

## **Validação parcial da análise de comprimidos de maleato de enalapril 20 mg e verificação da concentração do ativo e produto de degradação enalaprilato em medicamento de referência e similar utilizado em hospitais públicos de Recife-PE**

**Eduardo José Alécio Oliveira<sup>1</sup>, Hezrom Saulo do Nascimento Júnior<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Doutor em Ciências Biológicas – IFPE. e-mail: edualecifpe@gmail.com

<sup>2</sup>Aluno do Curso Técnico em Química Industrial – IFPE. Bolsista PIBIC-TÉCNICO/IFPE. e-mail: hsaulo@msn.com

**Resumo:** O maleato de enalapril é um anti-hipertensivo cuja instabilidade química foi reportada para alguns comprimidos genéricos e similares. Foi realizada até o momento uma etapa analítica prévia de verificação das condições de separação de maleato de enalapril e enalaprilato, um dos produtos de degradação, usando método de cromatografia líquida de alta eficiência; e de verificação do tempo morto e da eficiência da coluna cromatográfica usada. Fez-se isso através de análises de soluções padrões individuais ou mistas de enalaprilato, maleato de enalapril e uracil. As condições de separação mostraram-se adequadas entre o maleato de enalapril e enalaprilato, verificadas pelo cálculo da Resolução (R) igual a 2.10 e da retenção relativa do enalaprilato ( $\alpha$ ) que foi 0,26, tomando o enalapril como referência. A eficiência da coluna cromatográfica, Zorbax®, foi confirmada com número de pratos teóricos por metro de 2771 para o enalapril. O tempo morto foi de 1,7 minutos. Assim, foi possível prosseguir com a validação do método para comprimidos de maleato de enalapril.

**Palavras-chave:** comprimidos, CLAE, maleato de enalapril, validação

### **1. INTRODUÇÃO**

A estabilidade química de formas farmacêuticas de drogas deve ser garantida antes de sua comercialização e averiguada pelas indústrias que as fabricam sempre que mudanças significativas forem feitas, por exemplo, na produção, conforme estabelecido na RDC Nº 17 (BRASIL, 2010). O cuidado com a estabilidade deve continuar com a manutenção das condições ideais de armazenamento e transporte, tendo em vista que a formação de produtos de degradação dos fármacos em formas de dosagem implica na perda de potência e de propriedades terapêuticas. Além disso, os produtos da degradação podem ser tóxicos (DIEGO *et al.*, 2011).

O enalapril é uma pró-droga, empregada no tratamento anti-hipertensivo na forma de sal maleato (Figura 1), e que após sua administração oral é hidrolisada na molécula ativa enalaprilato, que atua como inibidor da enzima conversora de angiotensina – ECA. Os dois maiores produtos de degradação do enalapril são enalaprilato e dicetopiperazina. (BHARDWAJ e SINGH, 2008).

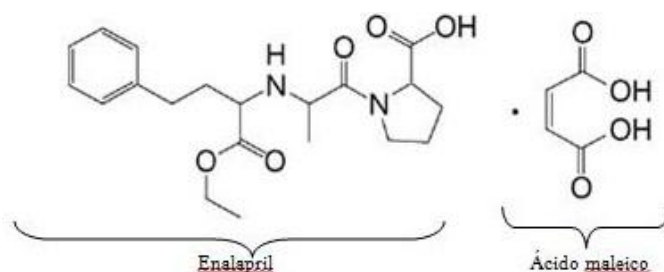


Figura 1 fórmula estrutural de maleato de enalapril (fonte: BHARDWAJ e SINGH, 2008, adaptado).

Em estudo realizado por LIMA *et al.* (2007) foi mostrado que genéricos e similares do comprimido de maleato de enalapril, após estudos de estabilidade, apresentaram níveis do ativo abaixo dos limites estabelecidos pela farmacopeia brasileira, ou seja, 90% a 110% do rotulado (BRASIL, 2010). Assim, este trabalho teve por objetivo validar parcialmente um método cromatográfico para análise de comprimidos de maleato de enalapril, a fim verificar não somente a concentração do ativo,



mas também de um dos principais produtos de degradação, enalaprilato, em medicamento de referência e similar disponibilizado em hospitais públicos de Recife-Pernambuco. Para tanto, foi necessária a verificação prévia das condições de separação dos analitos.

A validação é parcial tendo em vista que o método já foi validado totalmente segundo a RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003) para a análise da matéria-prima do fármaco e seus principais produtos de degradação. Assim é necessária a averiguação dos parâmetros principais, a saber: especificidade, precisão (inter e intra-dias), linearidade e exatidão.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Foram utilizadas: matéria-prima maleato de enalapril grau farmacêutico (Dinalab®, Lote: 15961 LAFEPE), que é um padrão secundário de pureza de 98,39% frente à substância química de referência (SQR) INCQS; SQR Enalaprilato (United States Pharmacopeia - USP) e Uracil (Sigma®).

Para o preparo da fase móvel e solução diluente foram utilizados: acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker® ou Vetec®), água purificada e as substâncias grau p.a. hidróxido de sódio (F. maia®), ácido fosfórico (Cinética Química®) e fosfato de sódio monobásico (Synth®).

### 2.2 Equipamento

Cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu® constituído de uma bomba modelo LC-20AT acoplada a degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, detector UV/VIS SPD-M20A, módulo controlador CBN-20A, forno CTO-20A e autoamostrador SIL-20A. As análises foram realizadas em coluna Zorbax® SB -C18 marca Agilent de 250 mm x 4,6 mm DI, partículas de 5 µm com pré-coluna Zorbax® SB -C18 4-Pack marca Agilent de 4,6 x 12,5 mm DI, partículas de 5 µm e os cromatogramas, analisados em programa LC solution versão 1.11 SP1 da Shimadzu®.

### 2.3 Análises cromatográficas

#### 2.3.1 Preparo das amostras

As Diluições das substâncias padrão foram realizadas com solução diluente constituída de tampão fosfato de sódio monobásico 0,023M, pH = 2,5/acetoneitrila (95/5) e a substância uracil, diluída com água ultrapura, obtendo-se as concentrações de análise. Antes de serem injetadas, as amostras foram filtradas em membrana de 0,2 µm.

#### 2.3.2 Condições analíticas

Temperatura de 60°C na coluna cromatográfica, fase móvel constituída de duas soluções contendo tampão fosfato de sódio monobásico 0,023M, pH=6,8/acetoneitrila, nas seguintes proporções: Solução A: 19/1 e Solução B: 17/33; fluxo da fase móvel de 1,5 mL/min, volume de injeção de 50µL, comprimento de onda de 215 nm e eluição em gradiente, exceto quando dito em contrário, de acordo com o descrito em Tabela 1.

Tabela 1 programa gradiente para análise do maleato de enalapril (USP - THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2007).

Tempo (minutos)	Solução A (%)	Solução B (%)	Eluição
0	95	5	equilíbrio
0 – 20	95 - 40	5 - 60	gradiente linear
20 – 25	40	60	isocrático
25 – 26	40 - 95	60 – 5	gradiente linear
26 - 30	95	5	isocrático



#### 2.4 Verificação das condições cromatográficas

Para a identificação dos picos e determinação dos tempos de retenção do enalapril, enalaprilato e ácido maléico nas condições analíticas predeterminadas, foram injetadas amostras de solução diluente (branco das amostras), de solução padrão de maleato de enalapril a 200 µg/mL e de solução de enalaprilato a 4 µg/mL e a 16 µg/mL, as quais foram analisadas em modo gradiente.

A fim de constatar o tempo morto do sistema cromatográfico foi injetada solução de uracil a 8 µg/mL, que foi analisada em modo isocrático, Solução A/Solução B 70:30, considerando que o uracil tem tempo de retenção equivalente ao tempo morto, pois ele não é retido em colunas de octadecilsílica (C18).

Na averiguação das condições de separação de maleato de enalapril e enalaprilato, foi injetada solução padrão mista de maleato de enalapril a 200 µg/mL e enalaprilato a 4 µg/mL e analisada em modo gradiente. Em seguida, foram calculados, a partir dos cromatogramas obtidos, fator de resolução (R) entre enalapril e enalaprilato, bem como a retenção relativa ( $\alpha$ ) de enalaprilato, tomando enalapril como referência. Além disso, foram injetadas amostras de solução diluente e solução padrão de maleato de enalapril a 200 µg/mL e analisadas em modo isocrático, Solução A/Solução B 70:30, sendo possível, assim, determinar a eficiência da coluna cromatográfica, em número de pratos teóricos por metro, para o enalapril.

#### 2.5 Validação Parcial

Será realizada a fim de provar que o método, descrito na seção 2.3, é apropriado para a finalidade pretendida (BRASIL, 2003), através de testes de: especificidade, precisão (inter e intra-dias), linearidade e exatidão, seguindo os conceitos destes parâmetros propostos na RE 899/2003 (BRASIL, 2003).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Verificação das condições cromatográficas

##### 3.1.1 Identificação de picos cromatográficos

Os cromatogramas obtidos na análise em gradiente de solução diluente, solução de maleato de enalapril a 200 µg/mL e solução de enalaprilato a 4 µg/mL estão representados, respectivamente, nas Figuras 2, 3 e 4.

Sabendo que as soluções de maleato de enalapril e enalaprilato foram feitas com substâncias padrões, que possuem elevada pureza garantida, ao confrontarem-se os cromatogramas da solução diluente (branco) e os das soluções de maleato de enalapril e enalaprilato foi possível e com confiança identificar o pico dos analitos. A bem da verdade, foi necessária, para o enalaprilato, outra evidência para a confirmação do respectivo pico, que foi a injeção de uma solução desse composto em concentração maior, 16 µg/mL, com cromatograma representado na Figura 5, o que possibilitou verificar aumento da área de um pico que aparecera quando na injeção da solução de enalaprilato a 4 µg/mL (Figura 4).

Ao comparar-se o cromatograma da solução diluente com o da solução de maleato de enalapril a 200 µg/mL, verificou-se, nesse último, a presença de dois picos adicionais em relação ao cromatograma do diluente. Um deles, com alta intensidade e tempo de retenção menor que 2,0 minutos (Figura 3), pico semelhante tem sido apontado na literatura como sendo do ácido maléico (BHARDWAJ; SINGH, 2008). Logo, o outro é do enalapril, pois o maleato de enalapril só é constituído desses dois componentes (Figura 1).

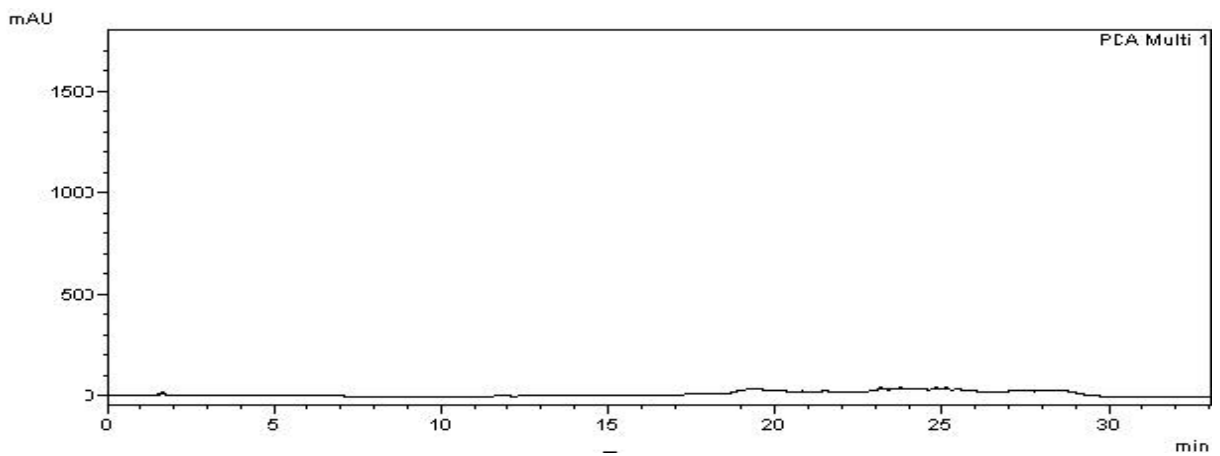


Figura 2 cromatograma da solução diluente (tampão fosfato de sódio monobásico 0,023M, pH = 2,5/acetoneitrila 95:5) em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5 $\mu$ m), modo gradiente USP, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda$  = 215nm.

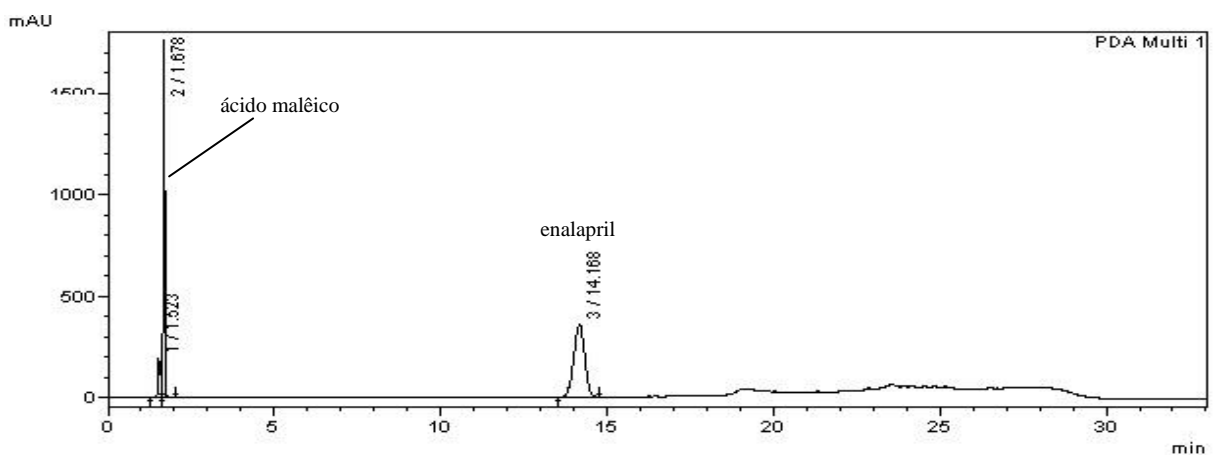


Figura 3 cromatograma de solução de maleato de enalapril a 200  $\mu$ g/mL (padrão secundário) em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5 $\mu$ m), modo gradiente USP, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda$  = 215nm.

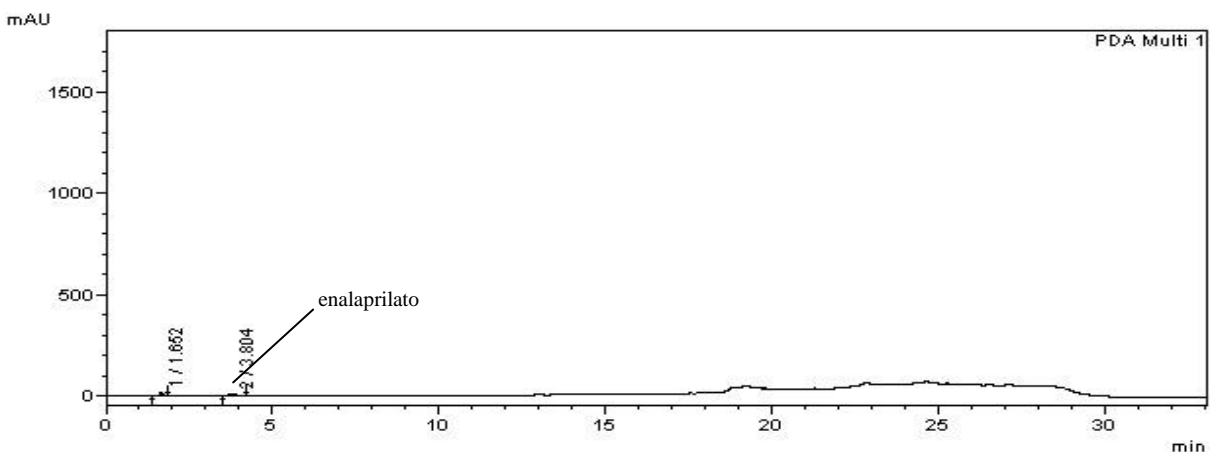


Figura 4 cromatograma de solução de enalaprilato a 4  $\mu$ g/mL em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5 $\mu$ m), modo gradiente USP, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda$  = 215nm.



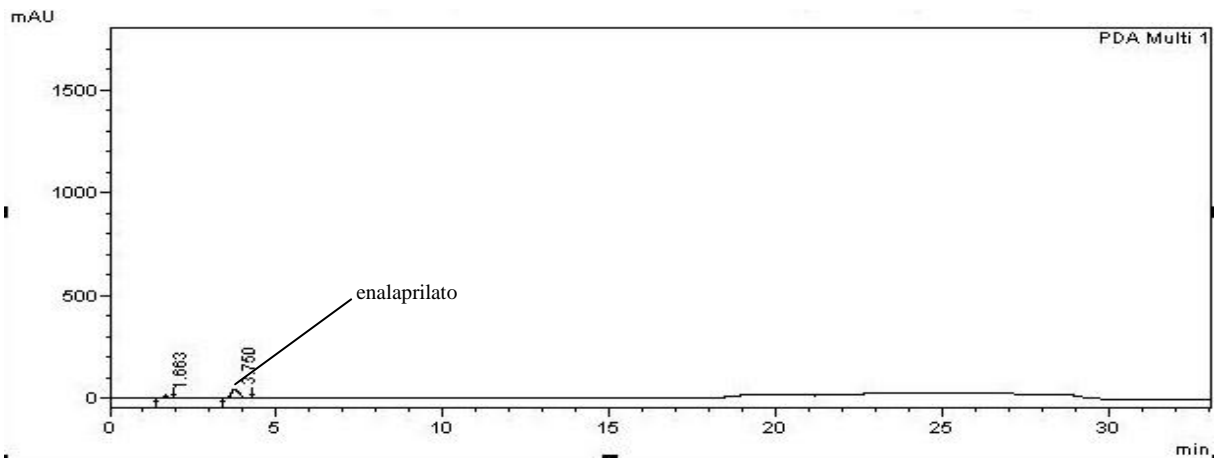


Figura 5 cromatograma de solução de enalaprilato a 16 µg/mL em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5µm), modo gradiente USP, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda = 215\text{nm}$

Os tempos de retenção de ácido malêico, enalapril e enalaprilato foram, respectivamente, 1,7, 14,2 e 3,8 minutos.

### 3.1.2 Tempo morto da coluna cromatográfica

Os cromatogramas da análise em modo isocrático (Solução A/Solução B 70:30) de uracil a 8 µg/mL e do seu diluente, água ultrapura, estão representados nas Figuras 7 e 6, respectivamente.

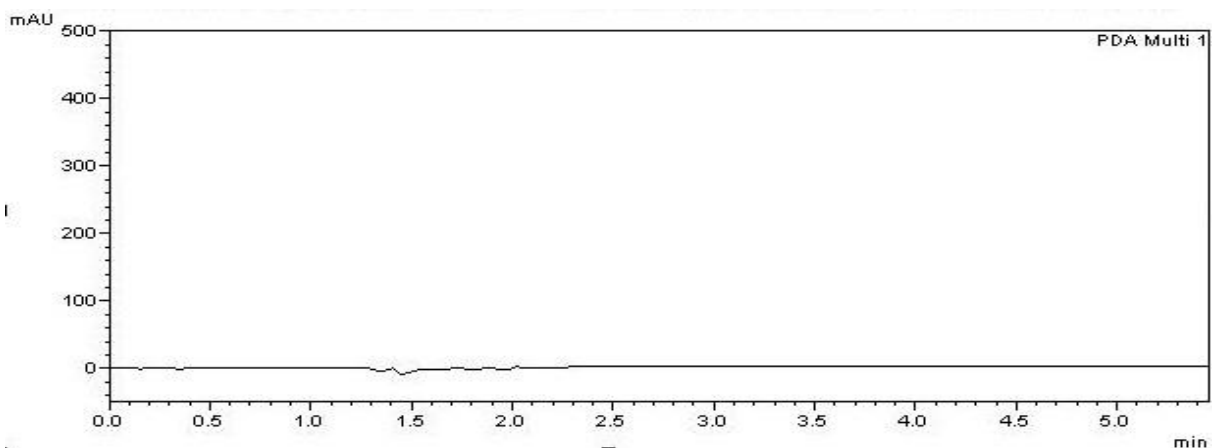


Figura 6 cromatograma de água ultrapura, diluente da solução de uracil a 8 µg/mL, em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5µm), modo isocrático, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda = 215\text{nm}$ .

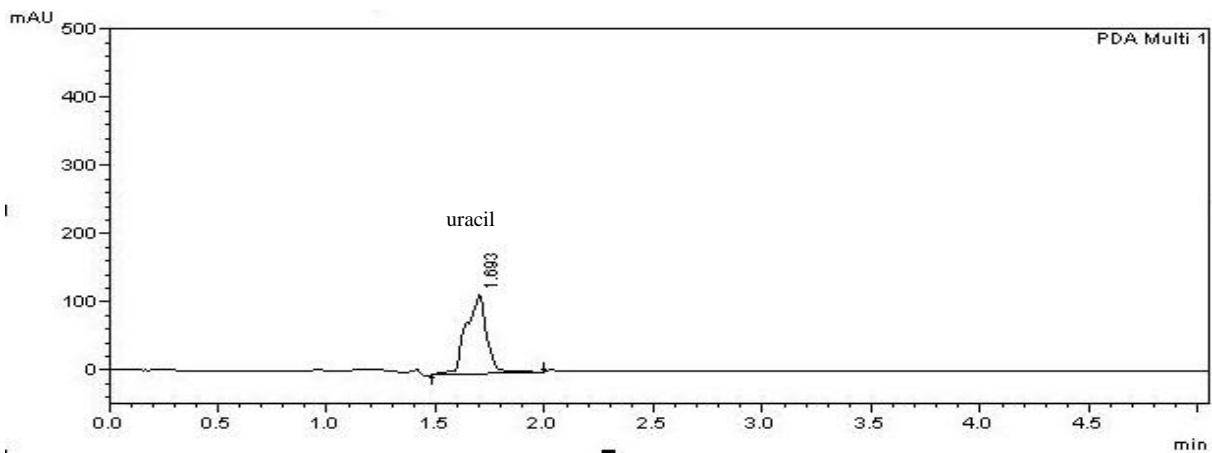


Figura 7 cromatograma de solução de uracil a 8 µg/mL em coluna Zorbax(R) SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5µm), modo isocrático, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda = 215\text{nm}$ .

O tempo de retenção do uracil foi de 1,7 minutos e equivale ao tempo morto do sistema cromatográfico em que foi analisado

### 3.1.3 Condições de separação

O cromatograma da análise em gradiente da solução mista de maleato de enalapril 200 µg/mL e enalaprilato 4µg/mL, representado na Figura 8, mostrou que foi obtida uma boa separação dos componentes nas condições analíticas estabelecidas, confirmada matematicamente pelo fator de resolução (R) entre o enalapril e enalaprilato, de  $2 \cdot 10^1$ . Além disso, as retenções relativas ( $\alpha$ ) do enalaprilato e do enalapril, tomando-se como referência o enalapril, foram, respectivamente, 0,2664 e 1,000, sabendo que os tempos de retenção deles foram, na mesma ordem anterior, 3,743 e 14,050. Esses resultados para resolução e retenção relativa são aceitáveis ao compararmos com o estabelecido na farmacopeia brasileira (BRASIL, 2010) para seu método de análise do maleato de enalapril por cromatografia líquida de alta eficiência, ou seja, resolução entre enalapril e enalaprilato que não seja menor que 2,0 e retenção relativa de aproximadamente 0,3 e 1,0 para enalaprilato e enalapril, respectivamente.

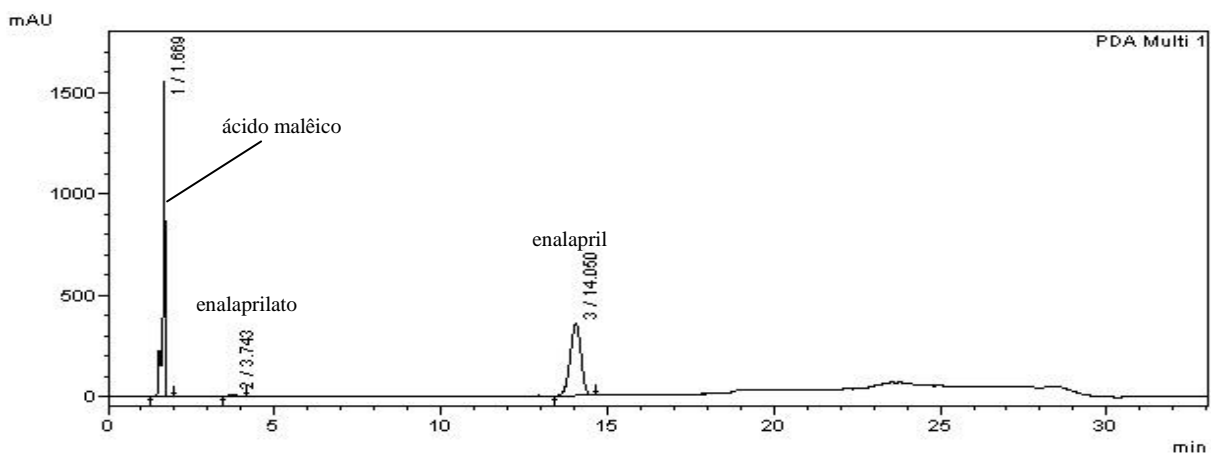


Figura 8 cromatograma de solução mista de maleato de enalapril(padão secundário) 200 µg/mL e enalaprilato USP 4µg/mL em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5µm), modo gradiente USP, vazão de 1,5 mL/min e  $\lambda = 215\text{nm}$ .

### 3.1.4 Eficiência da coluna cromatográfica

Os cromatogramas das análises em modo isocrático (Solução A/Solução B 70:30) da solução diluente e da solução de maleato de enalapril a 200 µg/mL, estão representados, respectivamente, nas Figuras 9 e 10. O número de pratos teóricos por metro foi 2771 para o enalapril, o que é aceitável, sabendo que para um método isocrático de análise de maleato de enalapril por cromatografia líquida de alta eficiência da farmacopeia brasileira (BRASIL, 2010) é assumida como adequada uma eficiência que não seja menor que 300 pratos por metro para o enalapril.

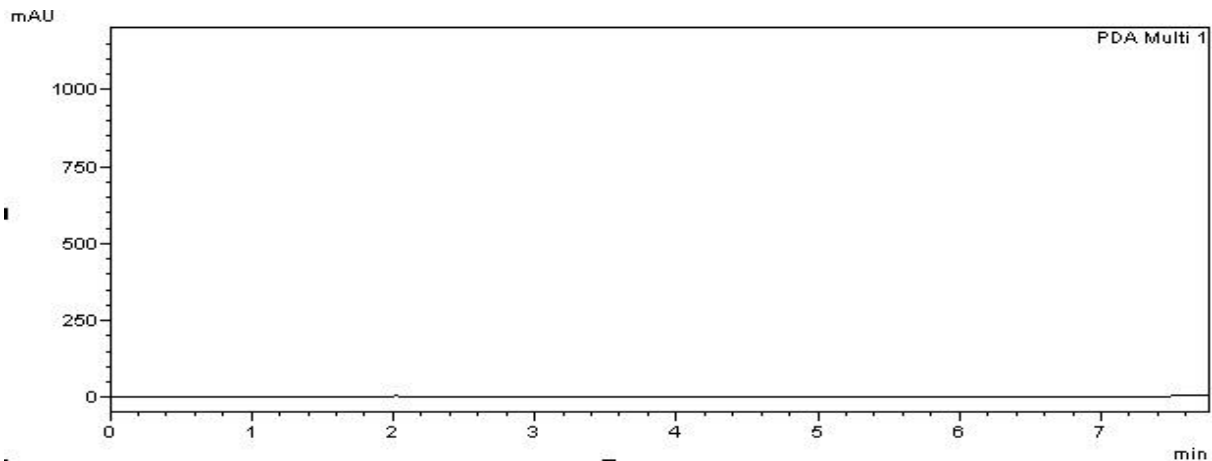


Figura 9 cromatograma de solução diluente (tampão fosfato de sódio monobásico 0,023M, pH = 2,5/acetonitrila 95:5) em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5µm), modo isocrático, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda = 215\text{nm}$ .

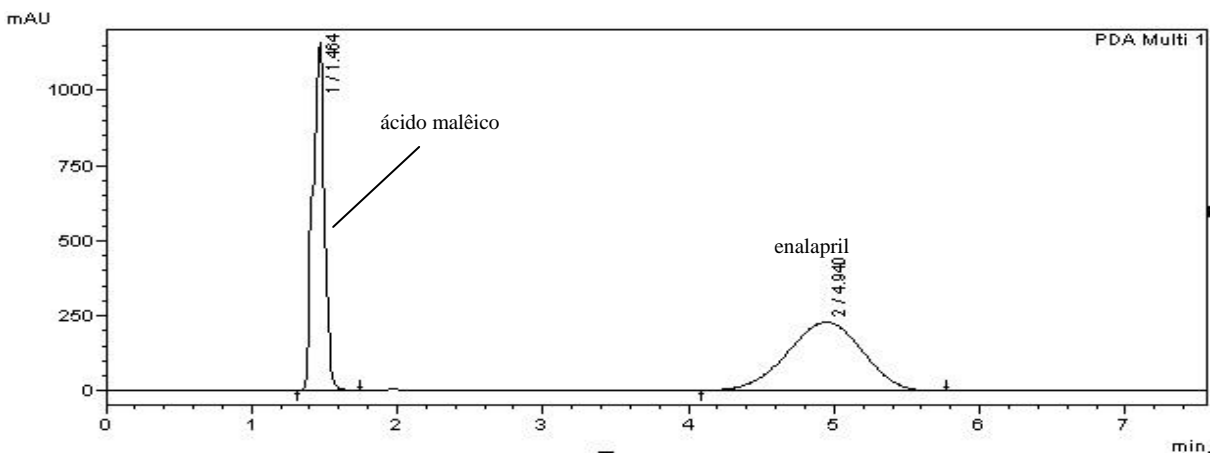


Figura 10 cromatograma de solução de maleato de enalapril a 200 µg/mL (padrão secundário) em coluna Zorbax® SB- C18 (250mm x 4,6mm DI, 5µm), modo isocrático, vazão de 1,5mL/min e  $\lambda = 215\text{nm}$ .

## 6. CONCLUSÕES

Na verificação preliminar das condições de separação entre maleato de enalapril e enalaprilato foram verificadas aceitáveis resolução e retenção relativa e a eficiência da coluna cromatográfica para o enalapril também se mostrou adequada. Dessa forma, os testes de validação para comprimidos poderão ser executados com confiança e conhecendo-se os parâmetros básicos do sistema cromatográfico.

## AGRADECIMENTOS



A Deus, Ao IFPE pela concessão da bolsa de iniciação (PIBIC-TÉCNICO) e ao meu orientador Prof. Eduardo Alécio.

## REFERÊNCIAS

BHARDWAJ, S. P.; SINGH, S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Oxford, v.46, n. 1, p.113-120, Jan. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5 ed.. Brasília, 2010. 2v., p. 1109.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 abr. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

DIEGO, M. de *et al.* Chemical stability of enalapril maleate drug substance and tablets by a stability-indicating liquid chromatographic method. Química Nova, São Paulo, v.34, n.3, 450-454, 2011.

LIMA, D.M.; SANTOS, L.D.; LIMA, E.M. Perfil de estabilidade e biodisponibilidade dos comprimidos de maleato de enalapril de diferentes especialidades farmacêuticas. Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia, v. 4, n.2, 32-35, 2007. Suplemento.

USP - THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. United States Pharmacopeia. 30<sup>th</sup> ed. Rockville, 2007. 2v. p. 2030.