

Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de ivermectina em formas farmacêuticas

Development and validation of a methodology for determination of ivermectin in pharmaceutical forms

DOI:10.34117/bjdv9n5-112

Recebimento dos originais: 10/04/2023

Aceitação para publicação: 12/05/2023

Maria Amélia Albergaria Estrela

Doutora em Química

Instituição: Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC)

Endereço: SIGA Área Especial para Indústria, Lote 2/3, St. Leste Industrial, Gama Brasília - DF, CEP: 72445-020

E-mail: maria.estrela@uniceplac.edu.br

Anna Beatriz Dias Vargas

Graduanda em Farmácia

Instituição: Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC)

Endereço: SIGA Área Especial para Indústria, Lote 2/3, St. Leste Industrial, Gama Brasília - DF, CEP: 72445-020

E-mail: annaavargass@gmail.com

Cristhiane Ferreira Pereira

Graduanda em Farmácia

Instituição: Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC)

Endereço: SIGA Área Especial para Indústria, Lote 2/3, St. Leste Industrial, Gama Brasília - DF, CEP: 72445-020

E-mail: chrisferreirap@gmail.com

Isabel Cristina Batista Veras

Graduanda em Farmácia

Instituição: Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC)

Endereço: SIGA Área Especial para Indústria, Lote 2/3, St. Leste Industrial, Gama Brasília - DF, CEP: 72445-020

E-mail: isabelcristinabveras@gmail.com

Alessandra Costa Silva

Graduanda em Farmácia

Instituição: Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC)

Endereço: SIGA Área Especial para Indústria, Lote 2/3, St. Leste Industrial, Gama Brasília - DF, CEP: 72445-020

E-mail: alessandra.silva@farm.uniceplac.edu.br

RESUMO

A ivermectina é um fármaco da classe dos antiparasitários que possui efeito comprovado sobre vários tipos de infestações por vermes, parasitas e nematoides. A dosagem do teor de ivermectina não possui um método oficial indicado pela Farmacopeia Brasileira, assim, estudos que avaliem a qualidade do produto, principalmente a concentração de princípio ativo nas preparações e sua conformidade com o especificado são fundamentais. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e avaliar um método rápido para controle de qualidade, capaz de quantificar ivermectina nas formas farmacêuticas, utilizando o método de espectrofotometria no UV/VIS, recomendado pela Farmacopeia Brasileira para quantificação de substâncias. O estudo apresentou resultados satisfatórios em todos os testes que foi submetido nas concentrações utilizadas, confirmando sua confiabilidade para uso em laboratórios de controle de qualidade. O método escolhido também apresentou maior facilidade de manuseio, menor custo e geração de resíduos em comparação com técnicas cromatográficas.

Palavras-chave: Ivermectina, Covid-19, controle de qualidade, espectrofotometria, validação analítica.

ABSTRACT

Ivermectin is a drug of the antiparasitic class that has a proven effect on various types of infestations by worms, parasites and nematodes. The dosage of ivermectin content does not have an official method indicated by the Brazilian Pharmacopoeia, thus, studies that evaluate the quality of the product, mainly the concentration of active principle in the preparations and its compliance with the specified are fundamental. The objective of this work was to develop and evaluate a rapid method for quality control, capable of quantifying ivermectin in pharmaceutical forms, using the UV/VIS spectrophotometry method, recommended by the Brazilian Pharmacopoeia for quantifying substances. The study showed satisfactory results in all the tests it was submitted to at the concentrations used, confirming its reliability for use in quality control laboratories. The chosen method also showed greater ease of handling, lower cost and waste generation compared to chromatographic techniques.

Keywords: Ivermectin, Covid-19, quality control, spectrophotometry, analytical validation.

1 INTRODUÇÃO

A ivermectina é um fármaco da classe dos antiparasitários que possui efeito comprovado sobre vários tipos de infestações por vermes, parasitas e nematoides. Este medicamento tem baixo custo e é amplamente utilizado há mais de quarenta anos em regiões onde as infestações parasitárias são comuns, sendo considerado muito seguro. Porém, é importante um uso sensato e racional de acordo com a dosagem e tempo apropriado (FERREIRA et al., 2021).

Por já possuir atividade contra uma ampla diversidade de vírus, a ivermectina teve destaque como um medicamento com potencial eficácia para o tratamento da COVID-19.

Estudos realizados por Caly et al (2020) impulsionaram o uso off-label de ivermectina pela população após apresentarem resultados positivos com células in vitro infectadas com o vírus SARS-CoV-2 isolado. No entanto, é importante destacar a necessidade de estudos que avaliem a qualidade do produto, a concentração do princípio ativo e sua conformidade com o especificado (COSTA & NETTO, 2012).

O trabalho realizado por Costa e Netto (2012) teve como objetivo desenvolver um método prático, rápido, com menor custo e pouca ou nenhuma geração de resíduos, para a determinação e controle de qualidade de ivermectina, já que pequenas alterações podem comprometer sua eficácia. O método utilizado pelos pesquisadores foi a espectrofotometria de absorção UV-VIS, pois ela possui um custo inferior e produtividade maior em relação aos métodos cromatográficos. O estudo foi desenvolvido a fim de garantir se a concentração do insumo farmacêutico ativo (IFA) nas preparações disponíveis comercialmente estão em conformidade com o especificado³. A monografia da ivermectina não consta na Farmacopeia brasileira ou outros compêndios oficiais, assim, estudos que avaliem a qualidade do produto, principalmente a concentração de IFA nas preparações, são fundamentais. A escolha do método adequado é importante no processo de controle de qualidade do medicamento (SOBRINHO et al., 2008).

Com esta finalidade, foi desenvolvido um método de determinação de ivermectina por espectrofotometria de absorção no UV. A validação deve assegurar, por meio de estudos experimentais, que o método atenda aos requisitos das aplicações analíticas, atestando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017). Deve apresentar, para isso, especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas à análise (RDC nº 166, 2017). Devido à grande demanda, o presente trabalho apresenta a validação do método espectrofotométrico para determinação de ivermectina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A dosagem do teor de ivermectina não possui um método oficial indicado pela Farmacopeia Brasileira. Este trabalho adaptou a metodologia de Costa, Pereira Netto (2012), utilizando o método de espectrofotometria no UV/VIS, recomendado pela Farmacopeia Brasileira para quantificação de substâncias. A validação do método foi realizada no Laboratório de Química do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC – Gama, DF.

2.1 EQUIPAMENTOS

Espectrofotômetro UV-Vis (KASUAKI/IL-59³-BI); Cubetas de Quartzo; Balança Analítica; Micropipetas.

2.2 REAGENTES E PADRÃO DE REFERÊNCIA

O solvente utilizado foi o Metanol PA grau analítico da marca Audaz Brasil. O padrão de Ivermectina utilizado foi da marca Sigma Aldrich (pureza $\geq 90\%$).

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A solução padrão de ivermectina foi preparada pela diluição com metanol em balão volumétrico.

2.4 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Foram realizados para validação do método testes de seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão e exatidão.

O ensaio de especificidade foi conduzido com amostra de Ivermectina na forma de comprimido ($6,00\mu\text{g/mL}$) pulverizada e padrão de Ivermectina ($5,00\mu\text{g/mL}$), para verificação de possíveis interferentes. Os espectros de absorbância foram realizados na faixa entre 200 e 280 nm, fornecendo os dados necessários para a construção do gráfico de seletividade/especificidade.

Para o estabelecimento da linearidade, utilizou-se seis concentrações diferentes da solução padrão de ivermectina ($3,12 - 6,24 - 9,36 - 12,48 - 15,60 - 18,72 \mu\text{g/mL}$) preparadas em triplicata. Todos os cálculos para a avaliação da linearidade foram realizados a partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais. Com isso, foi feita a representação gráfica das respostas em função da concentração do analito. Os resultados foram analisados estatisticamente para definir o coeficiente de determinação, a equação de regressão, o ajuste linear e o desvio padrão relativo.

O efeito matriz foi determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a solução padrão do analito em metanol e com a amostra (comprimido de ivermectina) fortificada com a solução padrão do analito. As curvas foram estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando seis concentrações diferentes em triplicata. O paralelismo das retas, adotando-se um nível de significância de 5% (cinco por cento) no teste de hipóteses, é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz.

A precisão é expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade e foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medições de seis amostras de mesma concentração (18,00 µg/mL), realizadas no mesmo dia e no dia posterior, por analistas diferentes, conforme a fórmula 1, onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \text{ (Fórmula 1)}$$

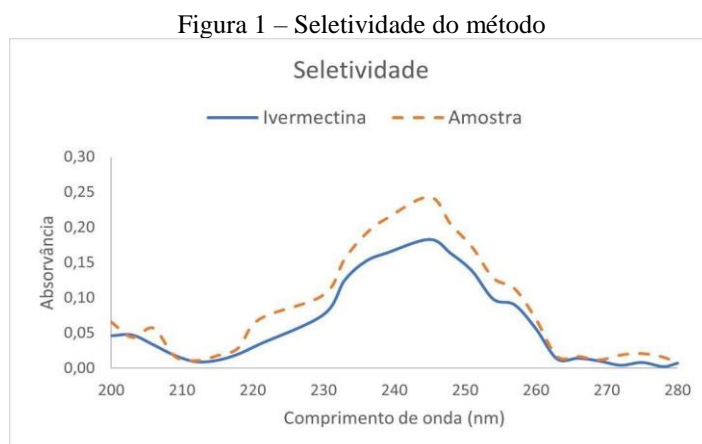
A exatidão foi avaliada por três controles (em triplicata) de concentração baixa (9,00 µg/mL), média (15,00 µg/mL) e alta (21,00 µg/mL) e foi expressa pela relação percentual entre a concentração média, determinada experimentalmente, CME, e a concentração teórica correspondente, CT, conforme a fórmula 2.

$$\text{E} = (\text{CME}/\text{CT}) \times 100 \text{ (Fórmula 2)}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELETIVIDADE

A Figura 1 mostra o espectro, na faixa entre 200 e 280 nm, obtido para a amostra (6,00 µg/mL) e para o padrão de ivermectina (5,00 µg/mL), podendo dessa forma confirmar que no comprimento de onda de 245 nm é possível quantificar seletivamente o padrão de ivermectina e aquela contida na amostra (comprimido), mesmo na presença de outros componentes. O espectro evidencia apenas um pico de absorção máxima a 245 nm.

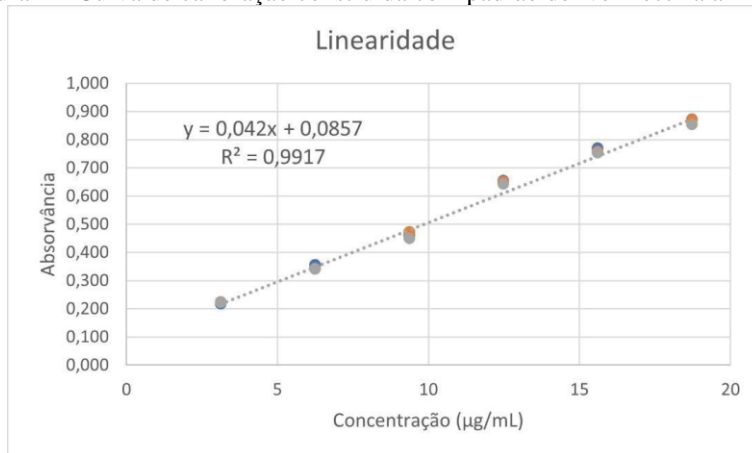


Fonte: Dos Autores, 2023

3.2 LINEARIDADE

A representação gráfica das absorvâncias em função da concentração do analito é mostrada na Figura 2. O método validado mostrou linearidade a 245 nm nas concentrações utilizadas (6,00 a 18,00 µg/mL). O experimento foi realizado em triplicata e a equação da reta de regressão média foi $y = 0,042x + 0,0857$, onde y é a absorvância (nm) e x a concentração (µg/mL) de Ivermectina. E o coeficiente de correlação, R, foi 0,9967. O método é considerado adequado ao intervalo avaliado quando o coeficiente de correlação for maior que 0,990. Os dados de precisão (DPR) e exatidão (E) do intervalo do método são apresentados no Quadro 1.

Figura 2 – Curva de calibração construída com padrão de Ivermectina a 245 nm



Fonte: Dos Autores, 2023.

Quadro 1 – Resultados do teste de linearidade por espectrofotometria para ivermectina

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	Desvio Padrão (DP)	Desvio Relativo Padrão (DPR, %)	Exatidão (E, %)
3,12	3,24	0,08	2,36	103,76
6,24	6,23	0,20	3,21	99,83
9,36	8,94	0,27	3,07	95,47
12,48	13,44	0,13	0,99	107,66
15,60	16,09	0,21	1,29	103,12
18,72	18,59	0,23	1,26	99,29

Fonte: Dos Autores, 2023.

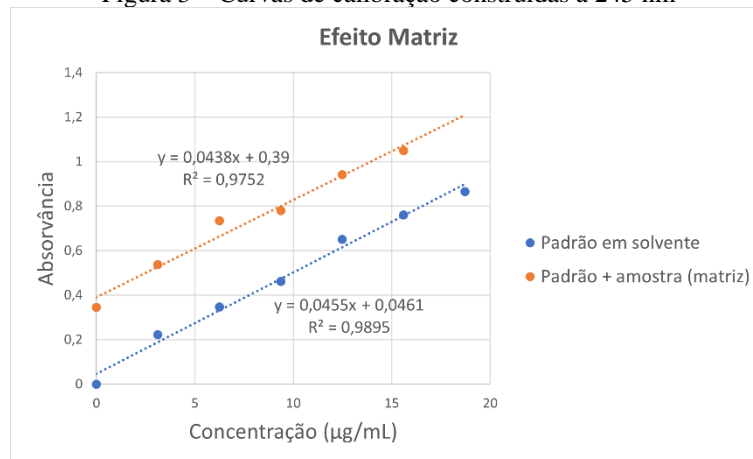
A análise de variância ANOVA (Quadro 2) confirmou que o método proposto pode ser considerado linear. F é menor que $F_{(0,05, 1, 4)} = 7,71$, por isso, rejeita-se a hipótese nula de que o coeficiente angular é igual a zero e assume-se que y efetivamente varia em função de x indicando que o método pode ser considerado linear.

Quadro 2 – Resultados da Análise de Variância

ANOVA	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor P
Regressão	1	0,309469	0,309469	604,586	0,0000164
Resíduo	4	0,002047	0,000512		
Total	5	0,311516			

3.3 EFEITO MATRIZ

Figura 3 – Curvas de calibração construídas a 245 nm



Fonte: Dos Autores, 2023

O efeito matriz foi determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a solução padrão de Ivermectina em metanol e com a amostra (comprimido) fortificada com a solução padrão de Ivermectina. As curvas foram estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando seis concentrações diferentes em triplicata. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração foi realizada por meio de avaliação estatística.

Para comprovação da ausência de efeito matriz, é necessário demonstrar que as retas de concentração *versus* resposta analítica da solução de SQR e da solução amostra fortificada com solução padrão são paralelas. As retas poderão ser consideradas paralelas quando seus coeficientes angulares ou inclinações não forem estatisticamente diferentes. Se o t calculado for maior ou igual ao t crítico, a hipótese nula será rejeitada e considera-se que existe efeito matriz significativo e o método não é suficientemente seletivo. No entanto, a hipótese nula não foi rejeitada, considera-se então que não há efeito matriz significativo. Neste caso, as retas de regressão podem ser consideradas paralelas e a mesma inclinação pode ser aplicada nos dois modelos.

Tabela 1 – Resultado da análise de variância para o efeito matriz

	Variável 1	Variável 2
Média	0,406833333	0,7315
Variância	0,078150967	0,0669691
Observações	6	6
Variância agrupada	0,072560033	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	-2,087611078	
P(T<=t) uni-caudal	0,031691405	
t crítico uni-caudal	1,812461123	
P(T<=t) bi-caudal	0,06338281	
t crítico bi-caudal	2,228138852	

3.4 PRECISÃO E EXATIDÃO

Os resultados da precisão e exatidão do método são encontrados na Tabela 2. Os valores de DPR encontraram-se entre 3,07% e 3,42%. Para a exatidão os resultados encontrados foram de 99,20 a 103,94%. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com o método usado, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz, e a finalidade do método, não se admitindo valores maiores que 5% (Brasil, 2003). Estes dados comprovam que o método de quantificação por espectrofotometria proposto está em conformidade com a legislação.

Tabela 2 – Resultados da precisão e exatidão do método espectrofotométrico para o doseamento de ivermectina

	Concentração (µg/mL)	teórica	N	Concentração (µg/mL)	média	DP	DPR (%)	E (%)
Precisão 1	18,00		6	18,71		0,64	3,42	103,94
Precisão 2	18,00		6	18,35		0,56	3,07	101,94
Exatidão	9,00		3	8,93		0,31	3,50	99,20
	15,00		3	14,93		0,28	1,90	99,52
	21,00		3	20,91		0,03	0,16	99,55

Fonte: Dos Autores, 2023

4 CONCLUSÃO

O método validado mostrou boa linearidade e alta seletividade a 245 nm nas concentrações utilizadas com coeficiente de correlação, R, maior que 0,990, ausência de interferência dos constituintes da matriz, boa exatidão, precisão e reprodutividade, garantindo assim a confiabilidade necessária para o uso em laboratórios de controle de qualidade. É importante destacar que o método espectrofotométrico tem maior facilidade

de operação, menor custo, maior produtividade e menor geração de resíduos que as técnicas cromatográficas.

REFERÊNCIAS

Biblioteca Virtual em Saúde MS [Internet]. bvsms.saude.gov.br. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br>

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Guia para tratamento estatístico da Validação Analítica** (Guia nº 10/2017 – Versão 1), Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.farmaceuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/09/Guia-10-v1-Tratamento-estatistico-validacao-analitica.pdf>

CALY et al. The FDA-approved Drug Ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. **Antiviral Research**, v. 178, abril, 2020.

COSTA et al. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, Niteroi – RJ, v. 35, n.3, p. 1-7, agosto, 2011.

FERREIRA et al. Uso da Ivermectina como antiparasitário e no COVID-19. **Revista Científica**, v.1, n.1, janeiro, 2021.

SOBRINHO et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife – PE, v.44, n.4, p. 1-7, dezembro, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Pharmacopoeia**. WHO Drug Information. 2019. [acesso em 2022 agosto 25] Disponível em: <https://apps.who.int>