DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE LOSARTANA

Bruna Juliane de Melo (PIBIC/PROVIC/UEPG), Amanda Dias Ferreira (co-autora), Patrícia Los Weinert (Orientador), brunameelo18@gmail.com, amandaquimdias@gmail.com, patilos@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Química.

Química e química analítica.

Palavras-chave: losartana potássica, cromatografia líquida de alta eficiência, planejamento de experimentos.

Resumo

Nesse trabalho foi desenvolvida e otimizada uma metodologia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos para a quantificação de losartana em formulações farmacêuticas adquiridas no comércio local. Inicialmente estudos preliminares foram realizados para definição da fase móvel e da coluna empregada na separação. Nos estudos de otimização foi empregado um planejamento fatorial completo 2^2 com adição de pontos centrais e um planejamento composto central para avaliar a influência da temperatura e do fluxo da fase móvel na separação do analito e quantificação. A validação foi realizada segundo as recomendações da ANVISA, sendo avaliados os parâmetros exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e repetibilidade. O método desenvolvido foi aplicado na análise de comprimidos comerciais fornecendo resultados adequados e comparados aos resultados obtidos utilizando a técnica de espectrofotometria UV, concluindo que a nova metodologia desenvolvida pode ser utilizada em análises de rotina, com resultados confiáveis.

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um dos maiores problemas da saúde pública. O tratamento da HAS se baseia na mudança de estilo de vida ou na terapia medicamentosa. Um grande problema existente no mundo todo com relação aos medicamentos é o da falsificação e/ou adulteração (PASTORE, 1998). O uso de medicamentos falsificados ou de má qualidade pode resultar em ineficiência de tratamentos médicos, no caso de os pacientes não receberem a quantidade necessária do princípio ativo, ou em sérios danos à saúde, quando os produtos são adulterados ou produzidos deliberadamente com substâncias inadequadas (OLIVEIRA, 2011). A inocuidade e eficácia de um medicamento são determinadas segundo métodos de controle de qualidade seguindo orientações da farmacopeia. A determinação do teor do princípio ativo permite verificar a quantidade de fármaco presente em uma preparação farmacêutica.

A Losartana potássica (LOS) é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento de pacientes com hipertensão. A Farmacopeia Brasileira descreve somente um método de análise destinado à determinação da qualidade da matéria prima da LOS, logo, inexiste uma metodologia analítica destinada à análise deste analito em formulações farmacêuticas (FARMACOPEIA et al., 2010).

Diante desse contexto este trabalho teve por objetivo desenvolver, otimizar e validar um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise de formulações farmacêuticas contendo a LOS em sua composição. Ferramentas quimiométricas de planejamento de experimentos foram empregadas para a otimização do método analítico. A validação foi realizada de acordo com as recomendações da ANVISA (BRASIL, 2003) e os resultados obtidos pela aplicação do método proposto foram comparados com aqueles obtidos utilizando a espectrofotometria de absorção molecular no UV previamente descrita na literatura.

Materiais e Métodos

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento do método analítico foram todos de grau HPLC. O princípio ativo de LOS utilizado é um padrão secundário validado por padrões USP, com teor declarado de 99,8%. Os equipamentos utilizados para o estabelecimento da rotina analítica foram: banho de ultrassom, balança analítica, HPLC Shimadzu equipado com unidades de bombeamento de solventes, auto-injetor, forno de colunas, detector de rede de fotodiodos e controlador do sistema e software LC solution. As colunas utilizadas foram a coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e a coluna C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). As amostras de LOS 50mg foram adquiridas em farmácias locais.
Soluções padrão de LOS com concentração de 1,00 mg mL^{-1} (solução estoque) foram preparadas pela dissolução de 100,0 mg de LOS com água ultrapura e transferidas para balão de 100,0 mL. As soluções foram filtradas em filtro PTFE de 0,45 µm, transferidas para um frasco âmbar e mantidas sob refrigeração por até 30 dias. O procedimento para o preparo das soluções das amostras foi realizado conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira. Para cada amostra foi pesado o equivalente a 50,0 mg de LOS, diluídas com água ultrapura em banho de ultrassom por 20 minutos, transferindo para um balão volumétrico de 50,0 mL. As soluções foram diluídas com a própria fase móvel para a concentração de 1,5 µg mL^{-1} e mantidas em frasco âmbar sob refrigeração até o momento das análises. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm antes de serem transferidas para os vials no momento da análise.

Resultados e Discussão

Um experimento preliminar foi realizado utilizando uma coluna C18 de 250 mm utilizando as condições descritas acima para análise de uma solução contendo 20 µg mL^{-1} de LOS. A corrida cromatográfica foi monitorada com o detector de arranjo de diodos (DAD). O comprimento de onda de 254 nm foi selecionado, pois o mesmo apresentou um cromatograma com linha base mais estável e picos de maior intensidade o que favorece a quantificação para o fármaco em estudo. Entretanto, o pico apresentou certo alargamento, dando indícios de que o fluxo da fase móvel e ou o volume de injeção deveriam ser ajustados. Testes foram realizados alterando a vazão e o volume de injeção. Observou-se que os volumes de injeção maiores independentemente da vazão empregada apresentavam maior alargamento do pico cromatográfico. A influência da composição da fase móvel foi investigada empregando diferentes proporções de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) e água ultrapura. Realizou-se ainda uma análise utilizando as mesmas condições experimentais descritas alterando a fase móvel para a mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v). Neste teste o pico cromatográfico apresentou melhor simetria em relação aos anteriores e menor encaudamento. Diante destes resultados

preliminares a próxima etapa iniciou o processo da otimização das condições experimentais.

Para otimização do método cromatográfico foi empregado o planejamento fatorial completo 2^2 com adição de pontos centrais. Para concluir a otimização um planejamento composto central foi realizado. A escolha dos fatores foi baseada em experimentos preliminares e conhecimento prévio da literatura, sendo avaliados: fluxo (mL min^{-1}) e temperatura da coluna e fixado a fase móvel acetonitrila:água (50:50, v/v), volume de injeção 10 µL utilizando a coluna C18 de 250 mm de comprimento. Foram monitorados como resposta três parâmetros: Fator de encaudamento (Fator F), tempo de retenção e Área do pico. Os resultados foram analisados todos juntos, utilizando o programa *Statistic versão 13.0.*

A condição prevista como ótima (Figura 1) indicou que a condição correspondente a valores experimentais de fluxo 0,6 mL min^{-1} e temperatura 40°C, é a condição experimental adequada obtendo-se um pico cromatográfico de boa simetria e resolução. A análise variância (ANOVA) foi realizada no planejamento para verificação da significância do modelo matemático e verificou-se que o modelo ajustado aos dados experimentais obtidos foi capaz de predizer com uma confiabilidade de 99,3% o comportamento da variável dependente (área do pico) frente as variáveis independentes estudadas (fluxo e temperatura). O modelo não apresentou falta de ajuste.

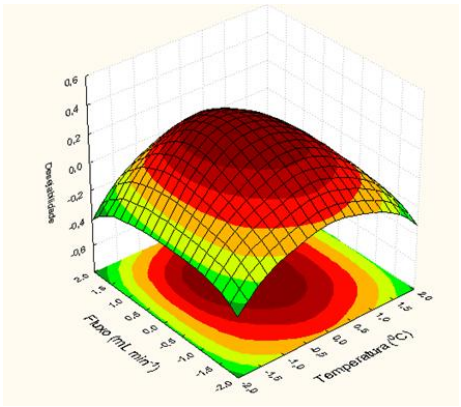


Figura 1 – Superfície de resposta obtida no estudo de otimização das condições cromatográficas para análise de LOS.

A partir da melhor condição cromatográfica obtida pelo planejamento experimental, construiu-se uma curva analítica para LOS, em triplicata, no intervalo de 0,5 a 5,0 µg mL^{-1}. Plotando-se os valores da áreas obtidas em função da concentração de LOS obteve-se uma relação linear no intervalo de 0,5 a 3,0 µg mL^{-1} com coeficiente de correlação de 0,9998. Acima da concentração de 3,0 µg mL^{-1} desvios da linearidade foram observados.

O método desenvolvido foi aplicado para a quantificação de LOS em formulações farmacêuticas adquiridas em farmácias locais. Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto estão apresentados na Tabela 1. A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas através da aplicação dos testes F e t, respectivamente. Para tanto os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com àqueles obtidos pela aplicação do método de referência (espectrofotometria de absorção molecular UV). Em todos os casos, os valores obtidos pelo método proposto mostraram-se em boa concordância com os obtidos pelo método de referência. Os valores de F e t calculados não excederam os valores tabelados, indicando desta forma a precisão e exatidão do método desenvolvido, com um nível de confiança de 95%. As porcentagens médias de recuperação foram

de 96,0 – 103,0 % com desvio padrão relativo menor que 5,0% em todos os casos. Para avaliação da precisão intradia foram realizadas análises em replicatas (n = 5) para soluções de uma mesma amostra contendo o equivalente a 1,5 µg mL^{-1} de LOS e para estudo da precisão interdia foram executadas análises da amostra durante um período de 3 dias consecutivos. Os resultados obtidos, em termos de coeficiente de variação, foram de 0,7% e 1,2% respectivamente, evidenciando a boa reprodutibilidade do método desenvolvido. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados como sendo 0,10 µg mL^{-1} e 0,33 µg mL^{-1}, respectivamente, indicando uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido. A repetibilidade do método proposto foi avaliada para uma série de 5 determinações independentes em três níveis de concentração de uma amostra de LOS. Os desvios padrão relativos encontrados foram de 1,4 %, 0,9 % e 0,5 % para a determinação de (A) 0,6 µg mL^{-1}, (B) 1,0 µg mL^{-1} e (C) 2,0 µg mL^{-1} de LOS, respectivamente.

Tabela 1 – Resultados obtidos pela aplicação do método desenvolvido para a quantificação de LOS.

		Método proposto		Método de referência	
Amostra	Valor nominal (mg)	Quantidade encontrada (mg)[a]	t valor (2,78)[b]	F valor (19,00)[b]	Quantidade encontrada (mg)[a]
A	50,0	51,5 ± 0,3	0,76	1,44	51,6 ± 0,2
B	50,0	48,6 ± 0,4	0,74	0,72	48,8 ± 0,6
C	50,0	48,1 ± 0,3	0,76	0,85	48,2 ± 0,4

[a] média de e determinações ± SD
[b] Valor tabelado com um nível de confiança de 95 %.

Conclusões

Pelos resultados obtidos foi possível o desenvolvimento de uma metodologia analítica sensível, rápida e seletiva para determinação de LOS em amostras comerciais, podendo ser utilizada em análises de rotina para a sua determinação. A utilização do planejamento de experimentos foi essencial para que o método tivesse a melhor otimização, possibilitando picos simétricos e resoluções excelentes. Na aplicação nas amostras de comprimidos, foi possível quantificar a LOS com exatidão e precisão aceitáveis.

Agradecimentos

Agradeço ao LABMU pelos equipamentos cedidos para os experimentos.

Referências

Farmacopeia Brasileira. 5º ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 1101-1102, 2010.

OLIVEIRA, G. C. R. Falsificação de medicamentos no Brasil, monografia apresentada como requisito para conclusão do curso de bacharelado em Direito do Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2011.

PASTORE, K. **Revista Veja**, v. 31, n. 27, p. 40, 1998.