

## Determinação do 17 $\beta$ -estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico

Clarice Yakabe<sup>1\*</sup>, Akimi Mori Honda<sup>2</sup>, João Fernandes Magalhães<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hospital do Servidor Público Estadual Francisco Morato de Oliveira/Serviço de Assistência Farmacêutica, <sup>2</sup>Curso de Farmácia, Faculdade Integrada de São Paulo/Gerente de P&D da Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, <sup>3</sup>Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

*Desenvolveu-se um método espectrofotométrico na região do visível para doseamento de 17 $\beta$ -estradiol em gel e adesivo transdérmico, utilizando-se sulfanilamida diazotada como reagente. O azo-composto formado apresentou absorção máxima em 480 nm, sendo a reação linear na faixa de concentração de 10,0 a 28,0  $\mu$ g/mL. Quando aplicado a amostras comerciais mostrou-se preciso e exato.*

### Unitermos

- 17 $\beta$ -Estradiol
- Espectrofotometria no visível
- Gel
- Adesivo transdérmico
- Azo-composto

### \*Correspondência:

C. Yakabe  
Av. Ibirapuera, 981  
04029-000, Vila Clementino,  
São Paulo, SP  
E-mail: yakabeclarice@ig.com.br

## INTRODUÇÃO

O 17 $\beta$ -estradiol é um dos estrogênios usados na terapia de reposição hormonal (TRH), sendo o tratamento dos sintomas da menopausa, uma de suas indicações, devendo ser utilizado na menor dose eficaz, por um período o mais curto possível (Stephenson, 2003; Nelson, 2004).

Apesar do primeiro relatório científico sobre o uso de preparação comercial de estrogênio datar de 1935, o seu uso foi difundido nas décadas de 1950 e 1960 e, desde então, tem suscitado inúmeros debates quanto à sua segurança e eficácia (Hupert, 1987).

Atualmente, o estrogênio está disponível no mercado brasileiro nas mais diversas formas farmacêuticas (DEF-2003/04), porém há carência de métodos para sua análise.

A Farmacopéia Americana preconiza o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise da matéria-prima, creme vaginal e comprimidos, enquanto que para suspensão injetável e “pellets” continua sendo proposto o método colorimétrico com reagente fenol-ferro (USP, 2003). A associação dos químicos analíticos

dos Estados Unidos (AOAC) também adota um método colorimétrico com reagente de ferro de Kober (fenol-ferro) para doseamento da matéria-prima (AOAC, 2000).

É inegável a eficiência dos métodos cromatográficos no controle de qualidade de medicamentos. Porém, o seu custo é alto e nem sempre facilmente aplicável às diversas formas farmacêuticas.

Na literatura estão descritos alguns métodos alternativos como o uso da voltametria (Salci, Biryol, 2002), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (Kotiyani, Vavia, 2000), espectrofotometria derivada de segunda ordem (Toral, Soro, Richter, 2002), entre outros.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar um método colorimétrico para quantificação do 17 $\beta$ -estradiol em gel e adesivo transdérmico. Este método, diferente dos métodos colorimétricos oficiais, é baseado na diazotação da sulfanilamida com nitrito de sódio, seguida da reação de acoplamento com 17 $\beta$ -estradiol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Equipamentos, reagentes e soluções

#### Equipamentos

Espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, modelo UV-1601, com impressora Epson, modelo LQ-570+; balança analítica, Ohaus, modelo AS200; banho de ultra-som, Thornton, modelo T14

#### Reagentes e soluções

17 $\beta$ -Estradiol, padrão USP, lote KIB007 (identificação); 17 $\beta$ -estradiol, substância química de referência, Heartwell, lote ESMO/002, teor de 100,41%; etanol absoluto p.a., Merck; ácido clorídrico fumegante a 37%, Merck; carbonato de sódio anidro p.a.-ACS, Synth; cloreto de sódio PA, Quimesp; nitrito de sódio p.a.-ACS, Merck; sulfanilamida pura, Sigma; solução de carbonato de sódio 10% (p/v); solução de cloreto de sódio 10% (p/v); solução de nitrito de sódio 0,5% (p/v); solução de sulfanilamida 0,1% (p/v) em solução de ácido clorídrico 0,1 M.

#### Amostras

Amostra comercial de gel, contendo 0,06 g% de 17 $\beta$ -Estradiol; amostra comercial de adesivo transdérmico, contendo 3,20 mg de 17 $\beta$ -estradiol; amostra simulada de gel, contendo 0,06 g% de 17 $\beta$ -estradiol; amostra-placebo de gel.

## MÉTODOS

#### Preparação da solução-padrão

A solução-padrão de 17 $\beta$ -estradiol foi preparada a partir de 100 mg de 17 $\beta$ -estradiol, substância química de referência, em balão volumétrico de capacidade de 100 mL, com adição de 80 mL de etanol absoluto. Colocou-se no banho de ultra-som por cinco minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente. Procedeu-se à diluição de 20% (v/v), em etanol absoluto. A concentração final desta solução foi de 200 mg/mL. A partir desta solução foram preparadas soluções para a obtenção do espectro de absorção (8,0, 16,0, 24,0 e 32,0 mg/mL de 17 $\beta$ -estradiol), curva de Ringbom e curva analítica.

#### Preparação da solução-padrão para gel

Foi preparada uma solução alcoólica de 17 $\beta$ -estradiol 60 mg/100 mL. Vinte mililitros desta solução foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, contendo 20 g de placebo desestabilizado com 5 mL de cloreto de sódio 10%. Após cinco minutos no banho de ultra-som, a suspensão foi filtrada em papel de filtro quantitativo, faixa branca.

#### Preparação da solução-padrão para adesivo transdérmico

Foi preparada uma solução alcoólica contendo 64 mg/100 mL de 17 $\beta$ -estradiol. A partir desta solução, foi feita diluição adequada para obtenção de solução contendo 128 mg/mL de 17 $\beta$ -estradiol.

#### Preparação das soluções de amostras comerciais e simuladas e placebos de gel

Tomadas de ensaio equivalentes a 12 mg de 17 $\beta$ -estradiol da amostra de gel comercial, simulada e placebo foram transferidas para béqueres de 100 mL. Adicionaram-se 5 mL da solução de cloreto de sódio 10% e após homogeneização, foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de etanol absoluto. Após cinco minutos no banho de ultra-som, os volumes foram completados com o mesmo solvente. As soluções foram filtradas através de papel de filtro quantitativo, faixa branca.

#### Preparação da solução da amostra comercial de adesivo transdérmico

Cada adesivo foi colocado em um béquer com 15 mL de etanol absoluto. Após 30 minutos no banho de ultra-som, foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se com o mesmo solvente, obtendo-se solução contendo 128 mg/mL de 17 $\beta$ -estradiol.

#### Reação colorimétrica

Em banho de gelo, misturou-se a solução de sulfanilamida 0,1% com nitrito de sódio 0,5% e incubou-se por cerca de 2 minutos e, em seguida, acrescentou-se o filtrado. Agitou-se, deixando-se descansar por mais um minuto. Por fim, adicionou-se a solução de carbonato de sódio a 10% e completou-se com água destilada para 50 mL, como indica a Tabela I.

### Padronização do método

#### Espectro de absorção

Com as soluções-padrão contendo 8,0, 16,0, 24,0 e 32,0 mg/mL de 17 $\beta$ -estradiol, determinou-se o espectro de absorção do azo-composto, no intervalo de 400 a 600 nm, usando placebo como branco e cubetas de 1 cm de espessura.

### Construção da curva de Ringbom

Preparou-se uma solução de 17 $\beta$ -estradiol, 200 mg/mL, em etanol absoluto. A curva de Ringbom foi construída com os valores de transmitâncias do azo-compostos formados pela reação entre 17 $\beta$ -estradiol, nas con-

**TABELA I** - Preparação das soluções para reação colorimétrica das amostras comerciais e simuladas

Balão	Sulfanilamida 0,1% (mL)	Nitrito de sódio 0,5% (mL)	Filtrado (mL)	Carbonato de sódio 10% (mL)	Água destilada q.s.p para (mL)
Padrão	10	10	10	5	50
Amostra	10	10	10	5	50
Branco (Placebo)	10	10	10	5	50

Concentração final da amostra adesivo (25,6 mg/mL), gel (24,0 mg/mL)

centrações de 2,0 a 50,0 mg/mL, e a sulfanilamida diazotada. As leituras das transmitâncias foram realizadas em 480 nm.

### Construção da curva analítica

A relação entre as absorvâncias do azo-compostos, em 480 nm, e as correspondentes concentrações do 17 $\beta$ -estradiol, na faixa de 10,0 a 28,0 mg/mL, foi utilizada para construção da curva analítica e para calcular o coeficiente de correlação e a equação da curva analítica, empregando o programa Excel 2000.

### Aplicação do método

Para avaliar a eficiência do método, efetuou-se a sua padronização, empregando-se para análises, amostras comerciais, amostras simuladas e respectivos placebos.

De cada amostra dos medicamentos (comerciais e simulados) foram efetuados 10 ensaios para o gel e 6 para adesivo conforme procedimento descrito em preparo das soluções-amostra.

Os dados analíticos foram utilizados para determinação da precisão, pelo cálculo do desvio-padrão relativo intradia.

O teste de linearidade foi realizado adicionando-se ao placebo da formulação simulada cinco diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol, substância química de referência (50, 75, 100%), em relação ao teor declarado, correspondendo a 12,0, 18,0 e 24,0 mg/mL, respectivamente, tendo-se realizado o teste em triplicata, repetindo-se por três dias (ICH-Q2B, 1996).

O teste de recuperação do padrão, realizado com adição de quantidades conhecidas de padrão, em três concentrações diferentes, às porções equivalentes à metade da concentração do princípio ativo da amostra, previamente analisada, foi empregado para avaliar a exatidão do método (USP, 2003; ICH-Q2B, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência dos métodos cromatográficos aplicados

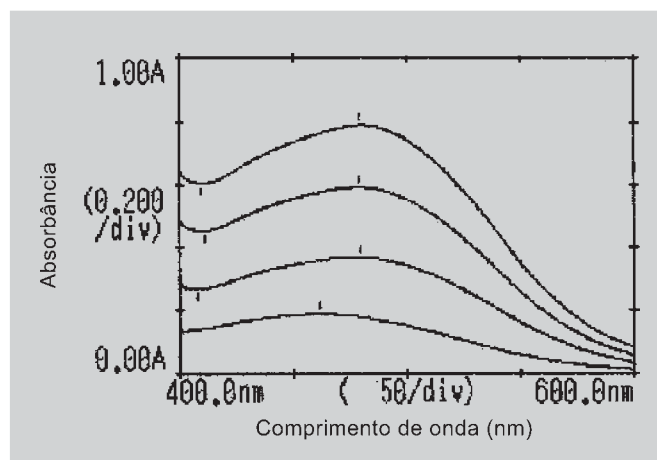
ao controle de qualidade de medicamentos, na atualidade, é do nosso conhecimento. Porém, nem sempre é possível fazer o seu uso, ou porque o custo é elevado, ou devido à complexidade das formulações, há necessidade de um pré-tratamento da própria amostra, dificultando a sua execução. À vista disso, foi desenvolvido um método espectrofotométrico, que por ser fácil e econômico, pode-se adequar a qualquer laboratório.

O método baseou-se na diazotação da sulfanilamida e posterior acoplamento com 17 $\beta$ -estradiol. O azo-composto formado possui uma coloração marrom-avermelhada, estável por pelo menos duas horas.

O método proposto utiliza etanol absoluto para extração da substância ativa com ajuda do ultra-som. A reação colorimétrica é realizada no filtrado alcoólico.

O método padronizado, aplicado às amostras de medicamentos, foi avaliado quanto à precisão e exatidão, conforme descrito na Farmacopéia (USP, 2003).

Em se tratando de método espectrofotométrico, foi inicialmente verificado o seu comportamento espectral. O espectro de absorção do produto obtido da reação de acoplamento do 17 $\beta$ -estradiol, nas concentrações 8,0, 16,0,



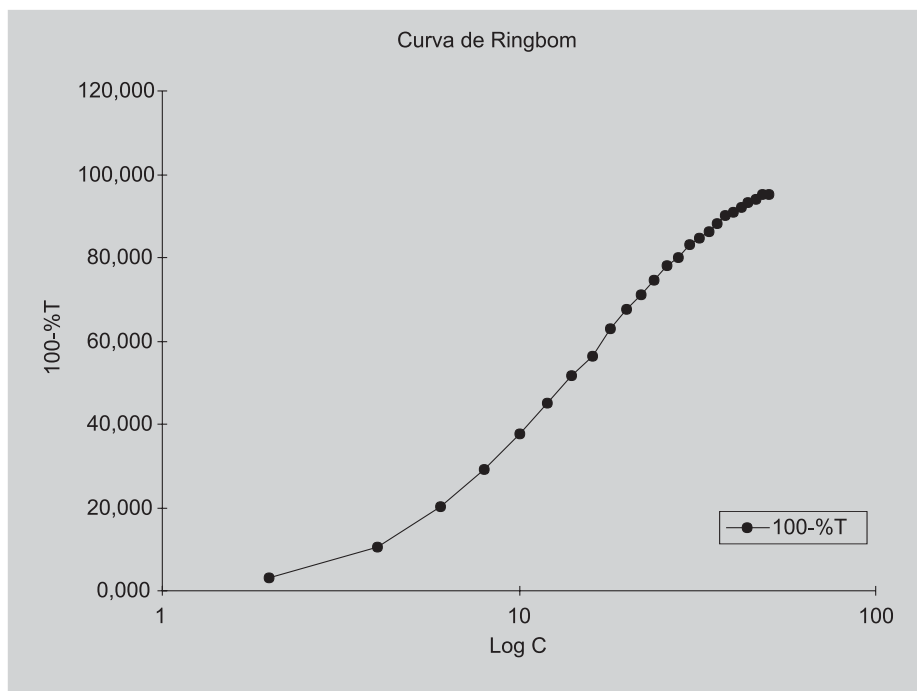
**FIGURA 1** - Espectro de absorção do produto formado na reação de acoplamento da sulfanilamida diazotada e o 17 $\beta$ -estradiol presente nas concentrações de 8,0, 16,0, 24,0 e 32,0  $\mu$ g/mL.

24,0 e 32,0 mg/mL, e a sulfanilamida diazotada mostraram curvas de absorção com boa simetria e com um máximo de absorção em 480 nm (Figura 1).

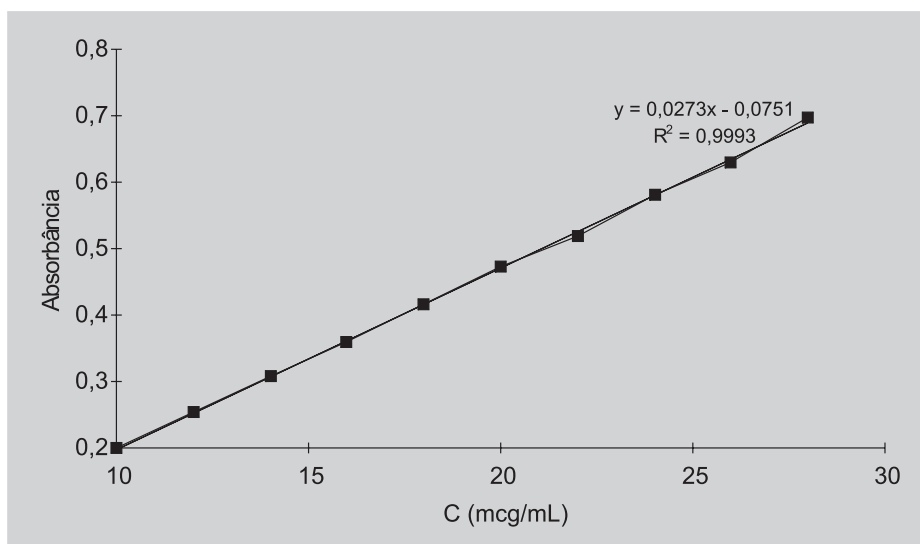
A curva de Ringbom traçada nas condições definidas está apresentada na Figura 2. A melhor faixa de concentração para ser utilizada na quantificação do 17 $\beta$ -estradiol ficou estabelecida entre 10,0 e 28,0 mg/mL (Figura 3).

A curva analítica obtida da relação entre valores de absorbância dos produtos coloridos da reação de acoplamento da sulfanilamida diazotada com 17 $\beta$ -estradiol, em diferentes concentrações, definida pela equação da reta  $y = 0,0273x - 0,0751$  e com um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9996 está ilustrada na Figura 3.

O método espectrofotométrico de análise do 17 $\beta$ -estradiol, por reação de acoplamento com a sulfanilamida



**FIGURA 2** - Curva de Ringbom do produto corado resultante da reação entre 17 $\beta$ -estradiol e sulfanilamida diazotada, em 480 nm.



**FIGURA 3** - Curva analítica obtida dos valores de absorbâncias, em 480 nm, das soluções coradas do produto de acoplamento, resultante da reação da sulfanilamida diazotada e o 17 $\beta$ -estradiol nas concentrações de 10,0 a 28,0  $\mu$ g/mL.

diazotada, foi padronizado quanto aos parâmetros precisão intradia (repetibilidade) (Tabela II), recuperação (Tabela III) e linearidade para forma farmacêutica gel (Tabela IV e Figura 4). A precisão do método para medida do estradiol em amostras de gel simulado, gel e adesivo comerciais foi de 1,43, 0,98 e 1,60% respectivamente, que são compatíveis com os critérios de aceitabilidade adotados pelos laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, como também pela USP, 2003. Os resultados do teste de recupe-

ração do 17 $\beta$ -Estradiol das amostras comerciais (gel e adesivo) e do gel simulado, empregando o método da adição de padrão de estradiol nas concentrações de 9,00, 12,00 e 15,00 mg/mL, adotado pela AOAC, mostram uma recuperação de 98,90 a 99,04%.

O método desenvolvido mostrou-se relativamente simples, preciso e exato, para determinação do 17 $\beta$ -Estradiol em formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico.

**TABELA II** - Resultado da repetitividade intradia das amostras de medicamento contendo 17 $\beta$ -estradiol, nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico

Amostra	Obtido	Média (%)	Desvio padrão relativo	Intervalo de confiança da média (p=0,05)
Simulada-gel (0,75 mg/1,25 g)	0,75 mg/1,25 g gel	100,0	1,43	0,75 $\pm$ 0,01
Comercial-gel (0,75 mg/1,25 g)	0,79 mg/1,25 g gel	105,4	0,98	0,79 $\pm$ 0,01
Comercial-adesivo (3,20 mg/adesivo)	3,19 mg/adesivo	99,7	1,60	3,19 $\pm$ 0,05

Os valores expressos como média, n=10(gel) e n=6(adesivo)

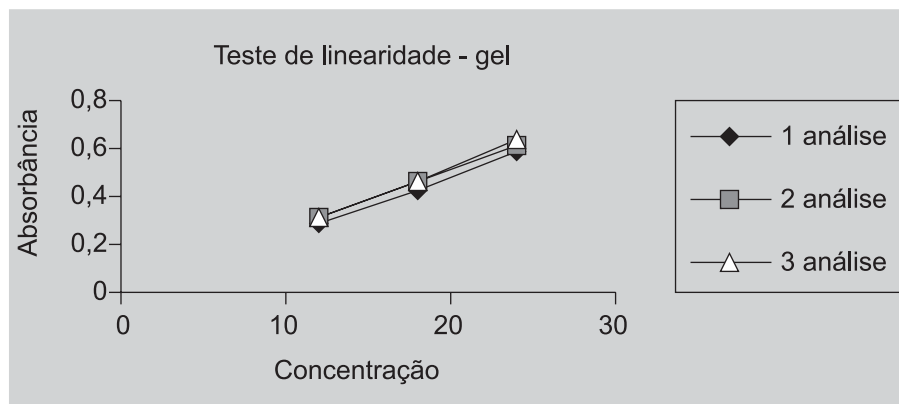
**TABELA III** - Resultados do teste de recuperação aplicado às amostras comerciais e simuladas de gel e adesivo transdérmico, em 3 níveis de concentração, em 3 dias

Amostra	Quantidade padrão adicionado $\mu$ g/mL	Quantidade padrão recuperado $\mu$ g/mL * (DP)	Recuperação (%)
Comercial-gel (12 $\mu$ g/mL)	9,00	8,99 (0,29)	99,92
	12,00	11,95 (0,23)	99,58
	15,00	14,82 (0,41)	98,90
Simulado-gel (12 $\mu$ g/mL)	9,00	8,94 (0,17)	99,31
	12,00	11,98 (0,24)	99,86
	15,00	14,86 (0,29)	99,04
Comercial-adesivo (12,80 $\mu$ g/mL)	10,24	10,15 (0,13)	99,15
	12,80	12,74 (0,31)	99,53
	15,36	15,32 (0,43)	99,72

**TABELA IV** - Dados do teste de linearidade do método colorimétrico de análise do 17 $\beta$ -estradiol, em 3 dias diferentes, de forma farmacêutica gel

Concentração (mg/mL)	%	1º ensaio* A (DP)	2º ensaio* A (DP)	3º ensaio* A (DP)
12	50	0,288 (0,003)	0,311 (0,001)	0,310 (0,005)
18	75	0,428 (0,002)	0,461 (0,005)	0,466 (0,009)
24	100	0,582 (0,002)	0,611 (0,009)	0,634 (0,003)

\*os valores estão expressos como média, n=3 e (desvio padrão)



**FIGURA 4** - Linearidade do método colorimétrico de análise do 17 $\beta$ -estradiol, em forma farmacêutica gel, em 3 dias diferentes.

## ABSTRACT

### Determination of 17 $\beta$ -estradiol in dosage formulations: gel and patch

*A visible spectrophotometry method was developed for quantification of 17 $\beta$ -estradiol in gel and in patch, transformations by using diazotised sulfanilamide as the colorimetric reagent. The azo-compound formed showed a maximum absorption in 480 nm, and the reaction was linear in a concentration range from 10,0 to 28,0  $\mu$ g/mL. When applied to dosage formulations it showed to be precise and accurate.*

*UNITERMS: 17 $\beta$ -estradiol. Visible spectrophotometry. Gel. Patch. Azo-compound.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Drugs. In: \_\_\_\_\_. Official methods of analysis of AOAC International. 17.ed. Gathersbury: AOAC International, 2000. part.IV.

DEF 2003/04: *Dicionário de especialidades farmacêuticas*. 32.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2003. 1294p.

HUPPERT, L.C. Hormonal replacement therapy: benefits, risks, doses. *Med. Clin. North Am.*, Orlando, v.71, n.1, p.23-39, 1987.

ICH-Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q2B. 1996 p.1-8. Disponível em: [http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@\\_ID=418@\\_MODE=GLB](http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=418@_MODE=GLB). Acesso em: 05 jan. 2004.

KOTIYAN, P.N.; VAVIA, P.R. Stability indicating HPTLC method for the estimation of estradiol. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.22, p.667-671, 2000.

NELSON 2, H.D. Postmenopausal estrogen for treatment of hot flashes. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.291, n.13, p.1621-1625, 2004.

SALCI, B.; BIRYOL, I. Voltametric investigation of  $\beta$ -estradiol. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.28, n.3/4, p.753-759, 2002.

STEPHENSON, J. FDA orders estrogen safety warnings. Agency offers guidance for HRT use. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.289, n.5, p.537-538, 2003.

TORAL, M.I.; SORO, C.; RICHTER, P. Simultaneous determination of estradiol and medroxyprogesterone acetate in pharmaceutical formulations by second-derivative spectrometry. *J. AOAC Int.*, Gaithersburg, v.85, n.4, p.883-888, 2002.

UNITED States Pharmacopeia: USP26. The National Formulary: NF21. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.742-744, 2054, 2176-2177, 2439-2442.

Recebido para publicação em 31 de maio de 2004.  
Aceito para publicação em 12 de novembro de 2004.