Washington-EUA) e OriginPro 9.0¹ (OriginLab, Northampton-UK).

Parâmetros analíticos

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de curvas analíticas de calibração desenvolvida em triplicata à temperatura ambiente ($25 \pm 1,0$ °C). Foram preparadas soluções de cada matéria-prima (ATO, LOS e MTF), primeiramente diluída com MeOH, em balões volumétricos de 100 mL, a partir de suas massas acuradamente pesadas em balança analítica Shimadzu[®] Ay 220. Diluições quantitativas foram feitas com MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3,0, a fim de obter as seguintes concentrações de soluções estoques: 100,0 µg·mL⁻¹ para ATO, 150,0 µg·mL⁻¹ para LOS e 125,0 µg·mL⁻¹ para MTF. Posteriormente, alíquotas de 5 mL, 10 mL foram transferidas para balões de 50 mL e 100 mL, respectivamente, atingindo concentração de 10 µg·mL⁻¹ para ATO, 15 µg·mL⁻¹ para LOS e 125 µg·mL⁻¹ para MTF. Então, alíquotas desta última solução foram precisamente transferidas para balões volumétricos de 10 mL, onde os volumes foram completados com fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3,0. Assim, a faixa de concentração final para ATO foi de 1,0 a 9,0 µg·mL⁻¹, para LOS de 1,5 a 6,5 µg·mL⁻¹ e de 12,5 a 62,5 µg·mL⁻¹ para MTF.

Precisão (intermediária e repetibilidade)

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi obtida pela análise no mesmo dia e pelo mesmo analista em sextuplicatas da mesma solução preparada a partir da amostra comercial nas concentrações de 37,5 µg·mL⁻¹ de MTF, 3,75 µg·mL⁻¹ de LOS e 3,0 µg·mL⁻¹ de ATO conforme faixa linear do método. A precisão intermediária foi realizada por dois analistas em três dias diferentes nas mesmas concentrações utilizadas pela repetibilidade.

Exatidão

Este ensaio foi determinado através de análises de recuperação em três níveis de concentração (baixa, média, alta) para cada fármaco, em triplicata. Foram preparadas soluções a partir das amostras comerciais manipuladas contendo MTF, LOS e ATO em concentrações de 625, 62,5 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Em seguida, foram transferidas alíquotas da solução padrão preparada com as matérias-primas dos fármacos, a fim de obter soluções de concentração iguais a 37,5, 50,0 e 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para MTF; 3,75, 5,0 e 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para LOS e 3,0, 4,0 e 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ATO. Os volumes foram completados com a fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3,0 e as porcentagens de recuperações de cada fármaco foram calculadas conforme a equação de acordo com o guia [18].

A recuperação foi calculada de acordo com o indicado pela AOAC:

$$\% R = \frac{(C_a - C_{na})}{C_p} \times 100$$

Onde: c_a = Concentração de fármaco encontrada na amostra adicionada de padrão;
 C_{na} = concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão;
 C_p = concentração teórica de padrão.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites foram determinados teoricamente através das equações: $LD = 3,3 \sigma/c$ e $LQ = (10 \times \sigma) /c$, sendo LD para limite de detecção e LQ para limite de quantificação, onde σ representa o desvio padrão do intercepto com o eixo y e c é o coeficiente angular que representa a inclinação da curva de calibração.

Robustez

A robustez foi determinada em triplicata de injeções da solução amostra com as concentrações de 37,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de MTF, 3,75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LOS e 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ATO. Os fatores (“perturbadores”) do método e os respectivos níveis testados estão apresentados na tabela 1 conforme preconizado na RDC166/17 [19].

Tabela 1. Parâmetros analíticos “perturbadores” do método desenvolvido selecionados para teste de robustez

Fatores	Unidade	Limite	Modo normal	Modo variado
Fluxo da fase móvel	mL·min ⁻¹	± 0,05	0,3	± 0,02
pH da fase móvel	---	± 0,15	3,0	± 0,05
Composição da fase móvel	%	± 2	78:22	± 2%
Marca da coluna cromatográfica	---	---	Sigma aldrich [*]	Kinetex [*] , GI Science [*]
Temperatura da coluna cromatográfica	°C	± 2	25	± 2

Os efeitos causados pelos “perturbadores” do método analítico foram avaliados sobre as áreas e sobre as características dos picos cromatográficos. O desvio padrão relativo (DPR) estabelecidos como aceitável foi de no máximo 2 %. A média obtida com os parâmetros normais foi comparada com a média correspondente aos níveis modificados para assim determinar o impacto das variações propostas nos resultados obtidos.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de uma amostra simulada contendo apenas os excipientes utilizados nas formulações de das amostras manipuladas, com o intuito de avaliar a interferência destes sob o método desenvolvido. Assim, uma mistura de lauril sulfato de sódio, aerosil, celulose microcristalina, amido e carbonato de cálcio na concentração de 10 µg·mL⁻¹, foi preparada e injetada no cromatógrafo e o cromatograma resultante foi comparado com os cromatogramas das amostras comerciais, nos comprimentos de onda de interesse, isto é, 225 nm, 236 nm e 246 nm.

Controle de qualidade das amostras comerciais

Determinação do peso médio

Conforme RDC 67/2011, a determinação do peso médio foi realizada em três etapas: determinação do peso do invólucro, determinação do peso médio teórico e determinação da média e o desvio padrão relativo (DPR).

A determinação do peso do invólucro foi realizada pesando 20 cápsulas vazias separadamente e calculada a média. A determinação do peso médio teórico se dá pelo cálculo:

$$P_{\text{teórico}} = P_{\text{cápsulas vazias}} + P_{\text{excipientes}} + P_{\text{fármacos}}$$

Em seguida, foram pesadas 10 unidades das cápsulas da amostra comercial na balança analítica da Zhimadzu® AY 220, individualmente, sabendo-se que o DPR para cápsulas iguais ou maior que 300 mg não podem ter uma variação maior que 7,5 %. Utilizando a equação determinada em literatura.

Determinação do teor

A determinação do teor das amostras comerciais foi realizada através do método proposto e validado. A partir do valor do peso médio de cada amostra, foram preparadas soluções diluídas na fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3,0, contendo teoricamente 37,5 µg·mL⁻¹ de MTF, 3,75 µg·mL⁻¹ de LOS e 3,0 µg·mL⁻¹ de ATO. O cálculo do teor dos fármacos foi obtido utilizando as respectivas curvas de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conformidade do sistema cromatográfico e otimização do método

As condições cromatográficas que melhor eluíram os fármacos alvos desse estudo estão representadas na tabela 2. A figura 2 refere-se ao cromatograma de separação dos fármacos na coluna Sigma Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) com vazão de 0,3 mL·min⁻¹ e fase móvel composta de MeOH:H₂O, pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico.

Tabela 2. Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico com a coluna Sigma Aldrich® para a determinação simultânea de ATO, LOS e MTF

Fármaco	Parâmetros ^(a)			
	Tempo de retenção (min.)	Resolução	Assimetria	Pratos
ATO	6,71 ± 0,09	n.a	1,06 ± 0,21	3884 ± 1,01
LOS	4,88 ± 0,11	1,59 ± 0,72	1,07 ± 0,16	4628 ± 0,70
MTF	3,05 ± 0,12	2,0 ± 1,20	1,24 ± 0,53	3206 ± 1,30

^(a)Média de 6 determinações ± desvio padrão relativo (DPR); ATO: Atorvastatina na concentração de 3,0 µg·mL⁻¹; LOS: losartana na concentração de 3,75 µg·mL⁻¹; MTF: metformina na concentração de 37,5 µg·mL⁻¹; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

Após a realização de testes com diversas condições cromatográficas empregando diferentes colunas C18, misturas e proporção de solventes, vazão e pH da fase móvel, o

método para a determinação simultânea de LOS, ATO e MTF foi desenvolvido selecionando as condições que produziram melhores resultados nos parâmetros de conformidade do sistema: resolução, assimetria e pratos, garantindo a conformidade do sistema e a qualidade dos dados obtidos, indicando a seletividade do sistema, a precisão e a eficiência da coluna [10].

Na Tabela 2 estão descritas as condições cromatográficas selecionadas para o desenvolvimento e validação do método analítico proposto: coluna C18, 150 mm, Sigma-Aldrich® (4.6 x 250 mm, 5 µm) fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico e vazão de 0,3 mL·min⁻¹.

Uma vez definida a coluna cromatográfica, fase móvel e vazão para as análises dos fármacos, foram selecionados os comprimentos de onda para a quantificação dos fármacos. Para tanto, realizou-se *varreduras* espectrais com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD) no intervalo de 200 – 400 nm. Os comprimentos de onda selecionados para quantificação de LOS, ATO e MTD foram 225 nm, 246 nm e 236 nm, respectivamente, correspondendo às regiões de máxima absorção no UV de cada fármaco (figura 2).

A figura 2 ilustra da separação cromatográfica da solução dos fármacos LOS, ATO e MTD, sob as condições cromatográficas desenvolvidas, isto é, coluna C18 150 mm, Sigma-Aldrich® (4.6 x 250 mm, 5 µm) fase móvel MeOH: água (78:22 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico, modo isocrático, vazão de 0,3 mL·min⁻¹ em 246 nm, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 25 (±1) °C. Observando-a é possível notar a boa separação cromatográfica dos três fármacos, em um curto tempo de análise (menor que 8 minutos), indicando que o método está adequado para validação e determinação simultânea dos fármacos em formulações farmacêuticas magistrais.

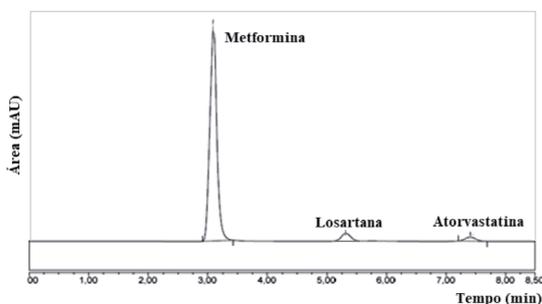


Figura 2. Cromatograma de solução padrão contendo os fármacos losartana (LOS 3,75 µg·mL⁻¹); atorvastatina (ATO 3,0 µg·mL⁻¹) e metformina (MTF 37,5 µg·mL⁻¹), obtida na coluna C18 150 mm, Sigma-Aldrich® (4.6 x 250 mm, 5 µm) fase móvel metanol: água (78:22 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico, modo isocrático, vazão de 0,3 mL·min⁻¹ em 225 nm, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 25 ± 1 °C.

Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados experimentais obtidos são proporcionais à concentração do analito na amostra, sempre respeitando o intervalo especificado [11]. O método analítico é considerado linear quando o coeficiente de correlação for $\geq 0,99$ [19]. Observa-se que o método foi linear para todos os fármacos, apresentando coeficientes de correlação próximos de 1,0. Os limites de detecção e quantificação foram determinados teoricamente e registrados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos da linearidade e limites de detecção e quantificação

Fármaco	Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta	r	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
ATO	1,0-9,0	$y = 2,9668x - 0,0617$	0,9999	0,02	0,24
LOS	1,5-6,25	$y = 5,0546x - 0,0495$	0,9999	0,50	0,68
MTF	12,5-62,5	$y = 9,3625x + 20,725$	0,9999	1,9	2,46

Nota: (r) = coeficiente de correlação; (LD) = limite de detecção; (LQ) = limite de quantificação

Precisão

Os resultados obtidos na precisão intermediária e na repetibilidade foram apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos da precisão do método

Teor \pm DPR (%)		Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
		MTF	LOS	ATO	
Precisão intermediária	Dia 1	An1	$94,25 \pm 0,88$	$100,3 \pm 0,39$	$98,0 \pm 0,28$
		An2	$103,3 \pm 0,41$	$97,5 \pm 0,35$	$100,2 \pm 0,02$
	Dia 2	An1	$104,0 \pm 0,07$	$99,0 \pm 0,30$	$98,9 \pm 0,05$
		An2	$102,5 \pm 1,09$	$100,9 \pm 0,08$	$100,05 \pm 0,39$
	Dia 3	An1	$104,15 \pm 1,20$	$99,09 \pm 0,29$	$101,8 \pm 0,01$
		An2	$100,9 \pm 0,38$	$98,7 \pm 0,27$	$101,5 \pm 0,11$
Média		$101,51 \pm 0,67$	$99,24 \pm 0,28$	$100,07 \pm 0,14$	
Repetibilidade		$101,54 \pm 0,35$	$101,6 \pm 0,43$	$104,5 \pm 0,12$	

Nota: (An1) = analista 1; (An2) = analista 2.

Segundo Farmacopeia Brasileira, a especificação de teor para comprimidos de metformina (MTF), de 95,0 % a 105,0 % da quantidade declarada também pode ser adotada para as cápsulas magistrais. Para Losartana (LOS), o teor determinado é de no mínimo 98,5 % e máximo de 101,0% [13].

A Atorvastatina (ATO) deveria conter no mínimo 94,5 % e no máximo 105,0% da quantidade declarada [11]. Para os fármacos analisados obteve-se o teor dentre os limites indicados por suas respectivas monografias.

Exatidão

A exatidão de um método analítico obtida pela análise de nove determinações das quais dividem-se em 3 níveis de concentrações (baixa, média e alta) deve obter concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro [19]. Os valores obtidos para a recuperação dos fármacos estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos da análise de exatidão do método analítico desenvolvido

Fármaco	Concentração final teórica do padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	
			Resultado (%)	Média \pm DPR (%)
ATO	2,0	1,91	101,39%	99,84 \pm 0,037
	3,0	2,81	98,58%	
	4,0	3,97	102,55%	
LOS	3,75	3,79	107,60%	99,11 \pm 0,084
	5,0	4,92	98,98%	
	6,25	5,85	90,76%	
MTF	25,00	25,61	100,55%	99,07 \pm 0,018
	37,50	37,94	99,62%	
	50,00	49,42	97,03%	

Os valores obtidos na recuperação de ATO, LOS e MTF estão de acordo com os limites aceitáveis entre 98-102 % para os três níveis de concentração analisados [18]. O DPR da média dessas análises foi menor que 2 %. Sendo assim, o método proposto para a determinação simultânea dos três fármacos possui exatidão.

Robustez

Das cinco condições modificadas, apenas uma afetou de modo a ser observado diferença nos picos cromatográficos. Quando foi alterado as colunas cromatográficas, os pratos teóricos diminuíram significativamente. Muito provável, devido a pureza da sílica usada nas colunas C18. Desta forma, a coluna cromatográfica passa a ser um fator que deve ser modificado com cautela quando o método for reproduzido em outros laboratórios, por outros analistas ou equipamentos diferentes. As outras alterações realizadas não modificaram os valores das áreas dos picos cromatográficos, bem como os perfis e também as outras características necessárias como os tempos de retenção, assimetria, resolução e número de pratos teóricos para a otimização do método. Sendo assim, não houve diferenças significativas quanto a quantificação dos fármacos nessas condições variadas.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado para a determinação simultânea da mistura ternária dos fármacos MTF, LOS e ATO em formulações farmacêuticas magistrais é linear, preciso, exato, robusto e seletivo. Além disso, é um método sensível, rápido e isocrático, podendo ser empregado na rotina de laboratórios de controle de qualidade de medicamentos para análise dos referidos fármacos de forma isolada ou combinada. Por último, há de se destacar que o método proposto é econômico e gera pouco resíduo de solventes, uma vez que a vazão é pequena ($0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e a separação corrida cromatográfica ocorre em menos de 8 minutos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento, Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (FUNDECT), Edital Universal nº 08/2020 (PPSUS).

REFERÊNCIAS

1. Brasil, Ministério da saúde, *Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (dcnt) no Brasil 2011-2022*, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise da Situação de Saúde, 2011.

2. Brasil, Ministério da Saúde, *Vigilância das doenças e agravos não transmissíveis e promoção da saúde*, URL: <http://portalms.saude.gov.br/components/tags/tag/cgdant>, consultado em maio de 2021.
3. R. Bonfilio, *Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de losartano potássico em cápsulas*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2009.
4. Fundação Oswaldo Cruz / Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), *Atorvastatina cálcica, Comprimidos revestidos 10 e 20 mg*, Rio de Janeiro (RJ), 2017, 33 p.
5. Brasil, Ministério da saúde, *Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil*, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde, 2011, 148 p.
6. L. Varini-Laporta, T. Faccim de Brum, F.R. Pons Júnior, M.R. Santos, C. Adolfo-Gonçalves, Validação de método analítico para avaliação da qualidade de cápsulas de cloridrato de metformina manipuladas, *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, **34**(2), 235-244 (2013).
7. D.C. Malta, J.B. da Silva Jr, Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, **22**(1), 151-164 (2013).
8. J.F. Fernandes-Anderson, *Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para determinação quantitativa de anti-hipertensivos e estudo de interação entre componentes da formulação*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (MG), 2015, 94 p.
9. R.d.C. Pimentel-Azevedo, G. Pereira-Ribeiro, M. Benjamin de Araújo, Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE, *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, **44**(2), 261-269 (2008).
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline, *Validation of analytical procedures: Methodology*, ICH Topic Q2B, London, 2005.
11. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*, Pharmaceutical Press, 2004.

12. USP37-NF32, The United States Pharmacopeia 2014: USP 37; The National Formulary: NF 32, United States Pharmacopeial Convention, Rockville (MD), 2014.
13. AOAC, International Conference on Harmonization, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)*, Geneva, 2005.
14. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC N° 166 de 25 de Julho de 2017, v. 2017, 21 p.
15. L.P. Sacchi, L. Pinto, M.C. Breitreitz, *Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para associação dos fármacos losartana potássica e besilato de anlodipino empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Conceitos de Analytical Quality by Design*, III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas 07, 08 e 09 de novembro de 2018, Belo Horizonte (MG), 2018.
16. A. Mukherjee, A. Bera, A detailed study of validation parameters and system suitability test in HPLC, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(4), 426-447 (2012).
17. V. Nart, *Desenvolvimento e avaliação de sistemas multiparticulados na forma de mini comprimidos de liberação prolongada visando a administração simultânea dos fármacos captopril e cloridrato de metformina*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015, 127 p.
18. *Farmacopeia Brasileira*, 7ª edição, Atheneu, São Paulo, 2017, v. 2.
19. T.G. Rocha, S.B. Galende, A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica, *Revista Uningá Review*, 20(2), 97-103 (2014).
20. V.L. Pereira-Santos, *Estabilidade e tempo de vida útil de fármacos e medicamentos*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012, 83 p.
21. Chemical Book, Catálogo eletrônico permanente, URL: http://www.chemical-book.com/ProductChemicalPropertiesCB1442564_EN.html, consultado em novembro 2020.
22. N.N. Atia, H.M. Tawfeek, A.H. Rageh, M.R. El-Zahry, A. Abdelfattah, M.A. Younis, Novel sublingual tablets of Atorvastatin calcium/Trimetazidine hydrochloride combination; HPTLC quantification, *in vitro* formulation and characterization, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(4), 540-549 (2019).

23. A.R. Tengli, B.M. Gurupadayya, N. Soni, Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC, *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 4(1), 33-38 (2013).
24. A.B. Thomas, S.D. Patil, R. Kumar-Nanda, L.P. Kothapalli, S.S. Bhosle, A.D. Deshpande, Stability-indicating HPTLC method for simultaneous determination of nateglinide and metformin hydrochloride in pharmaceutical dosage form, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19(4), 221-231 (2011).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M.C. Galana Gerlin, T.F. Mazon Cardoso, J.B. Gomes de Souza, A.C. de Moraes Baroni, M. Serrou do Amaral, N. Mohamad Kassab, Desenvolvimento e validacao de metodo analitico por CLAE para determinacao simultanea de atorvastatina, losartana e metformina em formulacoes farmaceuticas magistrais, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 51(2), 955-970, (2022). <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.96964>