

# Otimização e validação de método cromatográfico (clae-uv) para determinação de omeprazol em cápsulas

Blanca Elena Ortega MARKMAN, Paulo Sergio David de MORAES, Viviane Jesus Marques da CRUZ, Elizabeth Meihuey WU

Núcleo de Ensaios Físico-Químico em Medicamentos – Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz

Omeprazol é um inibidor da enzima H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>Adenosina Tri-Fosfatase (H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase ou bomba de prótons), com capacidade de suprimir valores entre 80% a 95% da produção de ácido, tanto basal, quanto estimulada. Como os demais inibidores, trata-se de um pró-fármaco utilizado como primeira escolha para o tratamento de diversos distúrbios gastroesofágicos decorrentes do excesso de secreção ácida, entre eles, úlcera péptica gastroduodenal, refluxo gastro-esofágico, síndrome de Zollinger-Ellison, e em co-terapia com antibióticos em patologias relacionadas com a bactéria *Helicobacter pylori*<sup>1</sup>.

Apesar da meia-vida plasmática do Omeprazol ser em torno 1 a 2 horas, seu efeito pode se prolongar de forma acentuada nas primeiras 24 horas e permanecer por até 3 ou 4 dias. Este efeito é promovido em decorrência da inibição irreversível da enzima H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase, tornando-se necessária a síntese e inserção de novas bombas de prótons pelas células parietais em sua membrana para que a produção de ácido retorne ao estado anterior<sup>1</sup>.

A molécula do omeprazol apresenta centros quirais consistindo de uma mistura racêmica de enantiômeros R e S (S-Omeprazol ou esomeprazol e R-Omeprazol). Farmacocineticamente, o S-Omeprazol possui meia-vida maior, o que pode representar ação mais duradoura no sítio de ação<sup>1</sup>. Atualmente, são

comercializados na forma isolada como esomeprazol ou como mistura racêmica (omeprazol).

Dentre as apresentações farmacêuticas disponíveis, encontramos as formas de administração injetáveis e orais. Pelo fato de o omeprazol ser instável no pH ácido do estômago, faz-se necessário o uso de modernas técnicas de revestimento, entre elas, comprimidos com revestimento entérico e/ou sistemas multiparticulados revestidos (pellets) contidos em cápsulas duras. Além de garantir a estabilidade, as formas multiparticuladas permitem uma liberação controlada, mantendo a concentração plasmática do fármaco estável por um período maior, promovendo uma melhoria na biodisponibilidade<sup>2</sup>.

Os compêndios oficiais não contemplam métodos para verificação da qualidade do omeprazol em apresentações farmacêuticas, sendo necessário recorrer às metodologias de fabricantes e publicações científicas. A literatura reporta várias técnicas analíticas para a determinação de omeprazol: eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV)<sup>3</sup>, entre outras. O objetivo deste estudo é otimizar e validar um método analítico por CLAE-UV para determinação de omeprazol na forma de pellets contidos em cápsulas duras, suprimindo a ausência na Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> edição<sup>4</sup> para apresentações farmacêuticas.

Na otimização e validação do método para determinação de omeprazol, foram utilizados: substância química de referência de omeprazol; fosfato de sódio; acetonitrila (grau HPLC); água ultrapurificada; filtros de celulose regenerada de 0,45 µm para filtrar a fase móvel; e amostras de medicamentos genéricos e similar do fármaco em questão.

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica Mettler Toledo modelo AL 204; vidrarias calibradas e certificadas; cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu série LC-10A/VP, certificado pela Sinc do Brasil Instrumentação Científica Ltda., que compreende uma bomba LC-10AD-VP, um detector ultravioleta UV-Vis SPD-10 AV-VP, um forno CTO-10 AC-VP e um autoinjeter modelo SIL 20HT Prominense – Auto Sampler – Shimadzu. Os cromatogramas foram processados pelo sistema controle SCL-10A-VP.

O método cromatográfico descrito por Linden et al.<sup>3</sup>, para determinação de concentração plasmática de omeprazol, foi otimizado após vários testes com alteração da composição da fase móvel, do pH do diluente, da temperatura, do fluxo e da coluna. O sistema cromatográfico adotado e otimizado foi constituído de: coluna Hypersil Gold com partículas 5 µm, de 150 × 4,6 mm (L1-C18), da Thermo Scientific; detector UV em comprimento de onda 302 nm; temperatura de 40 °C; fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 20 µL, fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (pH 7,6) e acetonitrila (65:35 v/v) e diluente tampão fosfato de sódio (pH 11).

Antes de realizar os estudos de validação do método, foi avaliado se o sistema cromatográfico adotado seria capaz de fornecer dados de qualidade aceitável, por meio da verificação da conformidade do sistema (*system suitability*)<sup>5</sup>. Os parâmetros cromatográficos selecionados para avaliar a conformidade do método foram: tempo de retenção do padrão de omeprazol, fator de capacidade, fator de alargamento dos picos ou assimetria e número de pratos teóricos.

Os valores obtidos foram: tempo de retenção foi de 2,81 minutos, número de pratos teóricos 4.187, assimetria 1,05, e fator capacidade 0,14. Os valores determinados dos parâmetros cromatográficos conferem ao método otimizado conformidade do sistema. A Figura 1 do cromatograma de omeprazol desenvolvido no método otimizado apresenta simetria no pico, o tempo de retenção e a boa separação de outros picos.

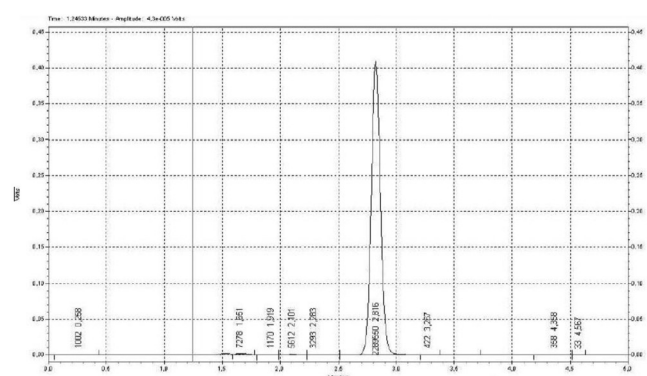


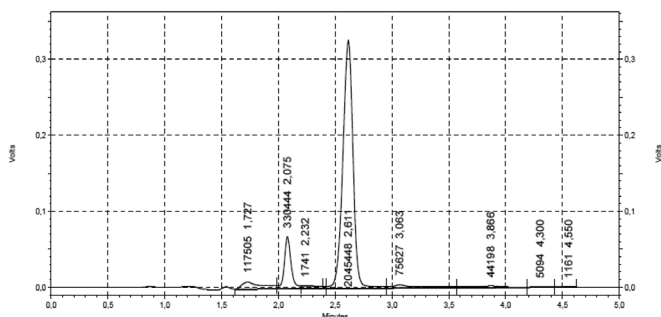
Figura 1. Cromatograma demonstrando pico simétrico do padrão de omeprazol no sistema cromatográfico otimizado

A validação do método foi realizada segundo as normas descritas na RDC nº 899/2003<sup>6</sup> da ANVISA e Categoria 1 da Farmacopeia Americana 32ª edição para quantificação de princípio ativo em medicamentos. Em razão disto, os parâmetros validados foram linearidade, seletividade, exatidão e precisão.

### Seletividade/especificidade

Para determinação da seletividade realizou-se degradação forçada do padrão de omeprazol em solução em três condições: em meio ácido (solução de ácido clorídrico 2N), em meio alcalino (hidróxido de sódio 2N) e em presença de oxidante (água oxigenada 40 volumes). Estas soluções foram submetidas a banho-maria a 100 °C por 4 horas. Nas três condições observou-se nos cromatogramas o surgimento de outros picos concomitantemente com a diminuição da área do pico do omeprazol, sugerindo que o método otimizado foi capaz de separar os compostos de degradação forçada do princípio ativo, expressando

especificidade para o omeprazol. A Figura 2 demonstra o resultado da degradação forçada em meio alcalino. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro componente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam, porventura, estar presentes.



**Figura 2.** Cromatograma do padrão de omeprazol sob condições de degradação forçada em meio alcalino (NaOH 2N) por um período de 4 horas e temperatura de 100 °C

### Exatidão

Determinou-se a exatidão mediante a recuperação do método pela adição (*spike*) do padrão a uma solução diluída do medicamento de omeprazol (concentração 46,5 µg/mL) em três níveis de concentração: 50%, 100% e 150%. A média dos nove valores de recuperação do omeprazol foi de 98%, sendo assumido como a exatidão do método.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

### Precisão

A precisão do método foi avaliada mediante a determinação da repetitividade intra-dia (n = 9) do padrão de omeprazol na concentração de 50,06 µg/mL. O desvio-padrão relativo calculado foi de 0,14%. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de

medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; e repetições em um curto intervalo de tempo.

### Linearidade

A linearidade do método proposto foi determinada com a utilização de cinco concentrações diferentes, em quadruplicata. Os intervalos de concentrações estabelecidos através do procedimento analítico foram: 25,03 µg/mL, 50,01 µg/mL, 75,01 µg/mL, 100,01 µg/mL e 125,01 µg/mL. A plotagem da representação gráfica da área dos picos versus concentração gerou a curva de calibração, da qual se obteve o coeficiente de regressão linear  $r^2 > 0,9993$ . Segundo a RDC nº 899/03, o  $r^2$  deve ser igual ou superior a 0,99. O teste de Cochran aplicado às respostas (unidades de área) dos cinco níveis de concentração mostrou homogeneidade das variâncias (homoscedasticidade).

O método otimizado e validado na determinação de omeprazol em pellets contidos em cápsulas foi comparado com a técnica de espectrofotometria na região do UV, utilizando-se duas amostras de medicamento genérico e uma de medicamento similar. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Comparação entre resultados obtidos nos métodos CLAE-UV (otimizado) e espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostras	CLAE ( mg/ conteúdo médio)	UV (mg/ conteúdo médio)
1 (med. similar)	17,6	23,0
2 (med. genérico)	20,0	27,4
3 (med. genérico)	20,6	29,0

A técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta foi utilizada na análise comparativa porque é a técnica mais utilizada para determinação deste fármaco em apresentações farmacêuticas, além de ser oficial para identificação do omeprazol em matéria-prima de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

Os resultados obtidos para omeprazol por espectrofotometria na região do ultravioleta, conforme demonstradas na Tabela 1, evidenciaram a interferência dos excipientes, apresentando valores acima da especificação do produto de 20 mg, podendo ser aceitos valores entre 18 e 22 mg. Quando comparado com o método otimizado e validado por CLAE-UV, isto não é observado por ser este um método de separação, reportando valores reais para os produtos analisados. Estes resultados demonstram bom desempenho do método otimizado.

A otimização do método analítico, partindo do método publicado por Linden et al<sup>3</sup>, envolveu vários estágios, como: alteração do pH da fase móvel, da temperatura, coluna, fluxo e do volume de injeção. Cada alteração foi avaliada mediante o desempenho do método, levando-se em conta a simetria do pico e um tempo de retenção curto para o omeprazol. A validação do método analítico é importante porque garante o sucesso da utilização da metodologia desenvolvida e/ou otimizada, além de detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método.

O método CLAE-UV otimizado e validado no presente trabalho é simples, seletivo, exato e preciso

para a quantificação de omeprazol em formulações farmacêuticas e matérias-primas, podendo ser alternativo ao oficial.

## REFERÊNCIAS

1. Hardman JG, Limberd LE (eds.). Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw- Hill: New York; 2001.
2. Murakami FS, Mendes C, Pereira RN, Valente BR. Estudo de Estabilidade de Comprimidos Gastro-Resistentes contendo 20 mg de Omeprazol. *Lat. Am J Pharm.* 2009; 28 (5):645-52.
3. Linden R, Ziulkoski AL, Wingert M, Tonello P, Souto AA. Simultaneous determination of omeprazole, hidroxiomeprazole and omeprazole suphone in human plasma by isocratic HPLC-DAD: Application to the phenotyping of CYP2C19 and CYP3A4 in Brazilian volunteers. *J Braz Chem Soc.* 2007;18(4):733-40.
4. Farmacopeia Brasileira. 5ª edição. Parte 2. Brasília: Fiocruz; 2010.
5. United States Pharmacopeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Conventions. 2009;734-7.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" anexo, fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. *Diário Oficial [da] União, Brasília, Seção 1, DF, p. 56-9, 2 de junho de 2003.*