

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA UTILIZADAS PARA OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE CITRATO DE SILDENAFIL

MATUMOTO, Paula Yoshie; ALCÂNTARA, Francisco Carlos de
paulinha.matumoto@gmail.com
Centro de Pós Graduação Oswaldo Cruz

Resumo: *Estudo comparativo entre as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) utilizadas para otimização de metodologia analítica de identificação e quantificação de Citrato de Sildenafil. Este trabalho tem como objetivo analisar e comentar os principais aspectos da otimização da metodologia analítica de HPLC e UPLC, avaliando as diferenças e similaridades das cromatografias e resultados obtidos, empregando-se o método em desenvolvimento e o método de referência. Além disso, consiste em demonstrar os benefícios que a otimização pode trazer para a rotina de trabalho como, por exemplo, gerar dados rastreáveis e confiáveis, intensificando a quantidade de análises realizadas e liberação dos lotes, além de diminuir o tempo de trabalho e custos.*

Palavras-Chave: Cromatografia, Hplc, Uplc, Citrato de Sildenafil.

Abstract: *Comparative study of the techniques of high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography ultra efficiency (UPLC) for optimization of analytical methodology for the identification and quantification of Sildenafil Citrate. This work aims to analyze and comment on key aspects of the optimization of the analytical methodology of HPLC and UPLC, evaluating the differences and similarities of chromatograms and results obtained, using the method in development and the reference method, also is to demonstrate the benefits that optimization can bring to work routine, for example, generate traceable and reliable data, intensifying the amount of analyzes and lot release, in addition to reducing labor time and costs.*

Keywords: Chromatography, Hplc, Uplc, Sildenafil Citrate.

1. INTRODUÇÃO

O citrato de sildenafil se tornou um dos ativos mais populares e amplamente utilizados por não se restringir apenas ao tratamento de disfunção erétil, sendo reconhecido também pelos seus efeitos benéficos para hipertensão pulmonar e em pacientes com insuficiência cardíaca, além de ser bem-sucedida, uma vez que, pode ser utilizado por via oral. (WANNMACHER, 2006)

Devido à disfunção erétil acometer aproximadamente 150 milhões de homens em todo mundo e ao uso de Citrato de Sildenafil em diversos tratamentos, a produção mundial de medicamentos cresce a cada ano, necessitando de uma técnica eficiente para o seu controle de qualidade e, por este motivo, o método de cromatografia tem sido extensivamente desenvolvido nos últimos anos e é considerado indispensável devido à eficiência e facilidade de separação e quantificação de diversos compostos. (COLLINS, 2006).

Como resultado de algumas dificuldades analíticas e desenvolvimento da técnica, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sofreu otimização dos parâmetros em vista de um emprego mais amplo e mais eficiente. A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) utiliza os mesmos princípios do HPLC, ou seja, envolve colunas recheadas com materiais específicos, fase móvel eluída por alta pressão e tem a capacidade de separar vários compostos em pequena escala de tempo com alta resolução em função de sua pressão elevada e associado a colunas sub 2 μm de alta eficiência. Esta técnica tem sido considerada o avanço mais recente das técnicas de separação, levando em consideração a complexidade dos materiais utilizados, parâmetros e condições de análises. (COLLINS, 2006)

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação que passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, baseada no equilíbrio dos componentes de interesse, entre duas fases imiscíveis: fase estacionária e fase móvel. Ambos influenciam nas interações analíticas e no tempo de retenção dos analitos. (ROUSSEAC, 2007)

Em torno dos anos 60, foram introduzidas as colunas de 40-50 μm , mecanicamente resistentes e próprias a serem usadas com pressão. Ofereciam maiores eficiências, 1000 pratos/15cm, devido à camada porosa fina de partículas peliculares, porém, apresentavam baixa capacidade de amostra. (MALDANER, 2009)

Com o intuito de contornar as desvantagens apresentadas pelas colunas de partículas de diâmetro maior, ocorreu uma transição para partículas porosas menores, com diâmetro em torno de 10 μm . Observou-se ganho de eficiência, 6000 pratos/15cm, entretanto, com baixa reprodutibilidade. Foram introduzidas as partículas esféricas não porosas de 1,5 μm , com as quais foram obtidas colunas com eficiência de 30000 pratos/15cm, sem perda de desempenho cromatográfico e mais resistentes e estáveis a altas pressões e temperaturas, porém, estas partículas resultam em menor capacidade da amostra que as partículas porosas. (MALDANER, 2009)

Após anos de desenvolvimento, surgiram as partículas esféricas porosas de 1,7 μm que, comparadas às partículas de 3-5 μm , permitem melhores resoluções e altas eficiências, 30000 pratos/15cm. Estas necessitam de uma instrumentação mais sofisticada para serem empregadas com o máximo de desempenho cromatográfico. (MALDANER, 2009)

Os desenvolvimentos significativos alcançados na última década foram consequência do uso intenso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no mundo todo, como uma técnica de análise de rotina em laboratórios e, dessa forma, a busca por análises mais rápidas e com bom desempenho cromatográfico tornou-se evidente e necessária. (MALDANER, 2009)

Uma das alternativas foi o uso de colunas mais curtas associadas a vazões mais elevadas de fase móvel (FM) para as análises e os tempos de reequilíbrio das colunas serem mais

rápidos e as pressões serem compatíveis com os sistemas convencionais de CLAE, altas temperaturas também foram empregadas como alternativa, mas diminuiu-se a viscosidade da fase móvel e, conseqüentemente, gera menores pressões no sistema cromatográfico, além de poucos materiais serem estáveis a essas condições com possibilidade de degradação dos compostos. (MALDANER, 2009)

Recentemente, o uso de partículas menores que 2 μm , em sistemas cromatográficos com pressões convencionais, tem diminuído bastante o tempo de análise, entretanto, o máximo desempenho cromatográfico tem sido limitado pela pressão. (MALDANER, 2009)

Com isso, sistemas capazes de trabalhar em altas pressões foram desenvolvidos e esse avanço foi denominado cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). (MALDANER, 2009)

2.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência

A CLUE é a mais recente técnica de separação, baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência e utiliza fases estacionária com partículas menores que 2 μm . O uso destas partículas juntamente com altas velocidades lineares da fase móvel aumenta a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo de análise. (ANTUNES, 2010)

A instrumentação da CLUE (bombas, injetores e detectores) pode operar em pressões acima de 100 Mpa e foi introduzido e adaptado às necessidades atuais.

As modificações requeridas em um sistema de CLUE são: capacidade de trabalhar em pressões muito altas, volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e dados, colunas resistentes para trabalharem em altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos. E os parâmetros a serem otimizados são o volume de injeção e a vazão da fase móvel.

Na transferência de um método de separação, o principal fator que influencia é a razão entre o volume extra coluna e o volume total (extra coluna e coluna), este deve ser menor que 10%, tanto na CLAE quanto na CLUE e quando não há compatibilidade, provoca alargamento do pico cromatográfico.

Além disso, para a transferência do método ser eficiente a fase estacionária empregada deve ser similar à do método já existente.

A possibilidade de transferência de um método já desenvolvido e protocolado empregando um sistema de CLAE para um de CLUE é um aspecto muito importante a ser considerado e para garantir que o método analítico gere informações compatíveis, confiáveis e rastreáveis, este deve sofrer uma avaliação denominada validação.

2.3. Validação

Segundo a Anvisa, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. (ANVISA)

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados, não só por questões regulatórias, mas principalmente, para assegurar resultados eficientes e reproduzíveis

Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. (RIBANI, 2004)

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método e pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares que o método será utilizado. (RIBANI, 2004)

Os parâmetros de desempenho analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação; precisão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. (RIBANI, 2004).

2.4. Citrato de sildenafil

Quimicamente designado como citrato de 1-[[3-(6,7-diidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1h-pirazol-[4,3-dipirimidin-5-il]-4-etóxfenil)sulfonyl]-4-metilpiperazina (FIGURA 1).

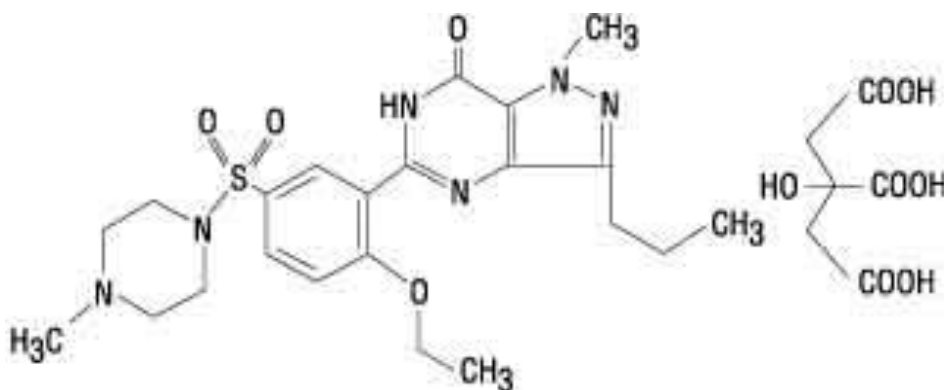


Figura 1 Estrutura química do Citrato de Sildenafil.

Fonte: Damião (2009).

Em 1992, descobriu-se que o Citrato de Sildenafil não contribuía para o tratamento de angina, ou seja, após os testes, o aumento de fluxo sanguíneo para o coração era insignificante.

Após longos anos de estudos e experiências o Food and Drugs Administration (FDA), nos Estados Unidos, aprovou a venda do mesmo em 1998, tornando-se o primeiro medicamento de uso oral aprovado para o tratamento da disfunção erétil. (TORRES, 2012).

Trata-se de um inibidor seletivo de enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), o qual age restaurando a função erétil, resultando em uma resposta natural à estimulação sexual. (NEW JERSEY, 2001)

Estas enzimas hidrolisam o nucleotídeo guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e exercem um papel crítico na modulação da via de sinalização do segundo mensageiro.

Com isso, promove um aumento nas concentrações intracelulares do GPMc, prolongando a sua ação, o que resulta em maior relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso e, portanto, potencializa a ereção.

Além da PDE5 estar presente nos corpos cavernosos do pênis, ela também está na vasculatura pulmonar, aumentando o GMPc nas células do músculo liso dos vasos pulmonares e resultando no seu relaxamento.

Em virtude dos grandes benefícios como boa tolerância e uma baixa incidência de efeitos colaterais, o sildenafil tornou-se um dos ativos mais populares e amplamente utilizados, além de não se restringir apenas ao tratamento de disfunção erétil, sendo reconhecido também pelos seus efeitos benéficos para hipertensão pulmonar e em pacientes com insuficiência cardíaca. (WANNMACHER, 2006)

Segundo Katsung (2009), entretanto, o sildenafil tem pouco ou nenhum valor para homens com perda da potência devido à lesão da medula espinhal ou outra lesão de inervação, bem como para homens que carecem de libido. Além disso, o Sildenafil a ação dos nitratos utilizados para a angina, e foi relatada a ocorrência de hipotensão grave e de alguns casos de infarto do miocárdio em homens que fazem uso de ambas as drogas. O sildenafil também possui o efeito sobre a visão para cores, causando dificuldade na discriminação do verde e azul. (KATSUNG, 2009).

2.5. Experimental e dados gerais de análise

Com base experimental, os dados abaixo relatam os números estimados do método de referência e o método em desenvolvimento, possibilitando a avaliação dos parâmetros de análise.

A análise foi efetuada sob a mesma amostra e padrão, todos os solventes foram de grau HPLC e as colunas utilizadas foram adequadas para cada sistema.

Na **Tabela 1** são apresentados dados estimados como valor gasto de fase móvel para 1 litro, número de injeções por análise e lotes analisados por ano e são considerados juntamente com outros parâmetros.

O tempo de análise é determinado conforme a **Figura 2** e percebe-se uma redução do mesmo e menor volume gasto de fase móvel para técnica de CLUE.

Na **Tabela 3**, o tempo gasto por lote e ano é comparado considerando o fluxo, tempo de análise e número de injeções para cada técnica e para a análise de custos na **Tabela 4**, considerou-se custo em reais por análise para 1 litro de fase móvel, volume gasto de fase móvel calculado com o seu respectivo fluxo e lotes analisados por ano.

Tabela 1 Dados estimados para análise em ambas as técnicas de CLAE e CLUE.

Dados estimados para análise	
Valor gasto por análise (1 litro de FM)	R\$ 400,00
Número de injeções por análise	15
Lotes analisados por ano	40

Fonte: Autoria própria, 2012.

Tabela 2 Tempo de análise, fluxo e volume de fase móvel estimados para cada técnica.

	Tempo de análise	Fluxo	Volume de fase móvel gasto/lote
HPLC	34 minutos	1,5 mL/min	765 mL
UPLC	5 minutos	0,28 mL/min	21 mL

Redução	29 minutos	-	744 mL
----------------	------------	---	--------

Fonte: Autoria própria, 2012.

Tabela 3 Tempo gasto aproximado por lote e ano.

	Tempo gasto/lote	Tempo gasto/ano
HPLC	13 horas	520 horas
UPLC	1 hora	40 horas
Redução	12 horas	480 horas

Fonte: Autoria própria, 2012.

Tabela 4 Custo em reais por lote e ano.

	Custo em R\$/lote	Custo em R\$/ano
HPLC	306,00	12.240,00
UPLC	8,40	336,00
Redução	297,60	11.904,00

Fonte: Autoria própria, 2012.

2.6. Cromatogramas de análise

Na **Figura 2**, os cromatogramas ilustrativos da metodologia analítica de identificação e quantificação de Citrato de Sildenafil demonstram o tempo de análise e a detectabilidade das técnicas de CLAE e CLUE.

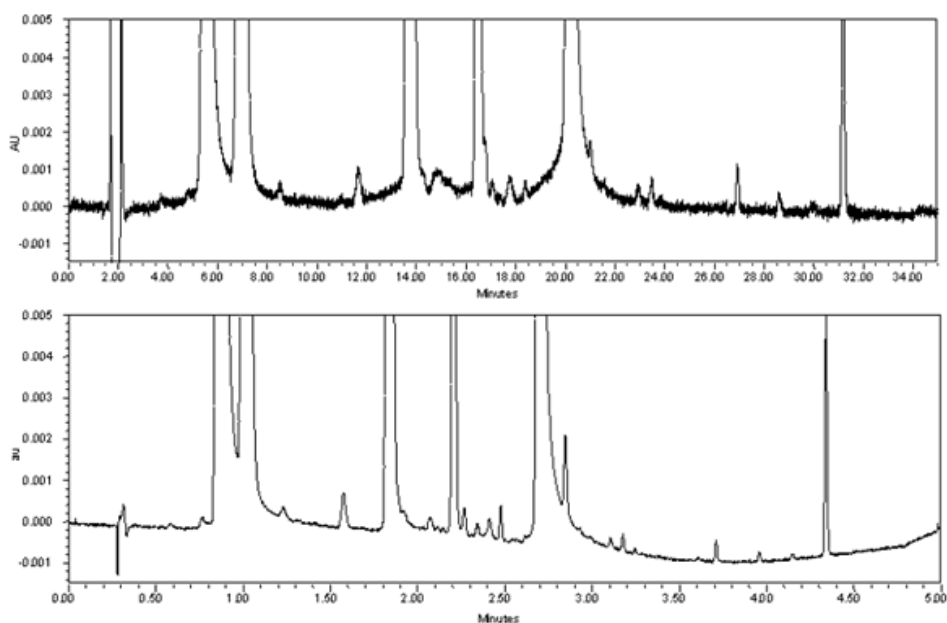


Figura 2 Cromatograma 1 para HPLC e cromatograma 2 para UPLC.

Fonte: Autoria própria, 2012.

3. CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi demonstrado a otimização de metodologia analítica de HPLC por UPLC e o objetivo foi analisar e obter melhores condições experimentais para diversas variáveis.

Com a otimização de método, pode haver uma redução de até 10 vezes no tempo de corrida cromatográfica, quando comparado ao sistema convencional (HPLC) e também uma redução no volume de solventes utilizados na análise, otimizando assim, gastos e a emissão de resíduos.

Conforme análise dos cromatogramas ilustrativos, os resultados obtidos empregando o sistema CLUE em relação ao CLAE foram superiores. Confirmou-se que o tempo de análise de CLUE é reduzido em 12 horas por lote e 480 horas por ano e analisando a **Tabela 2**, há uma redução de gasto de 744 mL de fase móvel, o que proporciona um menor gasto com solventes e, conseqüentemente, diminuiria o valor gasto por análise.

Na comparação de custos, os resultados também foram satisfatórios para o sistema CLUE com redução de valores por lote e por ano.

Pode-se avaliar também o aumento de detectabilidade com uso de colunas $\leq 2 \mu\text{m}$ e altas pressões, uma vez que as duas técnicas empregaram o mesmo detector.

Apesar de todas as vantagens, CLUE é uma técnica muito recente e ainda está em processo de desenvolvimento. A rápida difusão está relacionada principalmente à disponibilidade de instrumentação desenvolvida e adequada para a técnica.

4. REFERÊNCIAS

Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº 899, de 20/05/2003.

CAPUANO, V. **Efeito do Citrato de Sildenafil sobre o controle autonômico cardiovascular em ratos normotensos.** Disponível em: < www.uftm.edu.br >. Acesso em: 19 de setembro de 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. I.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia.** Campinas, 2006.

DAMIÃO, R. **Consenso Brasileiro de Disfunção Erétil** 1ª edição, 1998.

DEGANI A. L. G.; CASS Q. B.; VIEIRA. P. C **Cromatografia: Um breve Ensaio.** Disponível em: <www.sbj.org.br>. Acesso em: 02 de junho de 2012.

EDIVAN T.; COLLINS K. E.; JARDIM I. C. S.; COLLINS C. H. **Fases Estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados.** Disponível em: < www.scielo.br>. Acesso em: 02 de junho de 2012.

KATSUNG, G. B. **Farmacologia Básica e Clínica** 9ª edição, 2005. Pagina 159.

MARGOTTO, P. R. **Uso do sildenafil na hipertensão pulmonar persistente em recém nascido .** *Comun. Cienc. Saúde*, 17(2): 141- 154, 2006.

MOURA, R.L. **Aspectos farmacológicos do citrato de sildenafil no tratamento de disfunção erétil.** Disponível em: <www.moreirajr.com.br>. Acesso em: 26 de setembro de 2012.

ROUSSEAC, F.; ROUSSEAC, A. **Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques**, University of Le Mans, France, 2007.

The Merck Index. an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 13 rd ed., Merck & Co. Inc: New Jersey, 2001.

TORRES, L.O. **Sildenafil: eficácia, segurança e efeito sobre a pressão arterial postural em homens com 70 ou mais anos portadores de disfunção erétil.** Disponível em: <www.moreirajr.com.br>. Acesso em: 26 de setembro de 2012.

WANNMACHER,L. **Sildenafil: mais potencial do que potência?** Disponível em: <www.portal.saude.gov.br>. Acesso em: 11 de junho de 2012.

WEINERT, P. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. **Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas.** Disponível em: <www.scielo.br>. Acesso em: 02 de junho de 2012.

