

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DA ESTABILIDADE  
DE RABEPRAZOL SÓDICO**

**CÁSSIA VIRGINIA GARCIA**

Porto Alegre, 2007.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DA ESTABILIDADE  
DE RABEPRAZOL SÓDICO**

Tese apresentada por **Cássia Virginia Garcia** para  
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Co-orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2007 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cristiane de Bona da Silva  
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

G216v	Garcia, Cássia Virginia Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico / Cássia Virginia Garcia – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - 252 p.: il., gráf., tab. Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Rabeprazol sódico. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Estabilidade. 4. Degradação. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Steppe, Martin. III. Título.  CDU: 615.2.07
-------	--

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento e bolsa de estudos da CAPES, e na *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales da Universidad de Buenos Aires/Argentina*, através do Programa CAPES-PDEE.



*A meus pais, Juarez e Tânia,  
pelo amor e incentivo...*

*À minha irmã Fá, ao Xandê e ao  
Tiaguinho, pela torcida...*





---

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação, incentivo e carinho, sempre presentes.

Ao Professor Dr. Martin Steppe pela orientação desde o mestrado e pela constante dedicação e amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS.

À Professora Dra. Norma Nudelman e aos colegas Cecília, Cristian, Raquel e Álvaro, da FCEyN, da Universidad de Buenos Aires, pela oportunidade de estágio e colaboração.

Ao Professor Dr. André Jablonski e aos colegas do Laboratório de Geoquímica Ambiental pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade: Alini, Clésio, Cris, Heloísa, Júlia, Juliana S., Juliana R., Lauren, Letícia, Magda, Marcelo, Mariana, Patrícia e Vanessa pela amizade, discussões e momentos alegres. Em especial, ao Andreas pelo apoio e carinho.

Às grandes amigas Ana Rita e Carol, pelos gestos de amizade, convivência e apoio em tantos momentos importantes.

Aos colegas e professores do Laboratório de Controle de Qualidade: Tércio, Célia, Nadia, Leila, Lorena, Dani, Kaká e Rose, pela colaboração e amizade.

À Simone Oliveira, Juliane Fleck e Inara Staub pelo auxílio.

À Renata Müller pela amizade e alegria de tantos anos.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos.

A todos que mesmo não citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...

---

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
APRESENTAÇÃO.....	xxix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
2.1 Objetivos gerais.....	07
2.2 Objetivos específicos.....	07
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1 Doenças relacionadas ao ácido gástrico.....	11
3.2 Inibidores da bomba de prótons.....	12
3.3 Mecanismo de ação.....	14
3.4 Rabeprazol.....	16
3.5 Características farmacocinéticas.....	18
3.6 Síntese.....	18
3.7 Descrição.....	20
3.8 Análise quantitativa.....	20
3.9 Estudos de estabilidade.....	22
4. CAPÍTULO I – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	23
4.1 INTRODUÇÃO.....	25
4.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.2.1 Caracterização da substância química de referência (SQR).....	34
4.2.1.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	34
4.2.1.1.1 Resultados e discussão.....	34
4.2.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	36
4.2.1.2.1 Resultados e discussão.....	36
4.2.2 Identificação da amostra no produto farmacêutico.....	44
4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	44
4.2.2.1.1 Resultados e discussão.....	45
4.2.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	46
4.2.2.2.1 Resultados e discussão.....	47
4.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	49
4.2.2.3.1 Resultados e discussão.....	50
4.2.2.4 Eletroforese capilar (EC).....	52
4.2.2.4.1 Resultados e discussão.....	53
4.2.3 Análise quantitativa.....	55
4.2.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	55
4.2.3.1.1 Avaliação da especificidade.....	55
4.2.3.1.2 Curva de Ringbom.....	56

---

---

4.2.3.1.3 Curva padrão.....	58
4.2.3.1.3.1 Cálculos para a curva padrão.....	58
4.2.3.1.4 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.....	58
4.2.3.1.4.1 Cálculos para a determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.....	59
4.2.3.1.5 Teste de recuperação.....	60
4.2.3.1.5.1 Cálculo para o teste de recuperação.....	60
4.2.3.1.6 Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	61
4.2.3.1.7 Resultados.....	62
4.2.3.1.8 Discussão.....	68
4.2.3.2 Espectrofotometria ultravioleta derivada.....	70
4.2.3.2.1 Avaliação da especificidade.....	70
4.2.3.2.2 Curva padrão.....	70
4.2.3.2.2.1 Cálculos para a curva padrão.....	71
4.2.3.2.3 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.....	71
4.2.3.2.4 Teste de recuperação.....	72
4.2.3.2.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	72
4.2.3.2.6 Resultados.....	72
4.2.3.2.7 Discussão.....	77
4.2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	79
4.2.3.3.1 Teste de especificidade.....	79
4.2.3.3.2 Curva padrão.....	80
4.2.3.3.2.1 Cálculos para a curva padrão.....	80
4.2.3.3.3 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.....	80
4.2.3.3.4 Teste de recuperação.....	81
4.2.3.3.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	82
4.2.3.3.6 Avaliação da robustez.....	82
4.2.3.3.7 Resultados.....	82
4.2.3.3.8 Discussão.....	88
4.2.3.4 Eletroforese capilar.....	90
4.2.3.4.1 Teste de especificidade.....	90
4.2.3.4.2 Curva padrão.....	90
4.2.3.4.2.1 Cálculos para a curva padrão.....	91
4.2.3.4.3 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.....	91
4.2.3.4.4 Teste de recuperação.....	91
4.2.3.4.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	92
4.2.3.4.6 Resultados.....	93
4.2.3.4.7 Discussão.....	96
4.2.4 Teste de dissolução dos comprimidos revestidos.....	98
4.2.4.1 Determinação das condições <i>sink</i> .....	99
4.2.4.2 Avaliação da estabilidade nos meios.....	99
4.2.4.3 Avaliação da especificidade.....	100
4.2.4.4 Curva padrão.....	100
4.2.4.4.1 Cálculos para a curva padrão.....	100
4.2.4.5 Precisão.....	101
4.2.4.6 Exatidão.....	101
4.2.4.7 Quantidade dissolvida na etapa ácida.....	101
4.2.4.8 Determinação do perfil de dissolução.....	101
4.2.4.9 Resultados.....	101
4.2.4.10 Discussão.....	108

---

---

4.3 DISCUSSÃO DO CAPÍTULO I.....	111
4.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO I.....	115
4.5 PUBLICAÇÕES.....	119
5. CAPÍTULO II – ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	147
5.1 INTRODUÇÃO.....	149
5.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	153
5.2.1 Avaliação preliminar da estabilidade de rabeprazol.....	155
5.2.1.1 Estabilidade térmica.....	155
5.2.1.1.1 Resultados.....	156
5.2.1.1.2 Discussão.....	157
5.2.1.2 Estabilidade em meio ácido.....	158
5.2.1.2.1 Resultados.....	159
5.2.1.2.2 Discussão.....	162
5.2.1.3 Estabilidade Oxidativa.....	163
5.2.1.3.1 Resultados.....	163
5.2.1.3.2 Discussão.....	165
5.2.1.4 Estabilidade frente à luz.....	166
5.2.1.4.1 Lâmpada UVC – 254 nm.....	166
5.2.1.4.1.1 Resultados.....	166
5.2.1.4.1.2 Discussão.....	169
5.2.1.4.2 Lâmpada metal haleto (HPA 400 W).....	170
5.2.1.4.2.1 Resultados.....	170
5.2.1.4.2.2 Discussão.....	172
5.2.2 Cinética de degradação fotoquímica de rabeprazol.....	173
5.2.2.1 Condições de estudo.....	173
5.2.2.2 Resultados.....	173
5.2.2.3 Discussão.....	176
5.2.3 Isolamento de produtos de degradação.....	177
5.2.3.1 Cromatografia em camada delgada preparativa.....	178
5.2.3.2 Cromatografia em coluna.....	178
5.2.3.3 Resultados.....	179
5.2.3.4 Discussão.....	182
5.2.4 Identificação dos produtos de degradação.....	183
5.2.4.1 Resultados e Discussão.....	184
5.2.4.1.1 DP16.....	184
5.2.4.1.2 DP19.....	188
5.2.4.1.3 DPclorofórmico.....	193
5.3 DISCUSSÃO DO CAPÍTULO II.....	201
5.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO II.....	206
6. REFERÊNCIAS.....	210
7. ANEXO.....	222

---

---

---

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Estrutura do rabeprazol sódico.	4
Figura 3.1 –	Estruturas dos inibidores da bomba de prótons.	13
Figura 3.2 –	Estrutura do novo inibidor da bomba de prótons tenatoprazol.	13
Figura 3.3 –	Mecanismo de ação dos inibidores da bomba de prótons.	16
Figura 3.4 –	Representação esquemática da síntese de rabeprazol.	19
Figura 4.1 -	Espectro na região do infravermelho de rabeprazol sódico SQR.	35
Figura 4.2 –	Espectro de RMN de hidrogênio de rabeprazol sódico SQR, em metanol deuterado (500 MHz).	37
Figura 4.3 –	Espectro de RMN de carbono 13 de rabeprazol sódico SQR, metanol deuterado (500 MHz).	38
Figura 4.4 –	Espectro COSY de rabeprazol sódico SQR em metanol deuterado (500 MHz).	40
Figura 4.5 –	Espectro HSQC de rabeprazol sódico SQR, em metanol deuterado (500MHz)	41
Figura 4.6 –	Espectro HMBC de rabeprazol sódico SQR, em metanol deuterado (500 MHz).	42
Figura 4.7 -	Perfil cromatográfico das amostras rabeprazol sódico SQR, produto farmacêutico e omeprazol.	45
Figura 4.8 -	Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos, em água.	47
Figura 4.9 -	Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos, em metanol.	48
Figura 4.10 -	Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos, em etanol.	48
Figura 4.11 –	Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.	51
Figura 4.12 –	Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.	54
Figura 4.13 –	Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria ultravioleta para as soluções de rabeprazol sódico SQR e de placebo.	62
Figura 4.14 –	Representação gráfica da curva de Ringbom obtida a partir da análise das soluções de rabeprazol sódico SQR, por espectrofotometria na região do ultravioleta.	64

---

---

Figura 4.15 –	Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por espectrofotometria ultravioleta, a 291 nm.	66
Figura 4.16 -	Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR e de solução placebo obtidos por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem, N = 5.	73
Figura 4.17 –	Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem, N =5.	75
Figura 4.18 –	Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.	84
Figura 4.19 –	Cromatogramas obtidos através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência das soluções de rabeprazol sódico SQR e de solução placebo.	86
Figura 4.20 -	Cromatogramas de solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos obtidos na avaliação da robustez.	87
Figura 4.21 –	Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por eletroforese capilar.	94
Figura 4.22 –	Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de rabeprazol sódico SQR e de solução placebo.	96
Figura 4.23 -	Perfil de decaimento de rabeprazol sódico nas duas primeiras horas de avaliação de sua estabilidade nos meios de dissolução.	102
Figura 4.24 -	Perfil de decaimento de rabeprazol sódico na mistura tampão borato pH 9,0 e acetonitrila (50:50 v/v) por CLAE.	103
Figura 4.25 -	Cromatograma da amostra placebo, em tampão borato pH = 9,0.	103
Figura 4.26 –	Espectro UV da solução placebo, em tampão borato pH = 9,0.	104
Figura 4.27 -	Representação gráfica da curva padrão por CLAE para o teste de dissolução comprimidos de rabeprazol sódico.	106
Figura 4.28 -	Perfil de dissolução de comprimidos revestidos de rabeprazol sódico usando tampão borato pH 9,0 como meio e velocidade de 75 rpm.	107
Figura 5.1 –	Cromatograma ampliado obtido a partir de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos armazenados a 50 °C, durante 20 dias.	156
Figura 5.2 -	Cromatograma ampliado obtido a partir de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos armazenados a 80 °C, durante 4 dias.	157
Figura 5.3 –	Cromatograma de rabeprazol em ácido clorídrico 0,1 M por 15 minutos.	159

---

---

Figura 5.4 –	Cromatograma de rabeprazol em ácido clorídrico 0,1 M por 60 minutos.	160
Figura 5.5 –	Cromatograma de rabeprazol em meio ácido clorídrico 0,1 M, após 1 hora de contato. Coluna semipreparativa.	160
Figura 5.6 –	Cromatograma de rabeprazol em meio ácido clorídrico 0,05 M, após 1 hora de contato. Coluna semipreparativa.	161
Figura 5.7 –	Cromatograma de rabeprazol em meio ácido clorídrico 0,01 M, após 1 hora de contato. Coluna semipreparativa.	162
Figura 5.8 –	Cromatograma ampliado de rabeprazol em peróxido de hidrogênio 3%, sem aquecimento, após 1 hora (160 µg/ml).	164
Figura 5.9 –	Cromatograma ampliado de rabeprazol em peróxido de hidrogênio 3%, aquecido por 30 minutos (160 µg/ml).	164
Figura 5.10 –	Cromatograma ampliado de rabeprazol em peróxido de hidrogênio 30%, sem aquecimento, após 1 hora (160 µg/ml).	165
Figura 5.11 –	Cromatograma de solução aquosa de rabeprazol sódico, exposta à luz UVC 254 nm (15W) por 1 hora. Coluna semipreparativa.	167
Figura 5.12 –	Cromatograma de solução metanólica de rabeprazol sódico, exposta à luz UVC 254 nm (15W) por 1 hora. Coluna semipreparativa.	167
Figura 5.13 –	Cromatograma ampliado de comprimido triturado de rabeprazol em acetonitrila, exposto à lâmpada UVC – 254 nm por 10 dias.	168
Figura 5.14 –	Cromatograma de comprimido intacto de rabeprazol em acetonitrila, exposto à lâmpada UVC – 254 nm por 50 dias. Coluna semipreparativa.	169
Figura 5.15 –	Cromatograma de solução metanólica de rabeprazol sódico, exposta à lâmpada metal-haleto (400 W) por 10 minutos. Coluna semipreparativa.	171
Figura 5.16 –	Cromatograma de solução aquosa de rabeprazol sódico (800 µg/ml), exposta à lâmpada metal-haleto (400 W) por 45 minutos. Coluna semipreparativa.	171
Figura 5.17 –	Representação gráfica da fotodegradação de rabeprazol em solução metanólica, em função do tempo, expostas à lâmpada UVC- 254 nm (15 W).	175
Figura 5.18 –	Representação esquemática do isolamento dos produtos de fotodegradação de rabeprazol sódico.	179
Figura 5.19 –	Cromatograma do produto de degradação isolado por CCD preparativa a partir de solução metanólica de rabeprazol, exposta à lâmpada UVC- 254 nm por 1 hora.	180
Figura 5.20 –	Cromatograma da fração 3 da coluna, eluída com diclorometano-metanol, proporção 90:10, v/v.	181

---



---

Figura 5.21 –	Cromatograma do produto de degradação DP19, após purificação em CCD preparativa.	182
Figura 5.22 -	Espectro de RMN de hidrogênio do produto de degradação DP16, em metanol deuterado (500MHz) (a), ampliação da região aromática (b).	184
Figura 5.23 –	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do produto de degradação DP16 em metanol deuterado (500MHz).	185
Figura 5.24 -	Espectro COSY do produto de degradação DP16, em metanol deuterado (500 MHz).	186
Figura 5.25 –	Espectro HSQC do produto de degradação DP16, em metanol deuterado (500 MHz) (a), ampliação da região aromática (b).	186
Figura 5.26 –	Espectro HMBC do produto de degradação DP16 em metanol deuterado (500 MHz).	187
Figura 5.27 –	Estrutura proposta para o produto de degradação isolado DP16: 1H-benzimidazol.	188
Figura 5.28 –	Espectro de RMN do produto de degradação DP19 em metanol deuterado (500 MHz) (a), ampliação da região aromática (b).	189
Figura 5.29 –	Espectro de <sup>13</sup> C do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).	190
Figura 5.30 –	Espectro COSY do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).	191
Figura 5.31 –	Espectro HSQC do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).	191
Figura 5.32 –	Espectro HMBC do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).	192
Figura 5.33 –	Estrutura proposta para o produto de degradação isolado DP19: 1,3-diidro-benzimidazol-2-ona.	193
Figura 5.34 –	Espectro RMN de hidrogênio do produto de degradação DPclorofórmico, em clorofórmio deuterado (200 MHz).	194
Figura 5.35 –	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do produto de degradação DPclorofórmico, em clorofórmio deuterado (200 MHz).	195
Figura 5.36 –	Estrutura proposta para o produto de degradação DPclorofórmico: [4-(3-metoxi-propoxi)-3-metil-piridina-2-il]metanol.	197
Figura 5.37 –	Perfil cromatográfico das amostras benzimidazol (benz), DP16 e DP19, após revelação com luz ultravioleta	197
Figura 5.38 –	Cromatogramas de benzimidazol (a) e DP16 (b), em metanol.	198
Figura 5.39 –	Cromatograma de benzimidazol (800 µg/ml) exposto à	199

---

---

radiação UVC por 90 minutos, em metanol.

Figura 5.40 – Cromatograma de benzimidazol em peróxido de hidrogênio 200  
30%, após 30 minutos de aquecimento.

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Principais freqüências obtidas do espectro de infravermelho de rabeprazol sódico SQR.	34
Tabela 4.2 -	Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de <sup>13</sup> C, HSQC, <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY e HMBC, em metanol-d <sub>3</sub> , de rabeprazol sódico SQR.	43
Tabela 4.3 –	Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE.	50
Tabela 4.4 –	Condições analíticas utilizadas no desenvolvimento do método por eletroforese capilar.	53
Tabela 4.5 –	Preparo das soluções para obtenção da curva de Ringbom de rabeprazol sódico por espectrofotometria no UV.	57
Tabela 4.6 –	Preparo das soluções para o teste de recuperação pelo método de espectrofotometria ultravioleta a 291 nm.	60
Tabela 4.7 –	Valores de absorvância obtidos através do método espectrofotométrico na região do UV e, valores calculados de absorvância utilizados para a construção da curva de Ringbom.	63
Tabela 4.8 –	Valores de absorvância obtidos no desenvolvimento da curva padrão por espectrofotometria na região do ultravioleta no comprimento de onda de 291 nm.	65
Tabela 4.9 –	Análise de variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de rabeprazol sódico através da espectrofotometria no ultravioleta, a 291 nm.	66
Tabela 4.10 –	Determinação do teor de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria no ultravioleta, a 291 nm, em três dias diferentes.	67
Tabela 4.11 –	Resultados referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria ultravioleta, a 291 nm.	67
Tabela 4.12 –	Preparo das soluções para o teste de recuperação utilizando o método de espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.	72
Tabela 4.13 –	Valores de absorvância obtidos no desenvolvimento da curva padrão por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1ª ordem.	74
Tabela 4.14 –	Análise de variância das absorvâncias determinadas para a curva padrão de rabeprazol sódico através da espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.	75
Tabela 4.15 –	Determinação do teor de rabeprazol sódico em comprimidos através da análise por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem, realizada em três dias diferentes.	76

---

---

Tabela 4.16 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.	76
Tabela 4.17 – Preparo das soluções para o teste de recuperação utilizando o método de CLAE.	81
Tabela 4.18 – Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de rabeprazol sódico por cromatografia líquida de alta eficiência.	83
Tabela 4.19 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de rabeprazol sódico através de cromatografia líquida de alta eficiência.	84
Tabela 4.20 – Determinação do teor de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência em três dias diferentes.	85
Tabela 4.21 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por cromatografia líquida de alta eficiência.	85
Tabela 4.22 – Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência.	87
Tabela 4.23 – Preparo das soluções para o teste de recuperação utilizando o método de eletroforese capilar.	92
Tabela 4.24 – Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de rabeprazol sódico por eletroforese capilar.	93
Tabela 4.25 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de rabeprazol sódico através de eletroforese capilar.	94
Tabela 4.26 – Determinação do teor de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por eletroforese capilar em três dias diferentes.	95
Tabela 4.27 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por eletroforese capilar.	95
Tabela 4.28 – Condições empregadas no teste de dissolução de comprimidos de rabeprazol sódico.	99
Tabela 4.29 – Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão por CLAE para o teste de dissolução de comprimidos de rabeprazol sódico.	105
Tabela 4.30 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do teste de dissolução por CLAE para comprimidos de rabeprazol sódico.	106
Tabela 4.31 - Quantidade de rabeprazol sódico dissolvida no teste de dissolução (n = 12).	107
Tabela 5.1 – Valores de concentração de rabeprazol em soluções metanólicas expostas à lâmpada UVC- 254 nm (15 W) por CLAE.	174

---

---

Tabela 5.2 -	Valores dos coeficientes de correlação, obtidos a partir de soluções metanólicas de rabeprazol expostas à lâmpada UVC- 254 nm.	174
Tabela 5.3 –	Valores de velocidade de degradação (K) de rabeprazol, obtidos segundo cinética de ordem zero, em solução metanólica.	176
Tabela 5.4 –	Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ , HSQC, $^1\text{H}$ , COSY e HMBC, em metanol deuterado, do produto de degradação DP16.	187
Tabela 5.5 –	Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ , HSQC, $^1\text{H}$ , COSY e HMBC, em metanol deuterado, do produto de degradação DP19.	193
Tabela 5.6 –	Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do produto de degradação DPclorofórmico, em clorofórmio deuterado e espectrômetro Bruker de 200 MHz.	196

---

---

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DP16	Produto de degradação com tempo de retenção de 16 min.
DP19	Produto de degradação com tempo de retenção de 19 min.
DPR	Desvio padrão relativo
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EC	Eletroforese capilar
e. p. m	Erro padrão da média
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
IV	Infravermelho
K	Constante de velocidade de degradação
r	Coefficiente de correlação
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta

---



---

---

---

## RESUMO

**Palavras-chave:** rabeprazol sódico, validação, estabilidade, produtos de degradação.

Neste trabalho, foram desenvolvidos e validados métodos qualitativos e quantitativos para o controle de qualidade de rabeprazol sódico, um inibidor da bomba de prótons. O fármaco apresenta eficácia comprovada na cicatrização, alívio de sintomas e prevenção de recidivas de úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico. A substância química de referência utilizada nas análises foi caracterizada por espectrofotometria no infravermelho e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), possibilitando a identificação das amostras. Os métodos quantitativos validados foram: UV, espectrofotometria ultravioleta derivada de primeira ordem, CLAE e EC. Todos demonstraram ser específicos, lineares, precisos, exatos e sensíveis. Além disso, o teste de dissolução para os comprimidos revestidos contendo rabeprazol foi desenvolvido e validado, obtendo-se um perfil de dissolução satisfatório. Outro objetivo deste trabalho foi o estudo da estabilidade de rabeprazol. Os fatores de degradação avaliados foram a temperatura (50 e 80 °C), a hidrólise em meio ácido (HCl 0,01-0,1M), a oxidação por peróxido de hidrogênio e a luz (UVC-254 nm e metal haleto). De modo geral, o fármaco demonstrou ser sensível a todos os fatores, principalmente quando em solução, mas de forma mais intensa frente à acidez e luz. A cinética de fotodegradação em metanol frente à lâmpada UVC foi determinada, indicando tratar-se de uma reação de ordem zero. Três produtos da fotodegradação foram isolados e identificados por ressonância magnética nuclear: 1H-benzimidazol, 1,3-diidro-benzimidazol-2-ona e [4-(3-metoxipropoxi)-3-metil-piridina-2-il]metanol. Alguns resultados sugerem que o 1,3-diidro-benzimidazol-2-ona também é formado na degradação em meio ácido.

---

---

---

---

## ABSTRACT

Validation of analytical methods and stability study of rabeprazole sodium.

**Keywords:** rabeprazole sodium, validation, stability, degradation products

In this work, qualitative and quantitative methods were developed and validated for the quality control of rabeprazole sodium, a proton pump inhibitor. The drug has proven efficacy in healing, symptoms relief and prevention of relapse of gastric ulcer and gastro-oesophageal reflux disease. The substance used as reference standard in the analysis was characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The qualitative analysis was performed by thin layer chromatography, UV spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE), allowing the identification of samples. The quantitative methods validated were: UV, first-order derivative spectrophotometry, HPLC and CE. All of them demonstrated to be specific, linear, precise, accurate and sensitive. Besides, the dissolution test for rabeprazole coated tablets was developed and validated, obtaining a satisfactory dissolution profile. Another objective of this work was the study of rabeprazole stability. The degradation factors evaluated were the temperature (50 and 80 °C), the acid (HCl 0.01-0.1 M), the oxidation by hydrogen peroxide and light (UVC-254 and metal halide). In general, the drug demonstrated to be sensitive to all factors studied, mainly in solution, but in a more intensive way front to acid and light. The photodegradation kinetics in methanol, front to UVC light was determined, indicating a zero-order reaction. Three photodegradation products were isolated and identified by nuclear magnetic resonance: 1H-benzimidazole, 1,3-diidro-benzimidazole-2-one and [4-(3-methoxy-propoxy)-3-methyl-pyridin-2-yl]methanol. Some results suggest that the 1,3-diidro-benzimidazole-2-one is also formed in the acidic degradation.

---

---

---

---

## APRESENTAÇÃO

Com o objetivo de tornar a leitura de fácil compreensão, este trabalho está apresentado da seguinte forma:

Introdução

Objetivos

Revisão Bibliográfica

Capítulo I – Validação de Métodos Analíticos – Introdução, Parte Experimental, Discussão, Conclusões e Publicações

Capítulo II – Estudo da Estabilidade - Introdução, Parte Experimental, Discussão e Conclusões

Referências

A Parte Experimental de cada Capítulo apresenta a descrição da metodologia, juntamente com os resultados e a discussão de cada experimento.

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

---



---

O Controle de Qualidade de Medicamentos é a área das Ciências Farmacêuticas responsável pela avaliação de inúmeras propriedades que conferem a qualidade das preparações farmacêuticas antes de serem distribuídas à população. Neste sentido, atua no desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para fármacos, no estudo da estabilidade de formulações, na análise de produtos de degradação e na padronização de procedimentos de produção.

O desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos para o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos deve ser realizado a partir de um bom planejamento. Os métodos devem permitir uma análise completa do produto, contemplando aspectos como a identificação e a determinação do teor de substância ativa, a identificação e determinação dos níveis de impurezas e produtos de degradação, e a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (WATSON, 1999).

O estudo da estabilidade de um produto pode ser realizado através de testes de degradação acelerada, que simulam condições desfavoráveis para manutenção da integridade física ou química da formulação e do fármaco nela contido.

O presente trabalho contempla o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de rabeprazol sódico, bem como o estudo da estabilidade do fármaco, abrangendo desde testes preliminares, frente a diferentes fatores, até o isolamento de produtos de degradação.

O rabeprazol sódico (Figura 1.1) é um dos fármacos inibidores da bomba de prótons, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1999. Apresenta eficácia comprovada na cicatrização, alívio de sintomas e prevenção de recidivas de úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico, além de integrar terapias de erradicação do microrganismo *Helicobacter pylori*, que coloniza a mucosa gástrica e está relacionado com aparecimento de úlceras e câncer gástrico (CARSWELL e GOA, 2001).

---

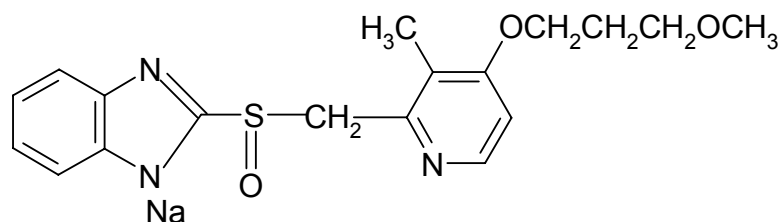


Figura 1.1 - Estrutura do rabeprazol sódico

A classe de medicamentos antiulcerosos foi a terceira em número de vendas, no ano 2005, destacando-se os inibidores da bomba de prótons (IMS GLOBAL, 2006). Este dado reflete a incidência deste tipo de desordem na população.

Nos últimos anos, houve um aumento no número de trabalhos referentes à determinação quantitativa de rabeprazol, principalmente em plasma humano. No entanto, não há monografia de rabeprazol em códigos oficiais e existe apenas uma referência em relação a estudos de sua estabilidade. Desta forma, este trabalho pretende ser uma contribuição para o controle de qualidade deste fármaco, disponibilizando dados importantes sobre sua estabilidade.

---

---

## **2. OBJETIVOS**

---

---

---

---

---

## 2.1 Objetivos gerais

O trabalho tem como objetivos gerais o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos, bem como a avaliação da estabilidade do fármaco, visando à elucidação de produtos de degradação.

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterização de rabeprazol sódico substância química de referência (SQR) através das técnicas de espectrofotometria no infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear;
  - Identificação de rabeprazol sódico, nas amostras de comprimidos revestidos, através de cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar;
  - Desenvolvimento e validação de métodos por espectrofotometria na região ultravioleta e ultravioleta derivada para determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos;
  - Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de rabeprazol sódico na forma farmacêutica;
  - Desenvolvimento e validação de método por eletroforese capilar para doseamento de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos;
  - Desenvolvimento e validação do teste de dissolução dos comprimidos revestidos contendo rabeprazol sódico;
  - Estudo preliminar da estabilidade de rabeprazol sódico frente à temperatura, oxidação, acidez e luz;
  - Isolamento de produtos de fotodegradação majoritários de rabeprazol sódico, utilizando cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa;
-

- 
- Identificação dos produtos de fotodegradação isolados, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.
-

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

---

---



---

### 3.1 Doenças relacionadas ao ácido gástrico

A acidez gástrica representa um fator crítico para a saúde gastrintestinal como um todo, estando envolvida na doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), nas úlceras pépticas (gástricas ou duodenais), na síndrome de Zollinger-Ellison e no epitélio de Barret (HORN, 2000).

A úlcera péptica é uma área de escoriação da mucosa gastrintestinal, mais freqüente nos dois primeiros centímetros do duodeno, na pequena curvatura do antro do estômago e menos freqüente na extremidade inferior do esôfago (GUYTON e HALL, 1997; VASCONCELLOS, 1998). Sua etiologia é multifatorial, refletindo um desequilíbrio entre os fatores agressivos (ácido, antiinflamatórios não-esteróides, álcool, fumo, estresse) e fatores defensivos (secreção de bicarbonato, muco, prostaglandinas) (PARFITT, 1999; WANNMACHER, 2004).

Sabe-se que o microrganismo Gram-negativo *Helicobacter pylori* tem um papel importante no desenvolvimento de gastrites e úlceras gástricas e duodenais, estando presente em cerca de 95% dos pacientes com úlcera duodenal (CARAS e PEURA, 1999; BARTH e HAHNE, 2002). Seu efeito patogênico é atribuído a vários mecanismos (VASCONCELLOS, 1998):

- produção de citotoxinas e agentes pró-inflamatórios;
- produção de amônia por desdobramento da uréia pela urease bacteriana criando um ambiente propício para o seu desenvolvimento;
- alteração do comportamento da secreção decorrente da hipergastrinemia e hiperpepsinogenemia produzidas pela bactéria.

O tratamento da úlcera péptica visa neutralizar ou inibir a atividade ácida, utilizando fármacos antiácidos, anti-secretores (antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> de histamina e inibidores da bomba de prótons) e protetores da mucosa, além de exigir modificações no estilo de vida e na alimentação (VASCONCELLOS, 1998; PARFITT, 1999).

---

---

No caso de pacientes *H. pylori*-positivos, a erradicação do microrganismo é essencial e diminui consideravelmente a possibilidade de recidivas. Para tanto, o regime terapêutico mais preconizado é a combinação de inibidores da bomba de prótons e antimicrobianos, que pode alcançar até 100% de erradicação (STACK *et al.*, 1998; COELHO *et al.*, 2000; HORN, 2000; ROBINSON, 2004).

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma doença crônica relacionada ao refluxo do conteúdo gástrico para o esôfago, tendo a pirose ou “azia” como manifestação clínica mais freqüente (RODRIGUEZ *et al.*, 1999; MORAES-FILHO *et al.*, 2002).

No seu tratamento, também se destacam os inibidores da bomba de prótons, que promovem cicatrização das lesões e alívio dos sintomas (EDWARDS *et al.*, 2001).

Para as doenças relacionadas ao ácido gástrico, existe uma correlação entre o tempo de exposição da mucosa ao ácido e os sintomas. Quanto mais tempo o fármaco anti-secretório mantiver o pH intragástrico acima de 3,0 ou 4,0, após a administração, melhor será o alívio dos sintomas e mais rápida a cicatrização das lesões (ROBINSON, 2004).

Nos últimos onze anos, na Escócia, houve um aumento no número de internações hospitalares de pacientes com úlcera gástrica hemorrágica, em idade acima de 74 anos (KANG *et al.*, 2006). Segundo o estudo, o fato se deve, principalmente, ao uso contínuo de ácido acetilsalicílico de baixa dose e de anticoagulantes orais neste grupo.

### **3.2 Inibidores da bomba de prótons**

Desde o lançamento, nos anos 80, os inibidores da bomba de prótons têm demonstrado uma alta potência na supressão do ácido gástrico e uma superior eficácia no tratamento das doenças relacionadas a este, quando comparado a outros tipos de terapia (WALSH, 1999).

---

---

Atualmente, no mercado, existem cinco representantes desta classe: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol, o isômero S do omeprazol (Figura 3.1) (KOROLKOVAS, 2006).

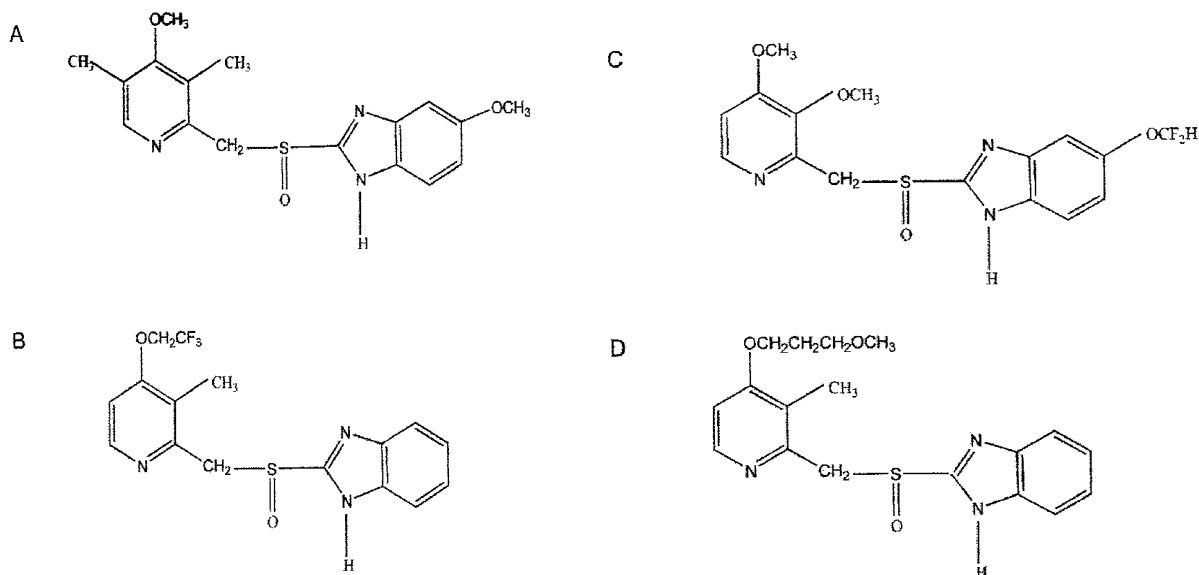


Figura 3.1 – Estruturas dos inibidores da bomba de prótons. Omeprazol (A), Lansoprazol (B), Pantoprazol (C) e Rabeprazol (D).

Um novo inibidor, chamado tenatoprazol, está em fase de desenvolvimento. Ele se caracteriza por possuir um anel imidazopiridínico no lugar do anel benzimidazólico (Figura 3.2), o que aumentaria seu tempo de permanência no organismo, sendo importante, principalmente, para o controle da acidez durante a noite (SHIN *et al.*, 2006).

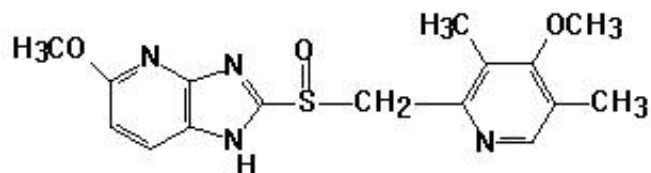


Figura 3.2 – Estrutura do novo inibidor da bomba de prótons tenatoprazol.

---

---

As formas farmacêuticas disponíveis para esta classe são cápsulas contendo *pellets* gastrorresistentes (omeprazol, lansoprazol, esomeprazol), comprimidos revestidos (pantoprazol e rabeprazol) e, mais recentemente, formas alternativas têm sido desenvolvidas para grupos especiais, como lansoprazol pó para suspensão oral e solução injetável (HORN e HOWDEN, 2005).

Estas estruturas contêm um átomo de enxofre assimétrico, no grupamento sulfóxido, originando dois enantiômeros (R e S). Todos são comercializados na forma de mistura racêmica, com exceção de omeprazol, que apresenta seu isômero S disponível comercialmente (esomeprazol - Nexium®).

As vantagens sobre os antagonistas de receptores H<sub>2</sub> de histamina estão relacionadas à maior e mais rápida taxa de cicatrização de lesões e à capacidade de tratar pacientes nos quais a terapia com estes antagonistas não foi efetiva (TOLMAN, 2000).

Além da atividade anti-secretora, os inibidores da bomba de prótons demonstram uma importante atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro*, tendo um efeito sinérgico com antibióticos. O mecanismo para o efeito inibidor do crescimento ainda não é totalmente claro, mas pode ser devido à inibição da enzima urease bacteriana, um importante fator de proteção contra o meio ácido, ou à ligação à enzima H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase da bactéria, a qual auxilia na manutenção do gradiente transmembrana (RICHARDSON *et al.*, 1998; HORN, 2000).

Os fármacos desta classe são considerados muito eficazes e relativamente equivalentes durante o tratamento. Entretanto, são observadas diferenças que podem representar vantagens ou benefícios em determinadas situações clínicas. Estas diferenças estão relacionadas ao início da ação, à manutenção do pH intragástrico elevado e ao metabolismo, o qual pode estar correlacionado com as interações medicamentosas (ROBINSON, 2004).

### **3.3 Mecanismo de ação**

Os inibidores da bomba de prótons são benzimidazóis substituídos, com caráter de bases fracas, que cruzam a membrana da célula parietal como pró-

---

---

fármacos, entrando em seus canalículos, onde o pH é bastante ácido. Neste pH, ocorre a protonação do nitrogênio piridínico que resulta na formação da sulfenamida tetracíclica, forma ativa do fármaco (Figura 3.3). A forma sulfenamida liga-se, então, a resíduos extracitoplasmáticos de cisteína na subunidade alfa da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, inibindo sua atividade e, assim, a secreção ácida (WILLIAMS e POUNDER, 1999).

De acordo com o mecanismo de ação, os anéis piridina e benzimidazol, bem como a cadeia -CH<sub>2</sub>-SO- são essenciais para a atividade dos inibidores da bomba de prótons. Os substituintes em ambos os anéis são importantes para determinar a velocidade de conversão à forma ativa e diminuir a toxicidade (PEDREGAL e AVEDAÑO, 1993, HUBER *et al.*, 1995).

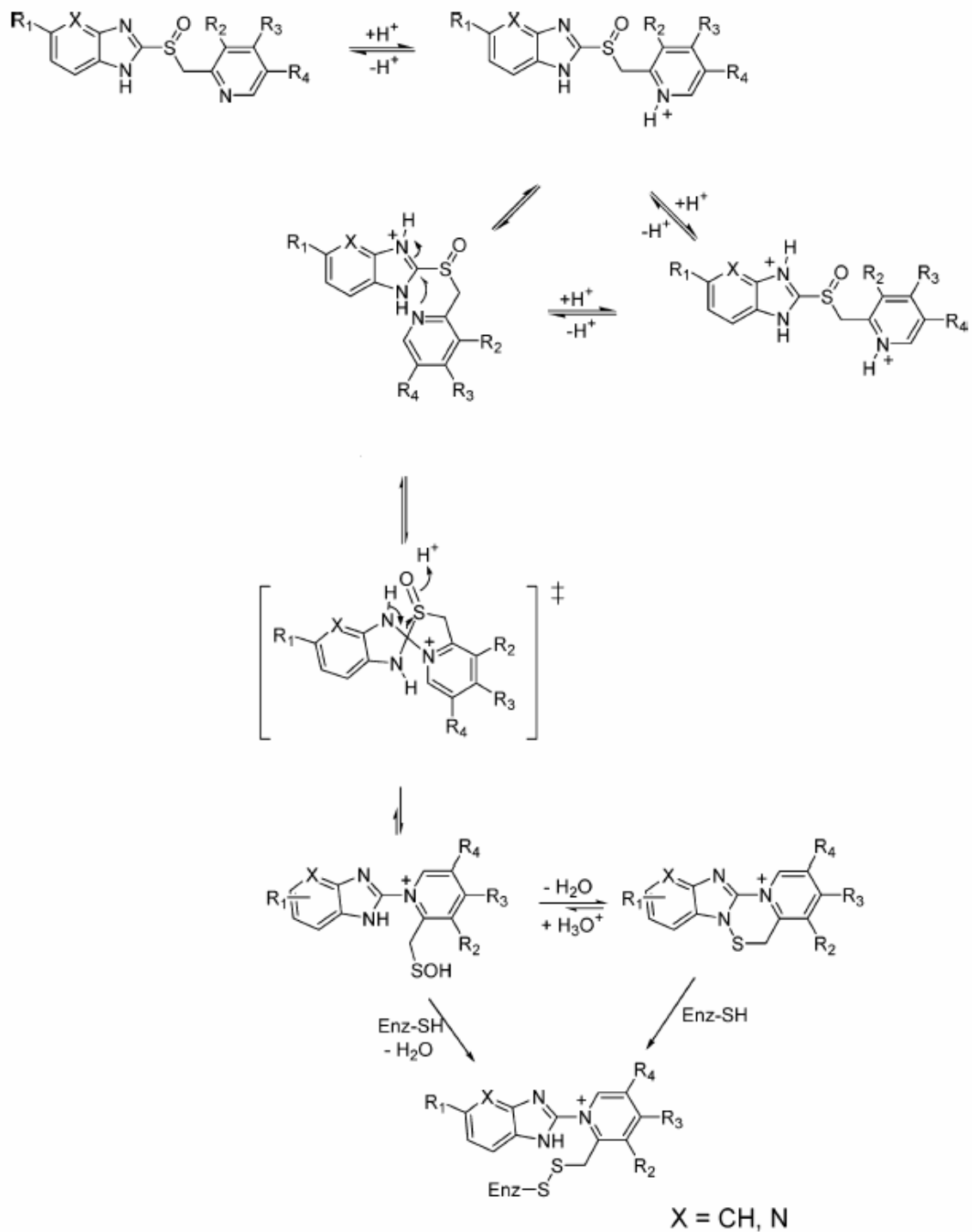


Figura 3.3 – Mecanismo de ação dos inibidores da bomba de prótons. Fonte: SHIN *et al.*, 2004.

### 3.4 Rabeprazol

O rabeprazol é um inibidor rápido e potente da enzima  $H^+/K^+$ -ATPase na célula parietal gástrica, que provoca uma duradoura inibição da secreção ácida,

---

sendo útil para o tratamento de doença do refluxo gastroesofágico, úlceras e síndromes hipersecretórias, como Zollinger-Ellison (CARSWELL e GOA, 2001).

O fármaco encontra-se disponível no Brasil com o nome comercial Pariet<sup>®</sup> (Janssen-Cilag), na forma de comprimidos revestidos contendo 10 e 20 mg.

O rabeprazol difere de seus análogos porque se converte mais rapidamente à forma sulfenamida, resultando em uma rápida inibição da enzima. Isto se deve ao valor de  $pK_a$  do nitrogênio do seu anel piridínico ( $pK_a = 5$ ), enquanto que o dos demais apresentam valor em torno de 4 (HORN, 2000; STEDMAN e BARCLAY, 2000).

Um estudo, realizado por JI e colaboradores (2006), comparou a eficácia de rabeprazol, na dose de 10 mg, com omeprazol, 20 mg, para a cicatrização de úlceras pépticas. Os resultados demonstraram que os fármacos, nestas doses, eram equivalentemente eficazes. Na manutenção do pH intragástrico, rabeprazol demonstrou ser superior aos demais análogos, mantendo o pH acima de 4,0 por mais tempo, já no primeiro dia de tratamento (ROBINSON, 2004).

Em relação à atividade anti-*Helicobacter pylori*, rabeprazol mostrou ser 10 vezes mais potente que omeprazol e lansoprazol na inibição da enzima urease bacteriana. Este efeito provavelmente é devido à formação de pontes dissulfeto no sítio ativo da enzima (TSUCHIYA *et al.*, 1995; BARTH e HAHNE, 2002). Além disso, rabeprazol e seu metabólito tioéter possuem marcada atividade inibidora sobre a motilidade de *H. pylori*, a qual é importante para colonização da mucosa gástrica (TSUTSUI *et al.*, 2000).

Devido à sua forte atividade anti-*Helicobacter pylori*, o rabeprazol tornou-se uma alternativa para combinação com antibacterianos em tratamentos de erradicação. Além disso, sua rápida conversão à forma ativa faz com que o pH intragástrico aumente rapidamente, o que protegeria os antibióticos utilizados em associação de uma possível degradação (HORN, 2004). Um tratamento de erradicação tradicional consiste na utilização de rabeprazol associado à claritomicina e amoxicilina, por 7 dias, atingindo taxas de erradicação de 77% (BYTZER e O'MORAIN, 2005). Entretanto, o desenvolvimento de resistência por parte do microrganismo à claritomicina gerou o estudo com vários antimicrobianos, onde se

---

---

destacaram as fluorquinolonas, especialmente, o gatifloxacino (SHARARA *et al.*, 2006).

Além da atividade anti- *Helicobacter pylori*, rabeprazol sódico demonstrou ser efetivo contra algumas linhagens de *Plasmodium falciparum*, da mesma forma que lansoprazol, através de mecanismo ainda não elucidado (RIEL *et al.*, 2002).

### 3.5 Características farmacocinéticas

A molécula de rabeprazol é sensível a ácidos, sendo então administrada na forma de comprimidos com revestimento gastrorresistente. Sua biodisponibilidade é de 52% e a taxa de ligação a proteínas plasmáticas de 96% (CARSWELL e GOA, 2001; USP DI, 2001; HORN e HOWDEN, 2005). A ingestão concomitante de alimentos ou de antiácidos não afeta a biodisponibilidade de rabeprazol (JANSSEN-CILAG, 1999).

Este fármaco, assim como os demais inibidores da bomba de prótons, são metabolizados pelo sistema do citocromo P450 (CYP2C19). Entretanto, para o rabeprazol, uma via não enzimática, através da redução do grupamento sulfóxido e formação de um composto tioéter, tem um papel predominante. Sendo assim, o potencial de interações medicamentosas, mediadas pelo citocromo P450, é menor (ROBINSON, 2004).

A eliminação é renal e fecal, sendo aproximadamente 90% da dose excretada através da urina como metabólitos. O tempo de meia-vida plasmática é de 1 hora (JANSSEN-CILAG, 1999; USP DI, 2001).

### 3.6 Síntese

Uma das rotas sintéticas disponíveis para a obtenção de rabeprazol está representada na Figura 3.4. A mesma baseia-se na condensação no anel piridínico (9), contendo os substituintes, com o 2-mercapto-1H-benzimidazol (10), em presença de hidróxido de sódio, e posterior oxidação do enxofre utilizando o reagente ácido *m*-cloroperoxibenzóico (mCPBA) (PINGILI *et al.*, 2005).

---



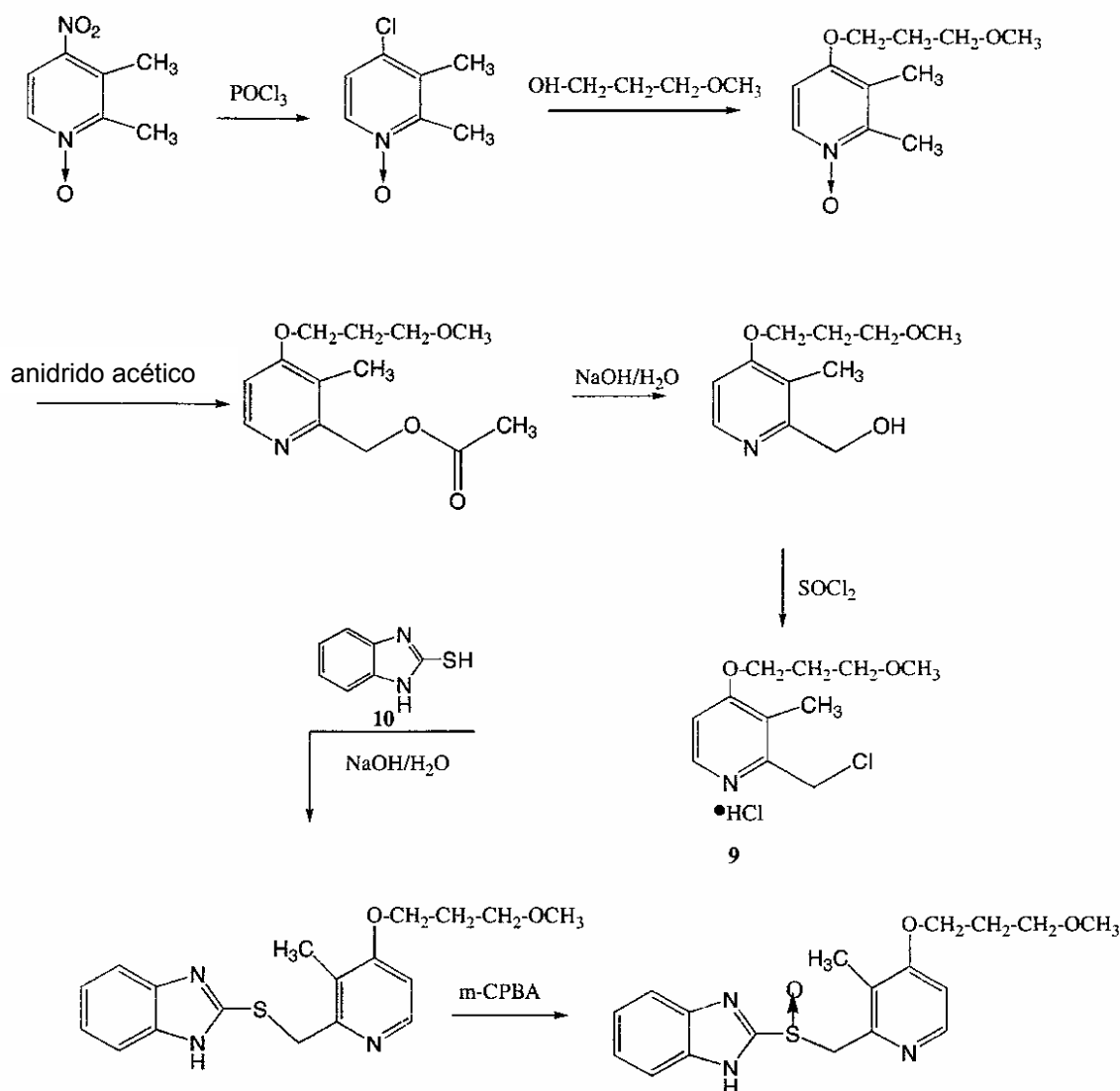


Figura 3.4 – Representação esquemática da síntese de rabeprazol. Fonte: PINGILI *et al.*, 2005.

Uma síntese microbiana foi proposta por YOSHIDA e colaboradores (2001), utilizando o microrganismo *Cunninghamella echinulata* MK40 para a oxidação do enxofre da molécula. As vantagens desta técnica seriam a não utilização de solventes orgânicos, prejudiciais ao meio ambiente, e do ácido *m*-cloroperoxibenzóico, o qual é explosivo. Além disso, neste processo não há a formação da forma sulfona, um produto indesejável, ao contrário da síntese química.

---

Os resultados revelaram que houve exclusivamente a formação do isômero S de rabeprazol. As enzimas envolvidas na reação não foram elucidadas.

### 3.7 Descrição (THE MERCK INDEX, 2001; MOFFAT, 2004)

Rabeprazol sódico apresenta-se como um sólido branco a levemente amarelo, com faixa de fusão entre 140-141 °C, com decomposição.

- **Nome químico:** 2-[[4-(3-metoxipropoxi)-3-metilpiridina-2-il]metilsulfinil]-1H-benzimidazol sódico
- **Sigla:** E-3810
- **Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S
- **Massa molecular:** 381,43
- **Composição elementar:** C 60,15%; H 5,89%; N 11,69%; O 13,35%; S 8,92%
- **Número no Chemical Abstracts:** 117976-90-6
- **Solubilidade:** muito solúvel em água e metanol, facilmente solúvel em etanol, clorofórmio e acetato de etila e insolúvel em éter e hexano.

### 3.8 Análise quantitativa

Os trabalhos presentes na literatura, relativos à determinação de rabeprazol sódico em plasma, descrevem, em geral, métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção na região do ultravioleta (NAKAI *et al.*, 1994; TAKAKUWA *et al.*, 1995; MANO *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 2004; UNO *et al.*, 2005; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005) e detecção por espectrometria de massas (ZHANG *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos demonstram a separação dos enantiômeros de rabeprazol e outros benzimidazóis, em plasma e forma farmacêutica, utilizando fluido supercrítico (NOZAL *et al.*, 2004; TORÍBIO *et al.*, 2005), extração em fase sólida (MIURA *et al.*, 2006) e coluna quiral (RAO *et al.*, 2006).

---

---

TIVESTEN e colaboradores (1999) realizaram um estudo de triagem, aplicando a eletroforese capilar em meio não-aquoso para a determinação da pureza de alguns benzimidazóis, entre eles, o rabeprazol sódico. Foram obtidas separações rápidas e eficientes.

EL-GINDY e colaboradores (2003) publicaram um trabalho que relata a determinação de rabeprazol sódico, na forma farmacêutica, em presença de produtos de degradação. Os métodos utilizados foram a cromatografia líquida de alta eficiência, a espectrofotometria derivada de razão do espectro e a cromatografia em camada delgada de alta eficiência. Os mesmos demonstraram ser equivalentes ao método cromatográfico descrito na literatura para plasma humano (NAKAI *et al.*, 1994).

A quantificação de rabeprazol em comprimidos, através de método voltamétrico, foi descrita por RADI e colaboradores (2004) e demonstrou ser um método simples e de baixo custo.

A identificação e a síntese de potenciais impurezas, provenientes do processo de preparação industrial de rabeprazol sódico, foram realizadas por PINGILI e colaboradores (2005). Através das técnicas de espectrometria de massas, espectrofotometria no infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, as impurezas foram identificadas como o análogo clorado de rabeprazol e o análogo metoxilado de rabeprazol. REDDY e colaboradores (2007) também realizaram a identificação e caracterização de seis impurezas da síntese de rabeprazol através das mesmas técnicas citadas acima.

Não foram encontrados trabalhos relatando o teste de dissolução para os comprimidos revestidos contendo rabeprazol.

O rabeprazol sódico não está descrito em nenhum código oficial, até o presente momento.

---

---

### 3.9 Estudos de estabilidade

O trabalho de EL-GINDY e colaboradores (2003), citado anteriormente, é único, até então, no que se refere a dados de estabilidade de rabeprazol. Os autores relatam o estudo de estabilidade do fármaco em meio ácido (HCl 0,1 M), em presença de agente oxidante (peróxido de hidrogênio 33,3%) e frente à luz (lâmpada de tungstênio 40 W). Além disso, foi realizado o estudo da cinética de degradação frente a estes fatores e a diferentes temperaturas. Para todos os fatores estudados, são encontrados dois produtos de degradação e uma cinética de pseudo-primeira ordem. Os tempos de exposição a cada agente não foram citados. Cabe salientar que não foi realizada a identificação dos produtos de degradação encontrados pelos pesquisadores.

Em relação à estabilidade dos outros inibidores da bomba de prótons, foram encontrados trabalhos sobre a degradação de omeprazol e lansoprazol em meio ácido (MATHEW *et al.*, 1995; RADI, 2002; QAISI *et al.*, 2006), nos quais é relatada a grande instabilidade dos fármacos em valores baixos de pH e a formação da sulfenamida como principal produto de degradação, além de um dímero.

---

---

**4. CAPÍTULO I**

---

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

---

---

---

---

---

---

**4.1 INTRODUÇÃO**

---

---

---

---



---

Para o controle adequado da qualidade de medicamentos, é imprescindível o uso de métodos analíticos bastante sensíveis que permitam, desta forma, a determinação de quantidades mínimas de substância ativa e produtos de degradação. A escolha do método depende de vários fatores, tais como natureza do fármaco, pureza e quantidade de amostra, bem como a finalidade da análise, seja qualitativa, quantitativa ou semiquantitativa (AVEDAÑO, 1993).

A fim de assegurar a credibilidade do método deve-se validá-lo. A validação de um procedimento analítico tem como objetivo demonstrar que este é adequado para a aplicação pretendida (ICH, 2005). É um processo pelo qual se estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem às exigências para a sua aplicação (USP 29, 2006).

A validação deve ser considerada como parte de um conceito integrado que visa garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001).

Os parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação dos métodos de análise incluem a especificidade, a linearidade, a precisão, a exatidão, os limites de detecção e quantificação e a robustez (ICH, 2005, USP 29, 2006, BRASIL, 2003). Tanto a *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005), quanto a United States Pharmacopoeia (USP 29, 2006) reconhecem que não existe a necessidade da avaliação de todos os parâmetros. É de responsabilidade do analista identificar os parâmetros que devem ser avaliados para determinado método (ERMER, 2001). O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados (SWARTZ; KRULL, 1998).

A descrição dos parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método, segundo o ICH (2005), USP 29 (2006) e a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003), está relacionada abaixo:

- **Linearidade:** corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. Recomenda-se que sua determinação seja realizada através de um mínimo de cinco concentrações. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados. Além disso,
-

---

deve-se apresentar as curvas obtidas, o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta;

- **Precisão:** representa o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. A precisão pode ser medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios. A precisão intermediária expressa a variação laboratorial, com o mesmo procedimento realizado em dias diferentes, equipamentos ou analistas diferentes. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR);
  - **Exatidão:** representa o grau de proximidade entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Pode ser determinada através do teste de recuperação, em que quantidades conhecidas de substância química de referência são adicionadas à amostra, e então recuperadas. Neste caso, é expressa como percentagem de recuperação.
  - **Especificidade:** representa a capacidade de um método de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com sua determinação, tais como excipientes, impurezas e produtos de degradação.
  - **Robustez:** capacidade do método de não ser afetado por pequenas modificações nas condições analíticas. Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por exemplo, pode-se avaliar a influência de alterações na temperatura de análise e na proporção de componentes ou fluxo de fase móvel;
  - **Limite de detecção:** representa a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais especificadas;
-

- 
- **Limite de quantificação:** representa a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais especificadas;

A validação de um método não significa que ele esteja livre de erros, mas apenas confirma que ele é adequado para seu propósito (MEHTA, 1997).

Os métodos analíticos são divididos em quatro categorias, contemplando os testes quantitativos para determinação do fármaco em produto farmacêutico ou matéria-prima (categoria I), testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e de produtos de degradação em produto farmacêutico e matéria-prima (categoria II), testes de desempenho (categoria III) e testes de identificação (categoria IV) (USP 29, 2006; BRASIL, 2003).

O teste de dissolução é considerado um teste de desempenho (USP 29, 2006; BRASIL, 2003), sendo importante para sua validação a avaliação dos parâmetros precisão, exatidão, especificidade e linearidade, respeitando as características de cada caso. Os resultados obtidos a partir deste auxiliam no desenvolvimento e avaliação de novas formulações, possibilitam possível correlação *in vivo* – *in vitro* e fazem parte da documentação para registro de novos produtos junto às autoridades regulatórias (MARQUES e BROWN, 2002).

Para desenvolver um teste de dissolução, vários fatores devem ser avaliados, como a solubilidade, a permeabilidade e as características farmacocinéticas do fármaco, bem como as peculiaridades da formulação em estudo. O aparato (usualmente pás ou cestas), o meio de dissolução, o qual deve garantir a estabilidade do fármaco e sua solubilização, e a velocidade de agitação devem ser cuidadosamente determinados. O pH do meio e o volume utilizado também devem ser observados (FDA, 1997). Além disso, é necessário que o método de quantificação a ser aplicado no teste esteja validado. A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade propostos (MARCOLONGO, 2003).

---

---

A partir dos dados de solubilidade e permeabilidade dos fármacos, foi introduzido por AMIDON e colaboradores (1995) o Sistema de Classificação Biofarmacêutico, o qual classifica as substâncias em quatro categorias: Classe I – alta solubilidade, alta permeabilidade; Classe II – baixa solubilidade, alta permeabilidade; Classe III – alta solubilidade, baixa permeabilidade e Classe IV – baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Utilizando essa classificação, pode-se determinar as expectativas com relação às correlações *in vitro-in vivo*, bem como as especificações a serem avaliadas no teste de dissolução.

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram validados para a determinação quantitativa de rabeprazol sódico, em comprimidos revestidos, sendo eles: a espectrofotometria ultravioleta, a espectrofotometria ultravioleta derivada, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. Além disso, será apresentada a caracterização da substância química de referência, a identificação das amostras e o desenvolvimento e validação do teste de dissolução dos comprimidos revestidos contendo rabeprazol sódico.

---

---

---

**4.2 PARTE EXPERIMENTAL**

---

---

---

---

---

A substância química de referência e os produtos farmacêuticos utilizados no presente estudo estão descritos a seguir:

### **Substância Química de Referência (SQR)**

A substância química de referência utilizada para o desenvolvimento do trabalho foi o rabeprazol sódico, teor de 99,3%, gentilmente cedido pela Indústria Janssen-Cilag Farmacêutica.

### **Produtos Farmacêuticos**

- Comprimidos revestidos, contendo 10 mg de rabeprazol sódico (equivalente a 9,42 mg de rabeprazol base), comercializados com o nome Pariet<sup>®</sup> (Janssen-Cilag), lote 02HS99H, adquiridos no mercado.

Excipientes: manitol, óxido de magnésio, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilcelulose substituída, estearato de magnésio, etilcelulose, ftalato de hipromelose, monoglicerídeo diacetilado, talco, dióxido de titânio, óxido de ferro vermelho e cera de carnaúba.

- Comprimidos revestidos, contendo 20 mg de rabeprazol sódico (equivalente a 18,85 mg de rabeprazol base), comercializados com o nome Pariet<sup>®</sup> (Janssen-Cilag), lote 04AS686, adquiridos no mercado.

Excipientes: manitol, óxido de magnésio, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilcelulose substituída, estearato de magnésio, etilcelulose, ftalato de hipromelose, monoglicerídeo diacetilado, talco, dióxido de titânio, óxido de ferro amarelo e cera de carnaúba.

---

---

#### 4.2.1 Caracterização da Substância Química de Referência (SQR)

Com o objetivo de caracterizar a substância utilizada como referência neste trabalho, realizaram-se análises espectroscópicas na região do infravermelho e de RMN de hidrogênio, de carbono e bidimensionais.

##### 4.2.1.1 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do infravermelho de rabeprazol sódico SQR foi obtido em espectrofotômetro FTIR SHIMADZU, modelo 8001, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (150 mg), contendo 1,5 mg de amostra.

##### 4.2.1.1.1 Resultados e Discussão

O espectro de absorção de rabeprazol sódico SQR na região do infravermelho está representado na Figura 4.1.

As atribuições das principais frequências, características à estrutura de rabeprazol sódico, estão apresentadas na Tabela 4.1 (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Tabela 4.1 - Principais frequências obtidas do espectro de infravermelho de rabeprazol sódico SQR

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2900	Deformação axial C-H de alcano
2840	Deformação axial O-CH <sub>3</sub> de éter
1570	Deformação axial C=C de anel aromático
1380	Deformação axial C-N (anel)
1080	Grupamento S=O
750	Benzeno <i>orto</i> -substituído

---



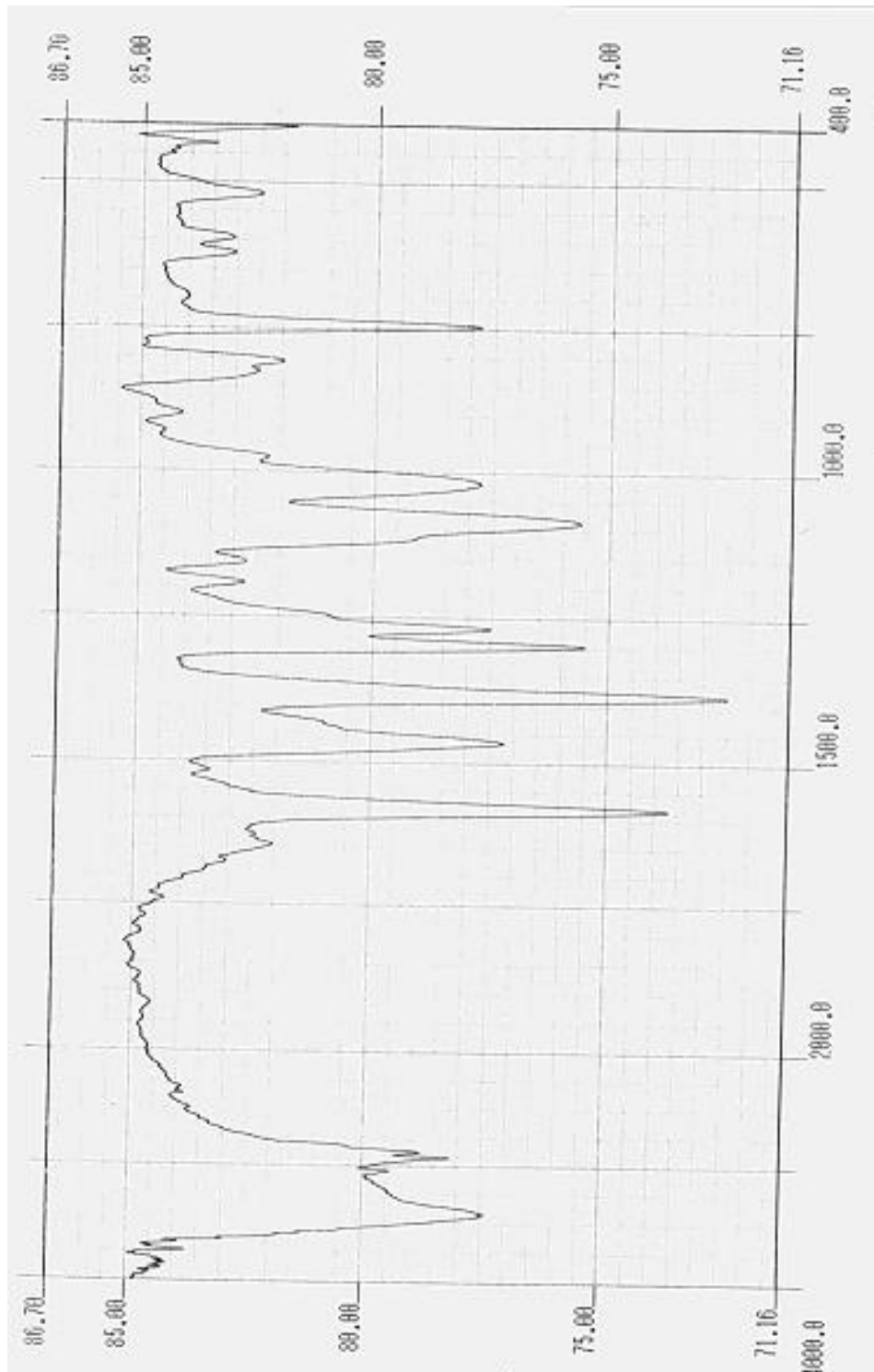


Figura 4.1 - Espectro na região do infravermelho de rabeprazol sódico SQR.

O espectro de infravermelho é único para cada substância, sendo pouco provável que duas substâncias que não sejam enantiômeros, apresentem o mesmo espectro nesta região. Uma análise das bandas características de determinados

---

grupos permite a identificação da estrutura de moléculas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Através da análise das bandas características e da comparação do espectro obtido com o apresentado por MOFFAT (2004), foi possível realizar a caracterização da substância de referência.

#### **4.2.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), e os espectros de correlação COSY (*correlation spectroscopy*), HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) e HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*), de rabeprazol sódico foram obtidos em espectrômetro Bruker TopSpin de 500 MHz, utilizando metanol deuterado (Aldrich) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As análises foram realizadas na *Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica – UMYMFOR – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires* (Argentina). Os programas WinNMR 1D/2D foram utilizados para processar os espectros.

##### **4.2.1.2.1 Resultados e Discussão**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  estão representados nas Figuras 4.2 e 4.3, respectivamente.

As atribuições dos hidrogênios e dos carbonos de rabeprazol sódico foram estabelecidas com base em dados tabelados disponíveis na bibliografia específica (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000 e PRETSCH *et al.*, 2000), bem como no trabalho de REDDY e colaboradores (2007), onde foram realizados os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de rabeprazol em DMSO deuterado.

---

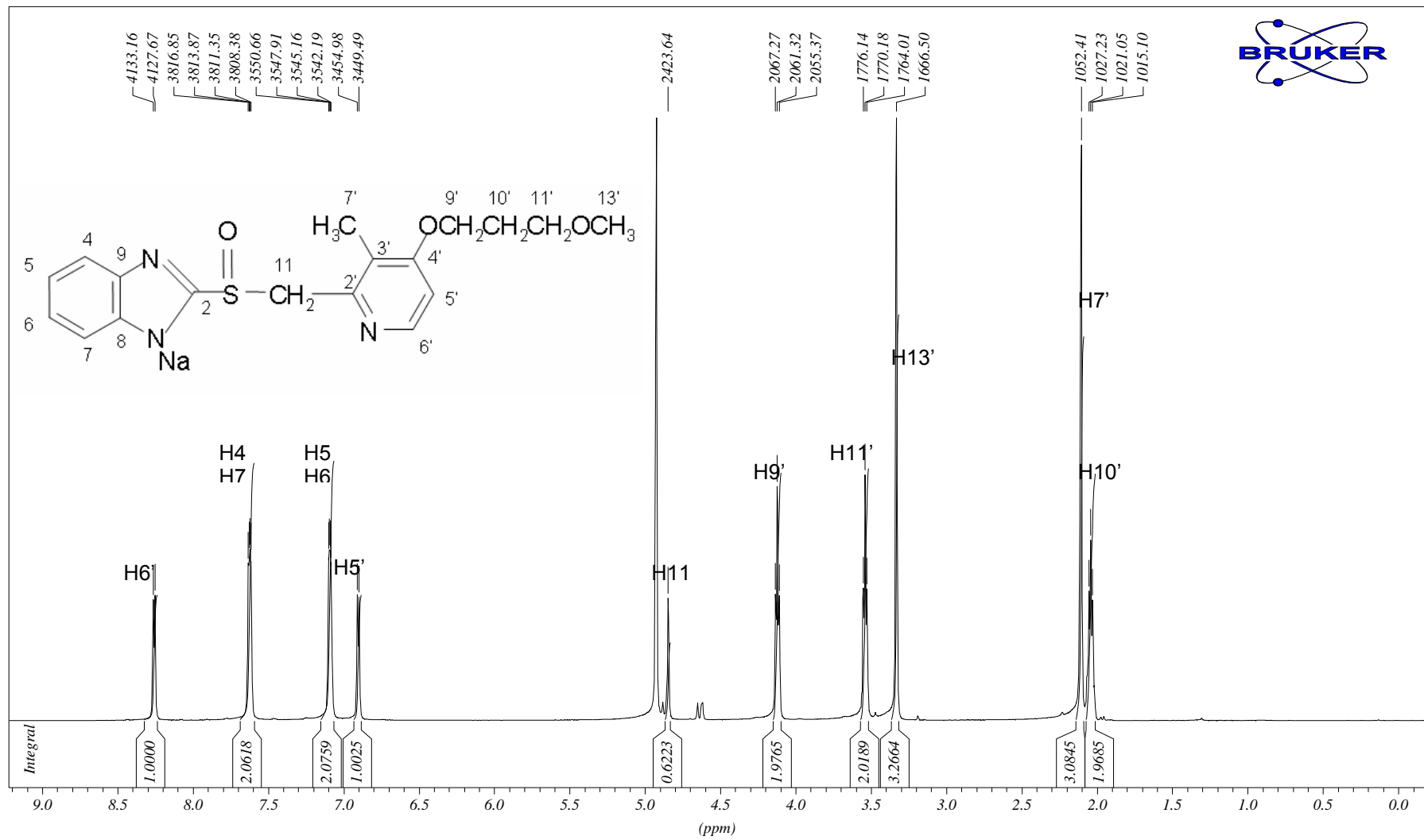


Figura 4.2 – Espectro de RMN de hidrogênio de rabeprazol sódico SQR, em metanol deuterado (500 MHz).

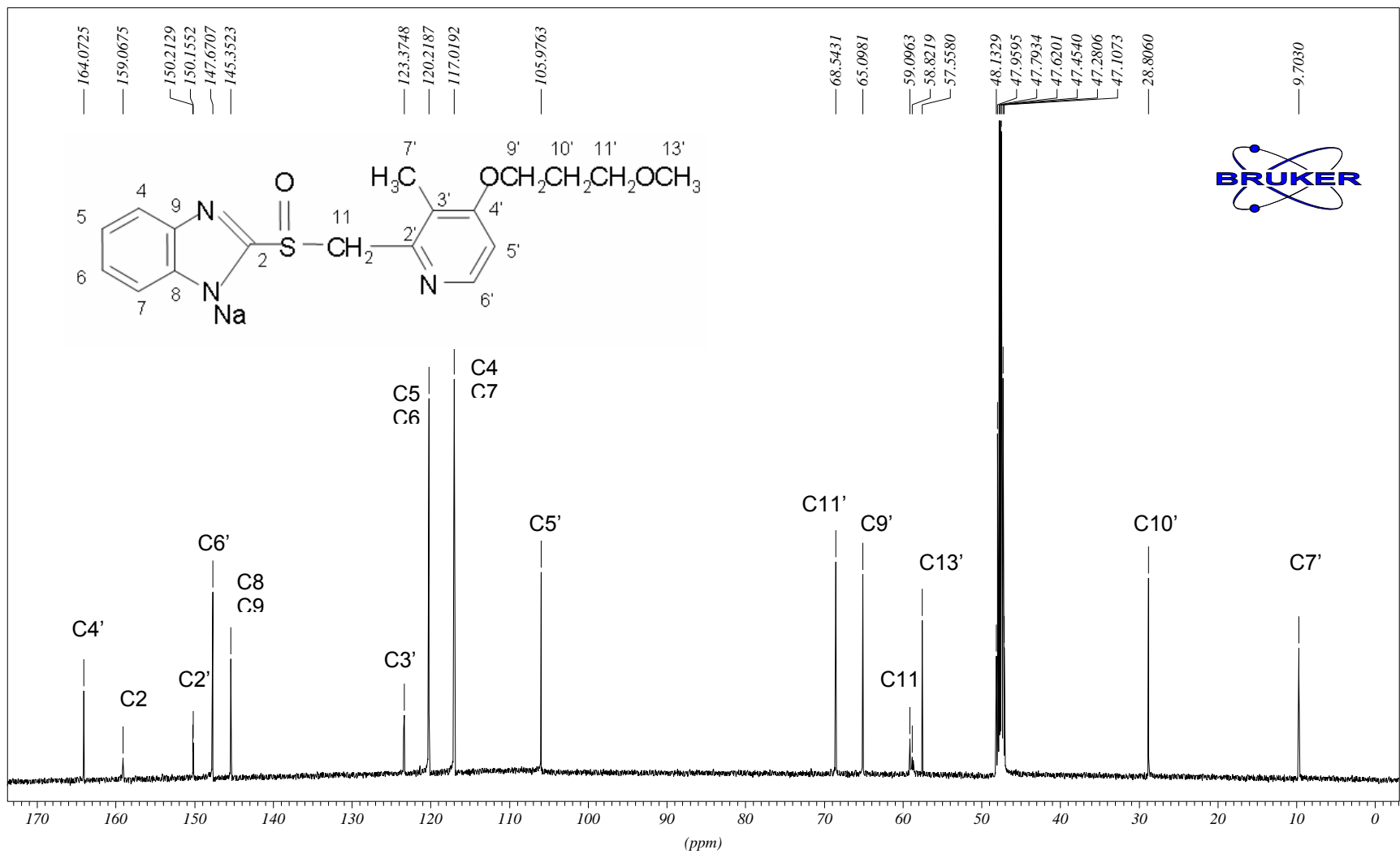


Figura 4.3 – Espectro de RMN de carbono 13 de rabeprazol sódico SQR, metanol deuterado (500 MHz).

---

No espectro de hidrogênio, é possível observar que os sinais entre 3,35 e 4,8 ppm referem-se aos hidrogênios alifáticos presentes em torno do anel piridínico, enquanto que acima de 7,0 ppm estão os aromáticos.

A mesma observação pode ser feita para o espectro de carbono 13, onde entre 57,55 e 68,54 ppm estão os carbonos unidos ao anel piridínico e acima de 105,97 ppm, os aromáticos e quaternários.

O espectro COSY de rabeprazol sódico está representado na Figura 4.4. Os sinais presentes indicam quais hidrogênios estão correlacionando entre si ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ).

O espectro HSQC de rabeprazol sódico está representado na Figura 4.5. Os sinais indicam a quais hidrogênios estão unidos cada carbono ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Assim, também é possível verificar quais carbonos são quaternários.

O espectro de HMBC de rabeprazol sódico está representado na Figura 4.6. Os sinais indicam com qual carbono um determinado hidrogênio está correlacionando a longa distância ( $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$ , a 2 ou 3 ligações).

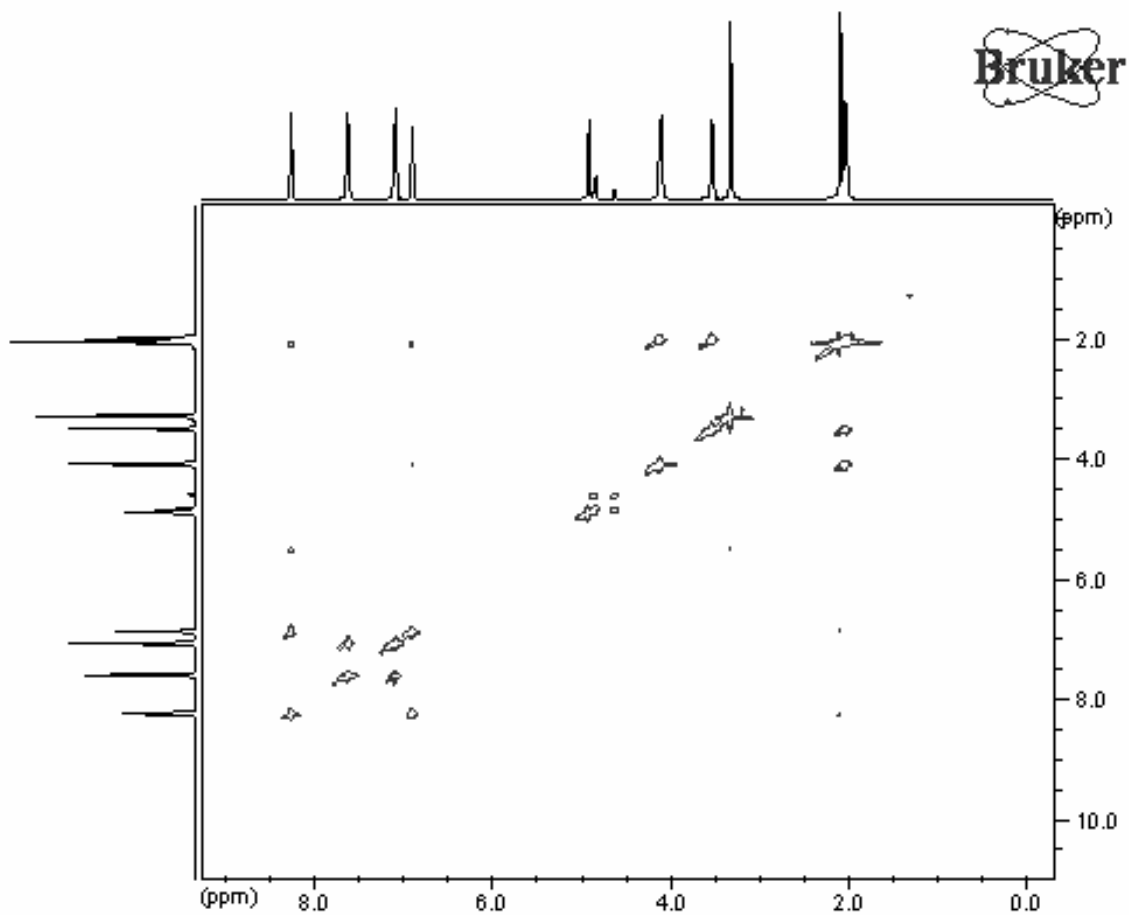


Figura 4.4 – Espectro COSY de rabeprazol sódico SQR em metanol deuterado (500 MHz).

Através do espectro COSY, é possível observar a correlação existente entre os hidrogênios do anel piridínico, além da correlação entre os hidrogênios da cadeia alifática.

---

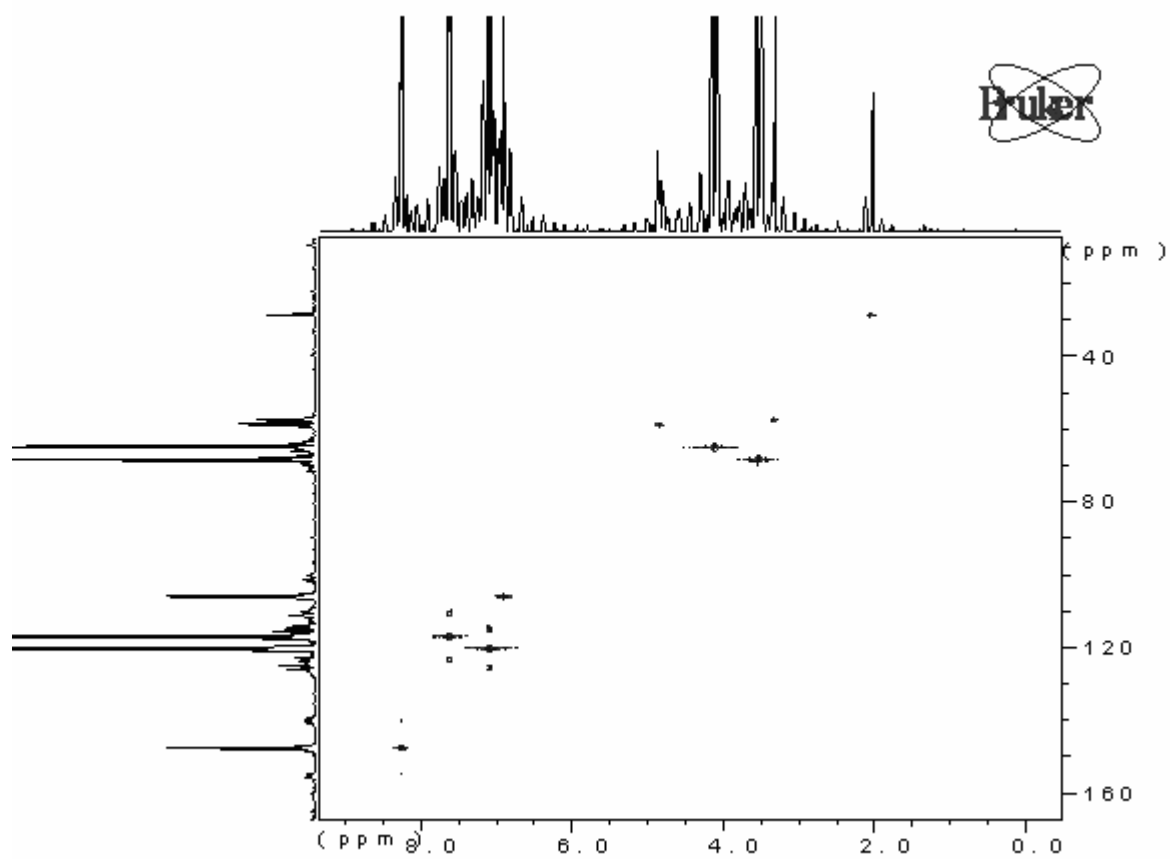


Figura 4.5 – Espectro HSQC de rabeprazol sódico SQR, em metanol deuterado (500MHz)

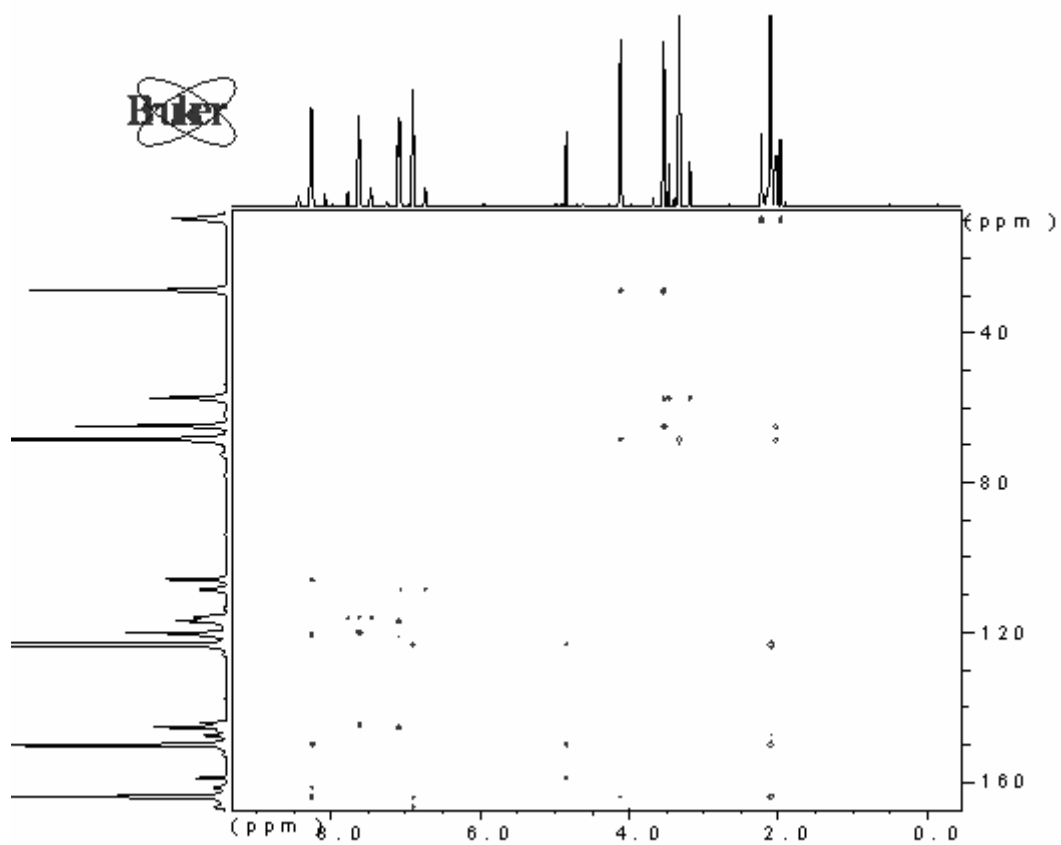


Figura 4.6 – Espectro HMBC de rabeprazol sódico SQR, em metanol deuterado (500 MHz).



A Tabela 4.2 descreve os dados obtidos a partir dos espectros de rabeprazol sódico SQR e as atribuições realizadas.

Tabela 4.2 - Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY e HMBC, em metanol-deuterado, de rabeprazol sódico SQR.

$^{13}\text{C}$ (ppm)/ atribuição*	HSQC (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)	COSY (ppm)	HMBC (ppm)
9,70 / C7'	2,11	s (3H)	-	C68,54/C123,37/C147,67
28,80 / C10'	2,05	m (2H) $J = 6,18/5,95$ Hz	H3,55/ H4,2	-
47-48	4,9	metanol-deuterado (solvente)		
57,55 / C13'	3,35	s (3H)	-	C68,54
59,09 / C11	4,8	s (2H)	-	C123,37/C150,15/C159,06
65,09 / C9'	4,2	t (2H) $J = 5,95/5,95$ Hz	H2,05	C28,80/C68,54/C164,07
68,54 / C11'	3,55	t (2H) $J = 5,96/6,17$ Hz	H2,05	C28,8/C57,55
105,97 / C5'	6,9	d (1H) $J = 5,49$ Hz	H8,25	-
117,01/ C4;7	7,6	dd (2H) $J = 2,98/8,47$ Hz	H7,1	-
120,21/ C5;6	7,1	dd (2H) $J = 2,75/5,5$ Hz	H7,6	-
123,37 / C3'	-	-	-	-
145,35 / C8;9	-	-	-	-
147,67 / C6'	8,25	d (1H) $J = 5,49$ Hz	H6,9	C105,97/C164,07
150,15 / C2'	-	-	-	-
159,06 / C2	-	-	-	-
164,07 / C4'	-	-	-	-

s = singleto; d = dubleto; dd = duplo dubleto; t = tripleto.

---

As atribuições realizadas possibilitaram caracterizar satisfatoriamente a SQR e serão importantes para a elucidação das estruturas de produtos de degradação, a serem isolados.

#### **4.2.2 Identificação da amostra no produto farmacêutico**

##### **4.2.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A amostra de rabeprazol sódico SQR foi preparada diretamente em metanol em concentração final de 1 mg/ml. A amostra de comprimido revestido foi preparada a partir do pó proveniente da trituração de 1 comprimido em gral e dissolvido em metanol, à mesma concentração. Essa solução foi colocada em banho de ultra-som por 20 minutos e filtrada em papel filtro antes das aplicações. A fim de avaliar a especificidade do método, uma amostra de omeprazol SQR (SIGMA) foi preparada no mesmo solvente na concentração de 500 µg/ml.

Para a composição do sistema eluente empregaram-se os solventes acetato de etila (MERCK) e metanol (MERCK), ambos de grau analítico, na proporção 90:10 (v/v), respectivamente.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas aluminizadas (MERCK) de gel-sílica 60 F<sub>254</sub> com 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada adsorvente. As soluções das amostras foram aplicadas através de tubos capilares, a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa e migraram até atingir 10 cm do ponto de aplicação. Os reveladores utilizados foram a lâmpada ultravioleta a 254 nm e vapor de iodo, obtido a partir do iodo grau analítico (SYNTH).

Foram determinados os fatores de retenção (R<sub>f</sub>) de cada amostra e o R<sub>x</sub> foi calculado.

---

---

#### 4.2.2.1.1 Resultados e Discussão

Os valores de Rf obtidos após a migração cromatográfica foram 0,48 para a substância de referência e para a amostra de produto farmacêutico de rabeprazol, e 0,57 para o omeprazol. O valor de Rx calculado foi de 0,84.

O perfil cromatográfico das amostras após revelação com luz ultravioleta a 254 nm e exposição a vapores de iodo pode ser visualizado na Figura 4.7.

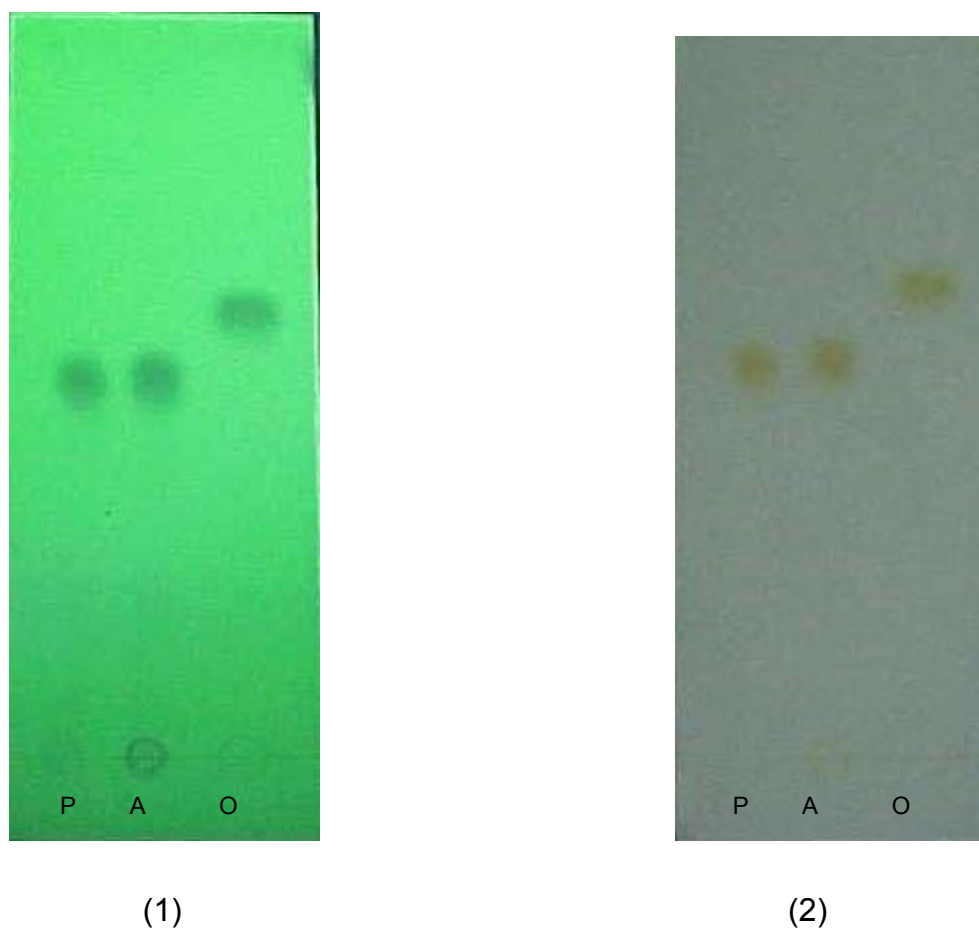


Figura 4.7 - Perfil cromatográfico das amostras rabeprazol sódico SQR (P) e produto farmacêutico (A), e omeprazol (O), após revelação com luz ultravioleta a 254 nm (1) e exposição a vapores de iodo (2).

---

---

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de fácil execução e compreensão, versátil e com baixo custo se comparada às demais técnicas analíticas empregadas na identificação de compostos. Este método permite identificar o fármaco através da comparação dos valores de Rf da amostra com o da substância de referência, obtidos sobre as mesmas condições. Além disso, permite a determinação de impurezas em matérias-primas e produtos farmacêuticos.

Para o desenvolvimento deste método, buscou-se na literatura trabalhos que aplicassem esta técnica para o rabeprazol sódico, bem como para outros inibidores da bomba de prótons. A pesquisa revelou trabalhos de cromatografia em camada delgada de alta eficiência, como o de EL-GINDY e colaboradores (2003), que aplica a técnica para a quantificação do fármaco na presença de produtos de degradação. O sistema eluente utilizado é composto por acetona, tolueno e metanol na proporção 9:9:0,6 (v/v). Também verificou-se os trabalhos de PANDYA e colaboradores (1997) para análise de lansoprazol em estudos de farmacocinética, utilizando a fase móvel clorofórmio, metanol (15:1, v/v), e de DOGRUKOL-AK e colaboradores (1998) para determinação de omeprazol em preparações farmacêuticas, utilizando o eluente clorofórmio, metanol, amônia 25% (97,5:2,5:1). Tendo em vista os elevados valores de Rf obtidos através destes sistemas (aproximadamente 0,80), novas composições foram testadas até o desenvolvimento do método proposto, o qual demonstrou ser adequado para a aplicação pretendida. A análise do fármaco de estrutura análoga omeprazol possibilitou demonstrar a especificidade do método, uma vez que os valores de Rf são diferentes para os fármacos analisados.

Os valores de Rf obtidos para as amostras sugerem que rabeprazol sódico SQR e produto farmacêutico possuem a mesma identidade.

#### **4.2.2.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta**

As soluções das amostras de rabeprazol sódico SQR e de comprimidos revestidos foram preparadas em três diferentes solventes: água, pH ajustado a 10,0 com hidróxido de amônio (GRUPO QUÍMICA), etanol (MERCK) e metanol (MERCK), sendo os últimos de grau analítico, na concentração de 12,0 µg/ml.

---

---

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS SHIMADZU, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura. As leituras foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm e os espectros sobrepostos.

#### 4.2.2.2.1 Resultados e Discussão

Os espectros de absorção na região do ultravioleta, referentes ao rabeprazol sódico SQR e comprimidos revestidos, preparados em água (pH = 10,0), metanol e etanol, na concentração de 12,0 µg/ml estão representados nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10, respectivamente.

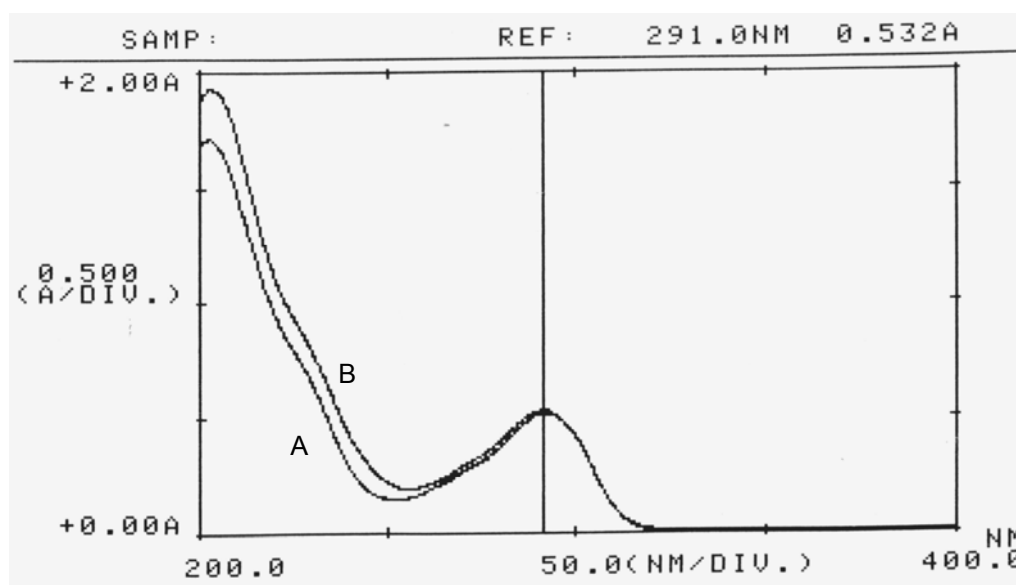


Figura 4.8 - Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR (A) e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos (B), em água (pH = 10,0), na concentração de 12 µg/ml.

---

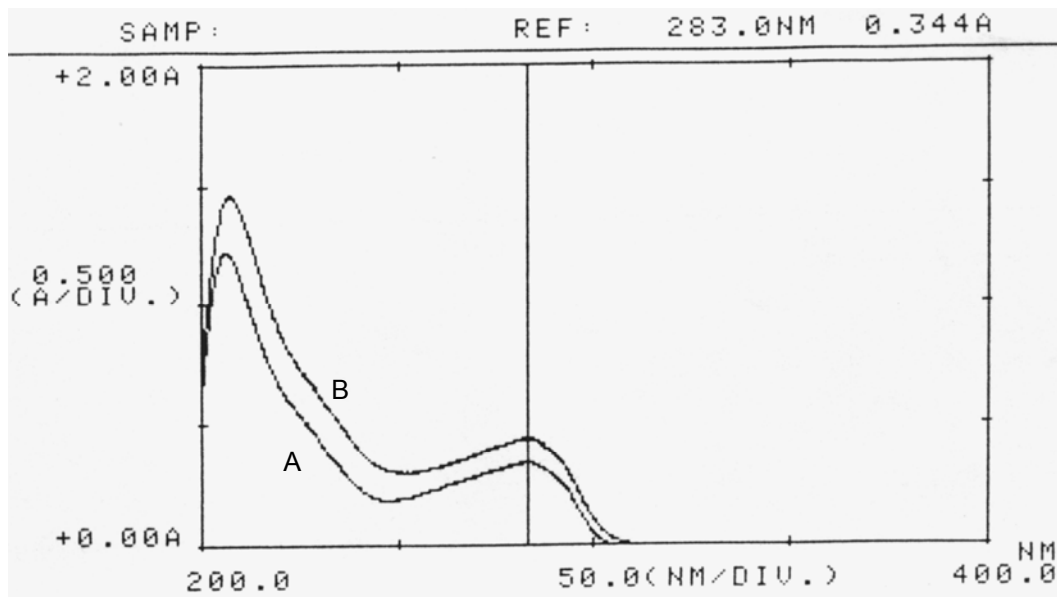


Figura 4.9 - Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR (A) e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos (B), em metanol, na concentração de 12 µg/ml.

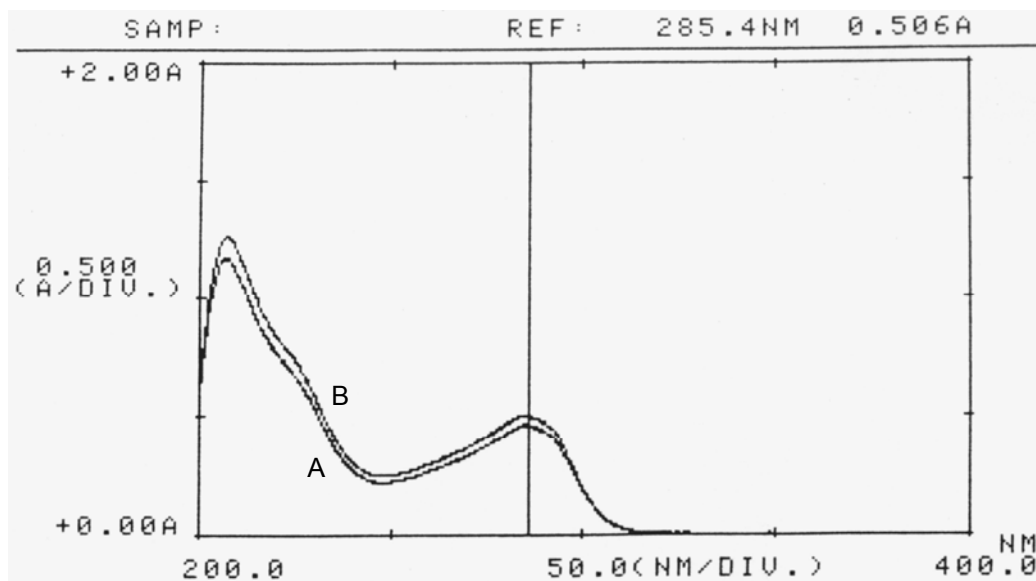


Figura 4.10 - Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR (A) e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos (B), em etanol, na concentração de 12 µg/ml.

A espectrofotometria na região do ultravioleta apresenta uma série de aplicações na análise farmacêutica, destacando-se a identificação e quantificação de

---

fármacos, a determinação do pKa, a determinação dos coeficientes de partição e solubilidade, e a determinação da liberação da substância ativa de uma formulação, como, por exemplo, no teste de dissolução (WATSON, 1999).

Os espectros obtidos na análise de rabeprazol sódico SQR e de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos demonstraram perfis similares nos solventes utilizados, sugerindo a mesma identidade das amostras. Os comprimentos de onda de máxima absorção foram diferentes para cada solvente. Em água, a absorção máxima ocorreu em 291,0 nm, enquanto em metanol ocorreu em 283,0 nm e em etanol, em 285,4 nm. Provavelmente, esta diferença é devida à ionização da molécula em água, ocorrendo um efeito batocrômico.

Estes resultados indicam que o método é útil para a identificação de rabeprazol sódico no produto farmacêutico.

#### **4.2.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A amostra de rabeprazol sódico SQR foi preparada em acetonitrila grau cromatográfico (MERCK), a uma concentração final de 40 µg/ml, enquanto a amostra de produto farmacêutico foi levada ao banho de ultra-som com pequena quantidade de água ultrapura (pH ajustado a 10,0 com hidróxido de amônio-GRUPO QUÍMICA), por 20 minutos, e completou-se o volume de 25 ml com acetonitrila, obtendo-se a mesma concentração da SQR. As duas amostras foram filtradas em membrana de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro (MFS), anteriormente à injeção.

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU, equipado com duas bombas de fluxo LC 10 AD VP, controlador SCL-10A VP, forno para coluna CTO – 10AC VP, auto injetor SIL-10AD VP e detector de arranjo de diodos SPD-M10A. O software utilizado foi o Class-VP versão 6.12. A coluna cromatográfica utilizada foi a Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm), endcapped (THERMO).

---

---

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de acetonitrila e água ultrapura na proporção 35:65 (v/v), respectivamente, e filtrada através de membrana de nylon. A desaeração foi realizada através de fluxo constante de gás hélio durante a análise.

As condições cromatográficas utilizadas na análise estão descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Fase móvel	Acetonitrila:água (35:65 v/v)
Coluna	Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm )
Fluxo	1,0 ml/min
Comprimento de onda	282 nm
Volume de injeção	20 µl
Temperatura de análise	30,0 °C
Diluyente das amostras	acetonitrila

---

A identificação da amostra comprimido revestido foi realizada através da comparação dos tempos de retenção da solução deste com a preparada com rabeprazol sódico SQR.

#### **4.2.2.3.1 Resultados e Discussão**

Os cromatogramas sobrepostos obtidos a partir da análise de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos podem ser visualizados na Figura 4.11.

---



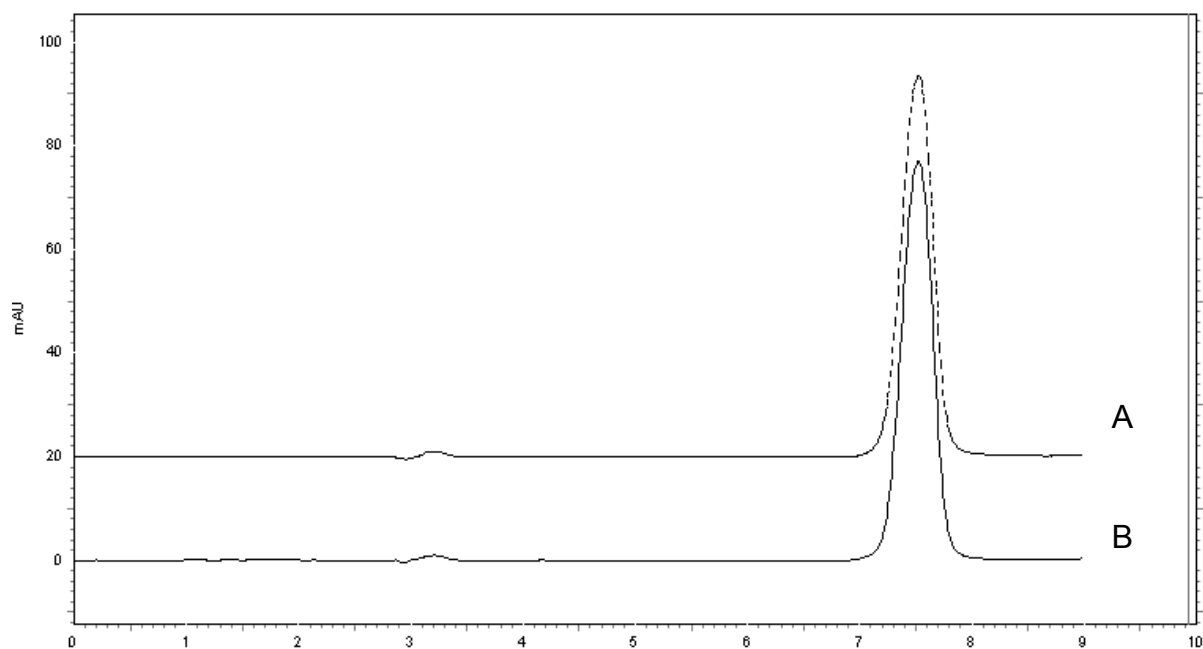


Figura 4.11 – Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de rabeprazol sódico SQR (A) e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos (B) preparados em acetonitrila, ambas à concentração de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30  $^{\circ}\text{C}$ .

A cromatografia líquida de alta eficiência surgiu, essencialmente, como uma técnica de separação, mas com os recursos que apresenta, passou a ocupar um lugar de destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa (COLLINS *et al.*, 1997).

O desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência iniciou-se com a escolha do sistema eluente mais adequado. Para tanto, foram analisados os trabalhos existentes sobre a determinação de rabeprazol sódico em fluidos biológicos (NAKAI *et al.*, 1994; TAKAKUWA *et al.*, 1995; MANO *et al.*, 1996), que utilizam sistemas de fase reversa, com fase móvel composta de tampão fosfato e acetonitrila ou perclorato de amônio e acetonitrila, em diferentes proporções.

A fim de desenvolver um método cromatográfico simples e adequado, foram testadas fases móveis compostas por água e acetonitrila, água e metanol e tampão fosfato e acetonitrila, em proporções variadas.

---

A fase móvel composta por água e acetonitrila, na proporção 65:35 (v/v) demonstrou ser adequada, resultando em um tempo de retenção de, aproximadamente, 7,5 minutos para o rabeprazol sódico. Além disso, os demais parâmetros cromatográficos foram satisfatórios, como: assimetria (0,98), pratos teóricos (3495,73) e fator capacidade (4,80).

A comparação dos tempos de retenção da solução de rabeprazol sódico SQR e de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos indica que as amostras possuem a mesma identidade.

#### **4.2.2.4 Eletroforese Capilar (EC)**

A amostra de rabeprazol sódico SQR foi preparada em água pH 10,0 (ajustado com hidróxido de amônio – GRUPO QUÍMICA), a uma concentração final de 20 µg/ml, enquanto a amostra de produto farmacêutico foi levada ao banho de ultra-som com pequena quantidade de água pH 10,0, por 20 minutos, e completou-se o volume de 20 ml com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração similar à da SQR. As duas amostras foram filtradas em membrana de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro (MFS), anteriormente à injeção.

Para o preparo do eletrólito foram empregados tampão borato de sódio decaidratado (MERCK) e água ultrapura (META III-FILTROSUL). Água ultrapura e solução de hidróxido de sódio 0,1 M foram utilizadas para ativação do capilar antes das análises.

O equipamento de eletroforese capilar utilizado foi o modelo HP<sup>3D</sup> (Hewlett-Packard), acoplado com detector de arranjo de diodos, injetor automático e controle de temperatura, instalado no Laboratório de Geoquímica Ambiental da Escola de Engenharia - UFRGS. O software HP Chemstation CE foi utilizado para controle do equipamento e aquisição dos dados. O capilar de sílica fundida, utilizado para as análises, possuía 48 cm de comprimento (AGILENT).

As condições analíticas utilizadas no método estão descritas na Tabela 4.4.

---

---

Tabela 4.4 – Condições analíticas utilizadas no desenvolvimento do método por eletroforese capilar.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Capilar	Sílica fundida, com 48 cm de comprimento total (39,5 cm efetivo), 75 $\mu$ m de diâmetro interno.
Eletrólito	Tampão tetraborato de sódio 10 mM
Tensão aplicada	20 kV em rampa
Injeção hidrodinâmica	50 mBar/5 s
Comprimento de onda	291 nm
Pré-condicionamento	1 min NaOH 0,1 M; 2 min H <sub>2</sub> O; 2,5 min eletrólito
Temperatura	25 $\pm$ 1 °C
Diluyente das amostras	água pH 10,0

---

A identificação da amostra comprimido revestido foi realizada através da comparação dos tempos de migração da amostra com aqueles da solução rabeprazol sódico SQR.

#### **4.2.2.4.1 Resultado e Discussão**

Os eletroferogramas sobrepostos de rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos podem ser visualizados na Figura 4.12.

---

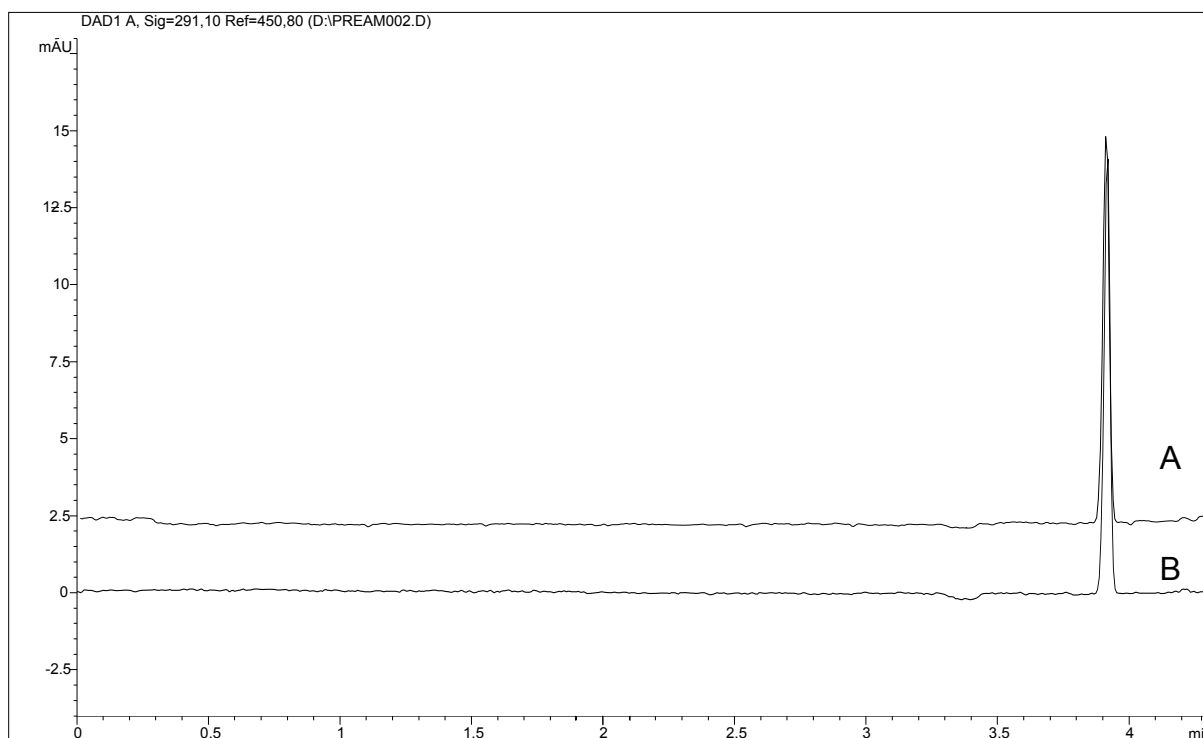


Figura 4.12 – Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de rabeprazol sódico SQR (A) e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos (B) preparados em água pH=10,0, ambas à concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 48 cm; tampão tetraborato de sódio 10 mM como eletrólito de corrida; tensão de 20kV em rampa; detecção UV a 291 nm; temperatura de análise 25 °C.

A eletroforese capilar é uma interessante alternativa na análise de produtos farmacêuticos devido a sua eficiência, flexibilidade, precisão e alta resolução. Além disso, utiliza volumes de amostra na ordem de nanolitros e baixo consumo de solventes (SANTORO *et al.*, 2000).

Para o desenvolvimento deste método, foram testadas duas concentrações de solução tampão borato de sódio: 10 e 15 mM. Ambas concentrações forneceram resultados satisfatórios quanto à simetria do pico, tempo de migração e estabilidade da linha de base. Entretanto, selecionou-se a concentração 10 mM, pois o uso de concentrações elevadas no eletrólito de corrida pode determinar, ocasionalmente, aquecimento do capilar enquanto que, concentrações menores, estabilizam o sistema eletroforético.

---

O tempo de migração obtido para as amostras foi de 3,9 minutos. O número de pratos teóricos foi de 115507 e a assimetria foi 1,1.

A comparação dos tempos de migração da solução de rabeprazol sódico SQR ( $t_m = 3,9$  min) e de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos ( $t_m = 3,9$  min) indica que as amostras possuem a mesma identidade.

### **4.2.3 Análise Quantitativa**

#### **4.2.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)**

As soluções de rabeprazol sódico SQR e de comprimidos revestidos foram preparadas utilizando como solvente a água, com pH ajustado a 10,0 com hidróxido de amônio (GRUPO QUÍMICA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo 160A, no comprimento de onda de 291 nm.

A fim de realizar a validação do método, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação.

##### **4.2.3.1.1 Avaliação da especificidade**

Para análise da especificidade, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e de placebo, em água (pH = 10,0), na concentração de 12  $\mu\text{g/ml}$ .

A mistura placebo era composta pelos excipientes descritos no item 3.1.2, nas seguintes quantidades: manitol 100,0 mg; óxido de magnésio 155,0 mg; hidroxipropilcelulose 56,25 mg; estearato de magnésio 10,0 mg; etilcelulose 11,05 mg; hidroxipropilmetilcelulose 75,30 mg; talco 73,80 mg; cera de carnaúba 15,05 mg; monoglicerídeo diacetilado 2,76 mg; dióxido de titânio 2,76 mg e óxido de ferro vermelho 0,03 mg. Estas quantidades, equivalentes a cinco comprimidos, foram determinadas de acordo com as especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000) e com base no peso médio dos comprimidos (110,4 mg).

---

---

Para o preparo da solução placebo, estas quantidades foram pesadas e transferidas para balão volumétrico de 250 ml, o qual foi levado ao banho de ultrassom com água (pH = 10,0) por 20 minutos. A suspensão foi, então, filtrada em papel filtro e em membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro.

#### **4.2.3.1.2 Curva de Ringbom**

A curva de Ringbom tem como objetivo demonstrar a faixa de concentração do fármaco na qual o método pode apresentar linearidade.

Para sua realização, preparou-se uma solução de rabeprazol sódico SQR na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$  da qual retiraram-se alíquotas, com auxílio de bureta, conforme a Tabela 4.5.

Foram efetuadas duas leituras para cada concentração a 291 nm.

---

Tabela 4.5 – Preparo das soluções para obtenção da curva de Ringbom de rabeprazol sódico por espectrofotometria no UV.

<b>Solução</b>	<b>Rabeprazol sódico SQR 50 µg/ml (ml)</b>	<b>Volume final (ml)</b>	<b>Concentração final (µg/ml)</b>
1	0,5	25,0	1,0
2	1,0	25,0	2,0
3	1,5	25,0	3,0
4	2,0	25,0	4,0
5	2,5	25,0	5,0
6	3,0	25,0	6,0
7	3,5	25,0	7,0
8	4,0	25,0	8,0
9	4,5	25,0	9,0
10	5,0	25,0	10,0
11	6,0	25,0	12,0
12	7,0	25,0	14,0
13	8,0	25,0	16,0
14	9,0	25,0	18,0
15	10,0	25,0	20,0
16	4,4	10,0	22,0
17	4,8	10,0	24,0
18	5,2	10,0	26,0
19	5,6	10,0	28,0
20	6,0	10,0	30,0
21	6,4	10,0	32,0
22	6,8	10,0	34,0
23	7,2	10,0	36,0
24	7,6	10,0	38,0
25	8,0	10,0	40,0
26	8,4	10,0	42,0

A curva foi construída a partir da análise de 26 concentrações diferentes de fármaco, em um intervalo de 1,0 a 42,0 µg/ml. Para cada concentração, foram efetuadas duas leituras a 291 nm, utilizando água (pH = 10,0) como branco.

---

#### **4.2.3.1.3 Curva padrão**

A partir de uma solução de rabeprazol sódico SQR de concentração 100 µg/ml, foram retiradas alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 25 ml. Os volumes foram completados com água pH = 10,0, obtendo-se soluções com concentrações de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 e 18,0 µg/ml. As soluções foram preparadas em triplicata e foram efetuadas três leituras para cada concentração, a 291 nm.

#### **4.2.3.1.3.1 Cálculos para a curva padrão**

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração *versus* absorvância. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para a verificação da linearidade do método.

#### **4.2.3.1.4 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos**

A solução da amostra produto farmacêutico foi preparada colocando-se cinco comprimidos revestidos, contendo 10 mg de rabeprazol sódico, em balão volumétrico de 500 ml e adicionando-se 100 ml de água (pH = 10,0). O balão foi levado ao banho de ultra-som por 20 minutos, após, completou-se o volume com o mesmo solvente. A solução foi filtrada em papel filtro e em membrana de *nylon* de 0,45 µm de diâmetro de poro. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas de 3,0 ml para seis balões volumétricos de 25 ml, respectivamente, e completou-se o volume com o mesmo solvente. A concentração final das soluções foi de 12 µg/ml.

Para rabeprazol sódico SQR, a solução foi obtida por dissolução deste em água (pH = 10,0) a fim de obter uma solução de concentração final igual a 12 µg/ml.

As seis soluções amostra foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 291 nm, utilizando água (pH = 10,0) como branco.

---



---

A determinação de rabeprazol sódico nos comprimidos foi realizada em três dias diferentes, utilizando-se novas soluções a cada dia, a fim de se avaliar a precisão intermediária do método.

#### **4.2.3.1.4.1 Cálculos para a determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos**

A determinação da concentração de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos foi realizada pela seguinte equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

onde:

$C_{SQR}$  = Concentração da solução de rabeprazol sódico SQR ( $\mu\text{g/ml}$ )

$A_A$  = Absorvância da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos

$A_{SQR}$  = Absorvância da solução de rabeprazol sódico SQR

As percentagens de rabeprazol sódico nas amostras de comprimidos revestidos ( $C_A\%$ ) foram calculadas pela equação:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

onde:

---

---

$C_A$  = concentração da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos ( $\mu\text{g/ml}$ )

$C_T$  = concentração teórica da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos ( $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 4.2.3.1.5 Teste de recuperação

Para obtenção das soluções teste, denominadas  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ , preparou-se uma solução de rabeprazol sódico SQR, em água (pH = 10,0), na concentração de 25,0  $\mu\text{g/ml}$  e uma solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos, na concentração de 100,0  $\mu\text{g/ml}$ . O preparo das soluções teste está esquematizado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Preparo das soluções para o teste de recuperação utilizando o método de espectrofotometria ultravioleta a 291 nm.

	<b>Volume de solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos 100,0 <math>\mu\text{g/ml}^*</math> (ml)</b>	<b>Volume de solução de rabeprazol sódico SQR 25,0 <math>\mu\text{g/ml}^*</math> (ml)</b>	<b>Concentração final (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
$R_1$	3,0	2,0	14,0
$R_2$	3,0	4,0	16,0
$R_3$	3,0	6,0	18,0

\* Alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 25 ml.

As soluções  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  foram preparadas em triplicata. Soluções de rabeprazol sódico SQR e produto farmacêutico também foram preparadas na concentração de 12  $\mu\text{g/ml}$  para realização do ensaio. Para todas as soluções foram realizadas três determinações.

#### 4.2.3.1.5.1 Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação de rabeprazol sódico SQR foram calculadas através da seguinte equação (AOAC, 1990):

---

---

$$R\% = [(C_B - C_A) / C_P] \cdot 100$$

onde:

$C_B$  = concentração da solução contendo rabeprazol sódico SQR e rabeprazol sódico em comprimidos revestidos determinada pelo método ( $\mu\text{g/ml}$ )

$C_A$  = concentração da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos determinada pelo método ( $\mu\text{g/ml}$ )

$C_P$  = concentração da solução de rabeprazol sódico SQR adicionada ( $\mu\text{g/ml}$ )

#### **4.2.3.1.6 Determinação dos limites de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LD) para o rabeprazol sódico foi estabelecido a partir dos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (I), obtidos a partir das três curvas padrão, conforme a equação abaixo (ICH, 1996a):

$$LD = (3,3 \cdot s) / I$$

O limite de quantificação (LQ) para o rabeprazol sódico foi estabelecido com base nos mesmos dados descritos acima, conforme a seguinte equação (ICH, 1996a):

$$LQ = (10 \cdot s) / I$$

---

---

#### 4.2.3.1.7 Resultados

A Figura 4.13 apresenta a comparação dos espectros de absorção da solução de rabeprazol sódico SQR e da solução placebo, em água (pH = 10,0), entre 200 e 400 nm.

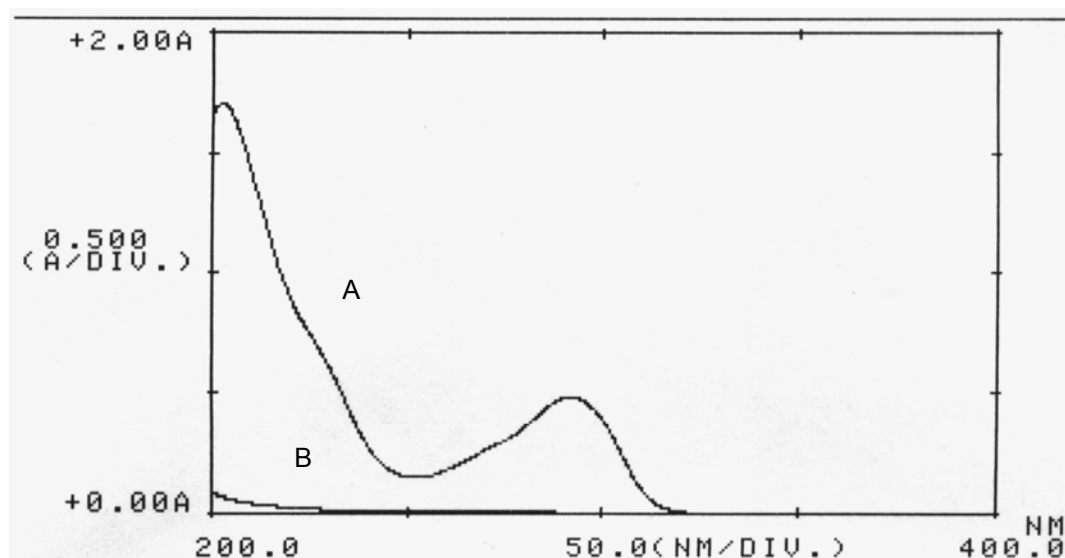


Figura 4.13 – Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria ultravioleta para as soluções de rabeprazol sódico SQR (A) e de placebo (B) preparadas em água (pH = 10,0) na concentração de 12,0 µg/ml.

Os valores de absorvância obtidos, bem como os valores de absorvância (100 - T%), utilizados para a construção da curva de Ringbom, estão descritos na Tabela 4.7.

---

Tabela 4.7 – Valores de absorvância obtidos através do método espectrofotométrico em 291 nm e, valores calculados de absorvência utilizados para a construção da curva de Ringbom de rabeprazol sódico.

	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/ml}</math>) *</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Absorvência (100 –T%)</b>
1	1,0	0,047	10,26
2	2,0	0,089	18,53
3	3,0	0,130	25,87
4	4,0	0,174	33,01
5	5,0	0,218	39,40
6	6,0	0,259	44,85
7	7,0	0,301	49,94
8	8,0	0,342	54,45
9	9,0	0,385	58,74
10	10,0	0,428	62,59
11	12,0	0,513	69,31
12	14,0	0,589	74,18
13	16,0	0,681	79,15
14	18,0	0,765	82,80
15	20,0	0,846	85,74
16	22,0	0,933	88,32
17	24,0	1,007	90,16
18	26,0	1,112	92,27
19	28,0	1,192	93,56
20	30,0	1,284	94,80
21	32,0	1,338	95,41
22	34,0	1,417	96,17
23	36,0	1,503	96,85
24	38,0	1,580	97,37
25	40,0	1,750	98,22
26	42,0	1,737	98,16

\* cada valor é média de duas determinações

A representação gráfica da curva de Ringbom para o rabeprazol sódico está representada na Figura 4.14. A faixa de concentração de 6,0  $\mu\text{g/ml}$  a 18,0  $\mu\text{g/ml}$  pode ser considerada a faixa linear para esta curva, sendo utilizada para a construção da curva padrão de rabeprazol.

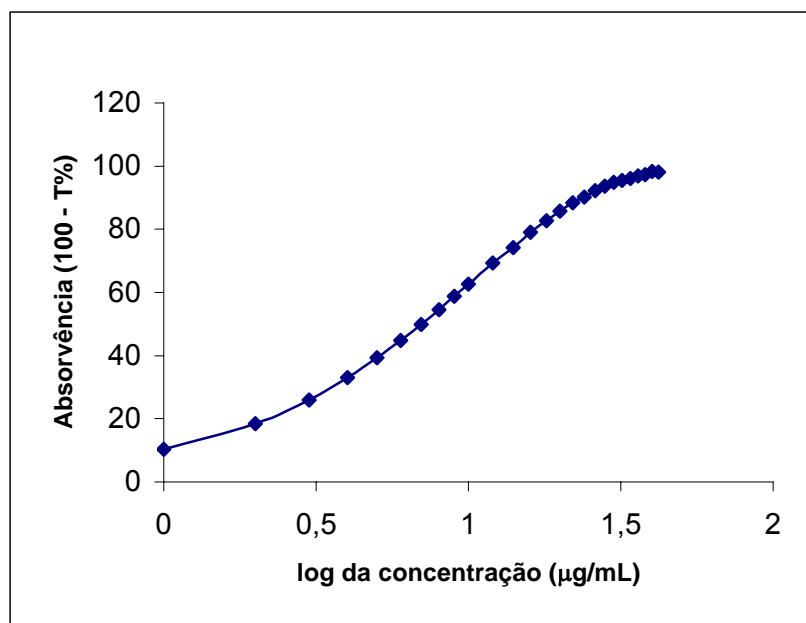


Figura 4.14 – Representação gráfica da curva de Ringbom obtida a partir da análise das soluções de rabeprazol sódico SQR preparadas em água (pH = 10,0), na faixa de concentração de 1,0 a 42,0 µg/ml, por espectrofotometria na região do ultravioleta em 291 nm.

Os valores de absorvância obtidos para cada concentração analisada da curva padrão estão apresentados na Tabela 4.8.

A Figura 4.15 ilustra a representação gráfica da curva padrão, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação obtidos através do método.

A Tabela 4.9 apresenta os valores da ANOVA realizada para avaliação da linearidade do método.

---

Tabela 4.8 – Valores de absorvância obtidos no desenvolvimento da curva padrão de rabeprazol sódico por espectrofotometria na região do ultravioleta no comprimento de onda de 291 nm.

Concentração (µg/ml)	Absorvância*	Absorvância média ± e.p.m.	DPR
6,0	0,251	0,252 ± 0,0003	0,23
	0,252		
	0,252		
8,0	0,336	0,338 ± 0,001	0,51
	0,339		
	0,339		
10,0	0,421	0,421 ± 0,0003	0,14
	0,422		
	0,421		
12,0	0,504	0,504 ± 0,0009	0,30
	0,503		
	0,506		
14,0	0,586	0,586 ± 0,001	0,43
	0,584		
	0,589		
16,0	0,689	0,682 ± 0,0073	1,88
	0,666		
	0,668		
18,0	0,749	0,752 ± 0,002	0,47
	0,752		
	0,756		

\* cada valor é média de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

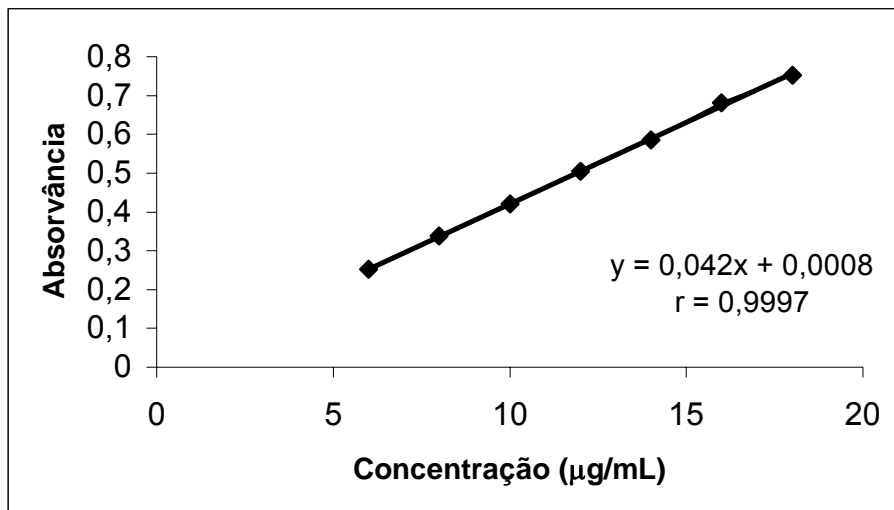


Figura 4.15 – Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por espectrofotometria ultravioleta, a 291 nm.

Tabela 4.9 – Análise de variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de rabeprazol sódico através da espectrofotometria no ultravioleta, a 291 nm.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
<b>ENTRE</b>	6	0,594809	0,09913	2080,68*
- regressão linear	1	0,594455	0,594455	12477,27*
- desvio de linearidade	5	0,000354	0,0000708	1,49
<b>RESÍDUO</b>	14	0,000667	0,000047643	
<b>TOTAL</b>	20	0,595476		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos através da espectrofotometria no ultravioleta estão na Tabela 4.10.



Tabela 4.10 – Valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria no ultravioleta, a 291 nm

Amostra	Teor (%)*			Interdias	DPR
	1º Dia	2º Dia	3º Dia		
1	102,40	101,42	102,27		
2	102,40	101,35	102,94		
3	102,33	101,29	102,74		
4	102,14	101,35	103,14	102,26	0,82
5	102,14	101,42	103,74		
6	102,53	101,10	103,94		
Média	102,32	101,32	103,13		
DPR	0,15	0,12	0,61		

\* cada valor é média de três determinações

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação de rabeprazol sódico SQR estão apresentadas na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Resultados referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria ultravioleta, a 291 nm.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	2,0	1,99	99,50	
R <sub>2</sub>	4,0	4,01	100,25	99,65
R <sub>3</sub>	6,0	5,95	99,17	

\* cada valor é média de três determinações

---

Os valores obtidos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação de rabeprazol sódico, através da espectrofotometria ultravioleta, no comprimento de onda de 291 nm, foram 0,32 µg/ml e 0,95 µg/ml, respectivamente.

#### **4.2.3.1.8 Discussão**

A espectrofotometria na região do ultravioleta é uma técnica de fácil execução e custo reduzido. Pode ser utilizada, com boa precisão, para a análise quantitativa de fármacos presentes em formulações farmacêuticas, desde que não sofra interferência dos excipientes (WATSON, 1999).

Para o desenvolvimento deste método, foram traçados os espectros da solução de rabeprazol sódico SQR e de solução placebo, em diferentes solventes, a fim de selecionar o comprimento de onda mais adequado, bem como verificar a eventual interferência dos excipientes nos comprimentos de onda de máxima absorção, os quais seriam utilizados no doseamento.

O solvente selecionado para o preparo das amostras foi a água, com pH ajustado para 10,0, pois, além da facilidade de trabalho e alta solubilidade do fármaco neste solvente, o custo e a geração de resíduos são reduzidos. A necessidade de ajuste do pH deve-se à instabilidade de rabeprazol sódico em condições ácidas, o que poderia prejudicar a análise.

O preparo das amostras utilizando comprimidos inteiros e não o pó obtido por trituração destes, seguiu o procedimento adotado por SOUZA (1995) para o fármaco pefloxacino. Este fato deve-se à dificuldade de trituração e homogeneização do revestimento dos comprimidos, o qual, ficando íntegro, gerou grande variabilidade nas tomadas de amostra e, conseqüentemente, falta de precisão ao método, conforme os testes preliminares realizados.

O espectro de absorção de rabeprazol sódico em solução aquosa, traçado na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, forneceu um comprimento de onda de máxima absorção em 291 nm, utilizado para o doseamento.

O teste de especificidade demonstrou haver uma pequena absorção por parte dos excipientes no comprimento de onda de trabalho, 291 nm. Porém, após a

---

---

filtração da solução placebo em membrana de *nylon* de 0,45 µm a interferência desapareceu, sendo possível executar a determinação do fármaco de forma específica. Sendo assim, o procedimento de filtração em membrana das amostras de rabeprazol sódico em comprimido revestido foi adotado para a validação.

Os dados obtidos da curva de Ringbom determinaram a seleção dos valores da porção retilínea para avaliação da linearidade. A faixa de concentração selecionada foi de 6,0 µg/ml a 18,0 µg/ml.

A construção do gráfico de concentração *versus* absorvância permitiu a observação de uma correlação linear entre esses dois fatores. Através do estudo de regressão linear, obteve-se a equação de reta  $y = 0,042x + 0,0008$ , com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9997. Para comprovação da linearidade do método, efetuou-se a ANOVA, a qual demonstrou haver regressão linear significativa e ausência de desvio da linearidade.

A precisão do método foi avaliada através da determinação das amostras de produto farmacêutico em um mesmo dia e em dias diferentes (precisão intermediária). Os resultados demonstraram que o método apresenta boa precisão, pois, tanto no mesmo dia quanto em dias diferentes, os DPR são baixos. O teor médio de rabeprazol sódico nos comprimidos revestidos foi de 102,26% nos três dias de análise.

A exatidão do método foi estudada através do teste de recuperação de rabeprazol sódico SQR. A recuperação média foi de 99,65%, considerada satisfatória e demonstra que o método proposto é exato.

Os limites de detecção e quantificação de rabeprazol sódico calculados foram reduzidos (LD= 0,32 µg/ml e LQ = 0,95 µg/ml), indicando que este método é sensível para a determinação deste fármaco.

Considerando os resultados de todos os parâmetros analíticos avaliados, pode-se afirmar que o método espectrofotométrico na região do ultravioleta foi validado para a determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos.

---

---

#### **4.2.3.2 Espectrofotometria ultravioleta derivada (GARCIA *et al.*, 2006a)**

Para a validação deste método, utilizou-se água pH=10,0 (ajustado com hidróxido de amônio-GRUPO QUÍMICA) como solvente e o espectrofotômetro citado no item 4.2.2.2.

As leituras foram efetuadas utilizando o método zero-pico para a derivada de 1ª ordem, no comprimento de onda de 304 nm, com o assentamento de ordenada (N) de 5 e  $\Delta\lambda = 4,0$  nm.

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados visando à validação do método de espectrofotometria ultravioleta derivada: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e de quantificação.

##### **4.2.3.2.1 Avaliação da especificidade**

Para análise da especificidade, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e de placebo, em água (pH 10,0), na concentração de 12,0 µg/ml.

A solução placebo era composta dos mesmos excipientes e quantidades, descritos no item 4.2.3.1.1, que foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 250 ml. Este foi levado ao banho de ultra-som com água (pH 10,0) por 20 minutos e a suspensão resultante foi filtrada em filtro de papel.

Foram traçados os espectros de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª ordens, utilizando água (pH 10,0) como branco.

##### **4.2.3.2.2 Curva padrão**

A curva padrão foi obtida a partir de uma solução de rabeprazol sódico SQR, de concentração 100 µg/ml, da qual foram retiradas alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 ml para balões volumétricos de 25 ml, com auxílio de bureta. Os volumes foram completados com água pH 10,0, obtendo-se soluções com

---

---

concentrações de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 e 18,0 µg/ml. As soluções foram preparadas em triplicata e efetuadas três determinações para cada concentração.

#### **4.2.3.2.1 Cálculos para a curva padrão**

A curva padrão foi obtida com a construção de um gráfico de concentração *versus* absorvância. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para a verificação da linearidade do método.

#### **4.2.3.2.3 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos**

A solução da amostra produto farmacêutico foi preparada colocando-se cinco comprimidos revestidos, contendo 10 mg de rabeprazol sódico, em balão volumétrico de 500 ml e adicionando-se 100 ml de água (pH = 10,0). O balão foi levado ao banho de ultra-som por 20 minutos e após, completou-se o volume com o mesmo solvente. A amostra foi filtrada em filtro de papel e, a partir dela, foram transferidas alíquotas de 3,0 ml para seis balões volumétricos de 25 ml, respectivamente, completando-se o volume com água (pH 10,0). A concentração final das soluções foi de 12,0 µg/ml.

Para rabeprazol sódico SQR, a solução foi obtida por dissolução deste em água (pH = 10,0) a fim de obter uma solução de concentração final igual a 12,0 µg/ml.

A determinação de rabeprazol sódico nos comprimidos foi realizada em três dias diferentes a fim de se avaliar a precisão intermediária do método. Os cálculos foram realizados utilizando-se as equações descritas no item 4.2.3.1.4.1.

---

---

#### 4.2.3.2.4 Teste de recuperação

Para obtenção das soluções teste, denominadas R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR na concentração de 25 µg/ml e de rabeprazol sódico produto farmacêutico na concentração de 100 µg/ml.

O preparo das soluções teste foi realizado em triplicata, utilizando água (pH 10,0) como solvente, segundo o esquema representado na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Preparo das soluções para o teste de recuperação utilizando o método de espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.

	<b>Volume de solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos 100 µg/ml* (ml)</b>	<b>Volume de solução de rabeprazol sódico SQR 25 µg/ml* (ml)</b>	<b>Concentração final (µg/ml)</b>
R <sub>1</sub>	3,0	2,0	14,0
R <sub>2</sub>	3,0	4,0	16,0
R <sub>3</sub>	3,0	6,0	18,0

\* Alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 25 ml.

Para execução do ensaio, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e produto farmacêutico na concentração final de 12,0 µg/ml, em água (pH 10,0), conforme descrito no item 4.2.3.2.3. Os cálculos foram realizados de acordo com as equações descritas no item 4.2.3.1.5.1.

#### 4.2.3.2.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação para o método de espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem foram determinados com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média ( I ), obtidos a partir das três curvas padrão. Foram utilizadas as mesmas equações descritas no item 4.2.3.1.6 (ICH, 1996a).

#### 4.2.3.2.6 Resultados

A Figura 4.16 apresenta a sobreposição dos espectros da solução de rabeprazol sódico SQR e da solução placebo, obtidos por espectrofotometria

---

---

ultravioleta derivada de 1ª ordem, com assentamento de ordenadas (N) 5 e faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

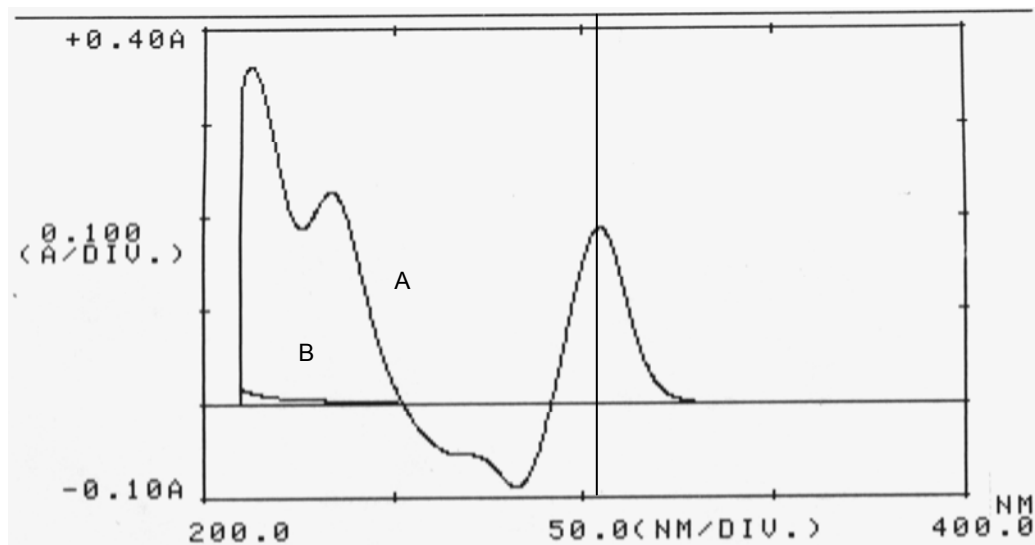


Figura 4.16 - Espectros sobrepostos de rabeprazol sódico SQR (A) e de solução placebo (B) obtidos por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem, N = 5.

O comprimento de onda selecionado para efetuar as leituras foi 304 nm.

As demais ordens da espectrofotometria ultravioleta derivada não resultaram em um perfil espectral adequado para a determinação de rabeprazol sódico.

Os valores de absorvância obtidos para cada concentração analisada da curva padrão estão na Tabela 4.13.

---

Tabela 4.13 – Valores de absorvância obtidos no desenvolvimento da curva padrão por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1ª ordem.

<b>Concentração (µg/ml)</b>	<b>Absorvância*</b>	<b>Absorvância média ± e.p.m</b>	<b>DPR</b>
6,0	0,063	0,063 ± 0,00	0,00
	0,063		
	0,063		
8,0	0,084	0,085 ± 0,0003	0,68
	0,085		
	0,085		
10,0	0,108	0,106 ± 0,001	1,63
	0,105		
	0,105		
12,0	0,126	0,126 ± 0,00	0,00
	0,126		
	0,126		
14,0	0,147	0,146 ± 0,0003	0,39
	0,146		
	0,146		
16,0	0,166	0,167 ± 0,0006	0,60
	0,168		
	0,167		
18,0	0,188	0,187 ± 0,0007	0,62
	0,186		
	0,186		

\* cada valor é média de três determinações

e.p.m. = erro padrão da média

DPR = desvio padrão relativo

A representação gráfica da curva padrão, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação obtidos através do método estão indicados na Figura 4.17.

A Tabela 4.14 apresenta os valores encontrados na ANOVA para avaliação da linearidade.



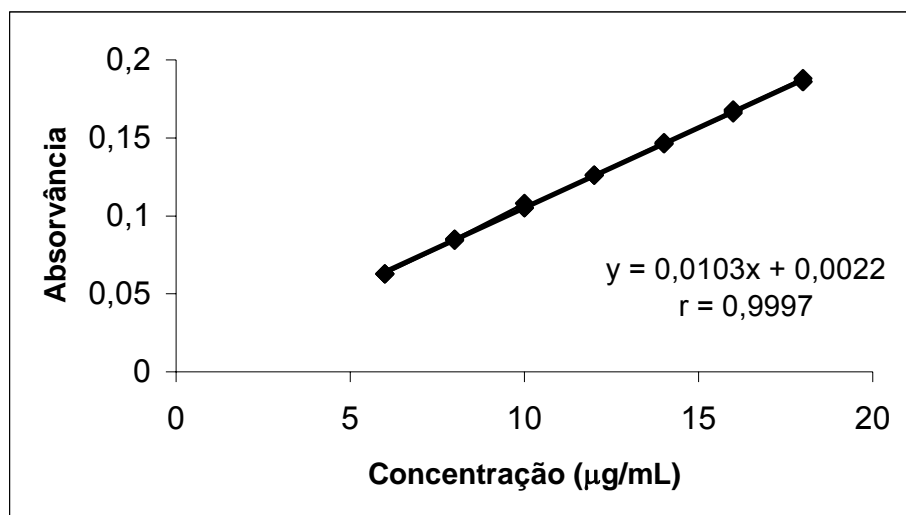


Figura 4.17 – Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem, N = 5.

Tabela 4.14 – Análise de variância das absorvâncias determinadas para a curva padrão de rabeprazol sódico através da espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
<b>ENTRE</b>	6	0,0355543	0,005925717	3500,13*
- regressão linear	1	0,03553436	0,03553436	20988,99*
- desvio de linearidade	5	0,00000864	0,000001728	1,02
<b>RESÍDUO</b>	14	0,0000237	0,000001693	
<b>TOTAL</b>	20	0,0355667		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

Os valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos através do método proposto estão na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.

Amostra	Teor (%)*			Interdias	DPR
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
1	100,25	98,02	99,74		
2	101,01	98,02	100,00		
3	100,75	98,51	100,00		
4	100,50	98,76	100,00	99,53	1,00
5	99,50	98,27	100,00		
6	100,25	98,02	100,00		
Média	100,38	98,27	99,96		
DPR	0,52	0,32	0,11		

\* cada valor é média de três determinações

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação de rabeprazol sódico SQR estão apresentadas na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação de rabeprazol sódico por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	2,0	1,97	98,71	
R <sub>2</sub>	4,0	3,95	98,75	99,15
R <sub>3</sub>	6,0	6,00	100,00	

\* cada valor é média de três determinações

---

Os valores calculados para os limites de detecção e de quantificação, através do método proposto, foram 0,055 µg/ml e 0,168 µg/ml, respectivamente.

#### **4.2.3.2.7 Discussão**

A espectrofotometria derivada vem tendo grande aplicação na análise de fármacos desde a década de 70. Nos últimos anos, esta aplicação pode ser comprovada pela observação, na literatura, de um número crescente de trabalhos que utilizam este método (KARPINSKA, 2004; OJEDA e ROJAS, 2004).

A aplicação desta técnica proporciona um perfil característico do espectro, onde mudanças sutis de inclinação e curvatura se tornam mais evidentes, facilitando a caracterização de um composto e eliminando a deformação da curva causada pela presença de substâncias estranhas. Desta maneira, pode-se individualizar melhor os constituintes de misturas complexas e eliminar a interferência de excipientes e de produtos de degradação (HACKMANN *et al.*, 1991).

A pesquisa bibliográfica revelou alguns trabalhos aplicando a espectrofotometria derivada para quantificação de fármacos inibidores da bomba de prótons, como omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, os quais foram estudados a fim de selecionar as melhores condições de análise (CASTRO *et al.*, 1999; ÖZALTÍN, 1999; KARLJIKOVIC-RAJIC *et al.*, 2003).

Os espectros de soluções de rabeprazol sódico SQR e de placebo foram traçados nas diferentes ordens de derivada (1ª a 4ª) e assentamentos de ordenadas (1 a 9), buscando as condições de ausência de interferentes e valor máximo de absorção, sem perdas na definição do espectro.

Após esta avaliação, foram fixados os seguintes parâmetros: derivada de 1ª ordem, assentamento de ordenadas (N) de 5, comprimento de onda de 304 nm e  $\Delta\lambda = 4,0$ . O valor de delta lâmbda ( $\Delta\lambda$ ) representa o incremento constante utilizado para traçar a curva derivada de um espectro de absorção (HACKMANN *et al.*, 1991) e foi estabelecido automaticamente pelo equipamento.

---

---

A análise da especificidade demonstrou não haver necessidade de filtração da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos com membrana de *nylon*, como ocorreu na espectrofotometria ultravioleta em 291 nm, pois os excipientes não absorvem no comprimento de onda selecionado para a determinação (304 nm). Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de realizar as análises sem pré-tratamentos especiais para a amostra, tornando-a mais rápida (TALSKY, 1994).

Diferentes métodos de leitura podem ser empregados para a determinação, incluindo zero-pico, pico-pico e tangente (HACKMANN *et al.*, 1991; TALSKY, 1994). Neste trabalho, foi empregado o método de leitura zero-pico, pois este é o método disponibilizado pelo equipamento.

Para avaliação da linearidade do método, foi construída uma curva padrão na faixa de concentração de 6,0 a 18,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas no mesmo dia. Observou-se uma correlação linear entre a concentração de rabeprazol sódico SQR e as absorvâncias obtidas. O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu a equação de reta  $y = 0,0103 x + 0,0022$ , com um coeficiente de correlação de 0,9997. Os resultados de ANOVA demonstraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade.

A precisão do método foi avaliada através da determinação das amostras de produto farmacêutico em um mesmo dia e em dias diferentes (precisão intermediária). Os resultados revelam valores de desvio padrão relativo reduzidos, indicando que o método apresenta boa precisão. O teor médio de rabeprazol sódico nos comprimidos revestidos foi de 99,53% (DPR = 1,00) nos três dias de análise. Karpinska (2004) comenta que esta técnica pode apresentar baixa reprodutibilidade, devido a fatores instrumentais, porém, este problema não foi observado durante o estudo.

A exatidão do método foi estudada através do teste de recuperação de rabeprazol sódico SQR. O valor de recuperação média de 99,15% (DPR = 0,74) é satisfatório e demonstra que o método proposto é exato.

---

---

A sensibilidade do método foi demonstrada pelos baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação de rabeprazol sódico (LD = 0,055 µg/ml e LQ = 0,168 µg/ml).

A partir da avaliação dos resultados obtidos para os parâmetros analíticos estudados, considera-se o método de espectrofotometria ultravioleta derivada de 1ª ordem validado para a determinação de rabeprazol sódico.

#### **4.2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (GARCIA *et al.*, 2004)**

O procedimento para a análise cromatográfica foi descrito no item 4.2.2.3 e as condições analíticas empregadas estão na Tabela 4.3.

A validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi efetuada através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limites de detecção e de quantificação e robustez.

##### **4.2.3.3.1 Teste de especificidade**

Para o teste de especificidade, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e comprimidos revestidos, na concentração de 40,0 µg/ml, conforme descrito a seguir no item 4.2.3.3.3. Da mesma forma, preparou-se uma solução placebo contendo os excipientes presentes na formulação nas mesmas quantidades descritas no item 4.2.3.1.1, em uma concentração teórica de 40,0 µg/ml.

As soluções de produto farmacêutico e de placebo foram filtradas em papel filtro e todas as soluções foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro.

---

---

Os cromatogramas obtidos a partir das soluções foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação.

#### **4.2.3.3.2 Curva Padrão**

Para construção da curva padrão, preparou-se, em acetonitrila, uma solução de rabeprazol sódico SQR na concentração de 125 µg/ml. A partir desta solução, alíquotas de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 ml foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, através de bureta. Os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 e 70,0 µg/ml. Para cada concentração de análise, foram preparadas soluções em triplicata, sendo efetuadas três determinações por solução.

##### **4.2.3.3.2.1 Cálculos para a curva padrão**

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração *versus* área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a ANOVA foi realizada para verificação da linearidade do método.

##### **4.2.3.3.3 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos**

A solução da amostra produto farmacêutico foi preparada colocando-se cinco comprimidos revestidos, contendo 10 mg de rabeprazol sódico cada, em balão volumétrico de 200 ml e adicionando-se 20,0 ml de água (pH = 10,0). O balão foi levado ao banho de ultra-som, por 20 minutos e após, completou-se o volume com acetonitrila. A solução foi filtrada em filtro de papel e, a partir dela, foram transferidas alíquotas de 4,0 ml para seis balões volumétricos de 25 ml, respectivamente, completando-se o volume com acetonitrila. A soluções foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm e a concentração final foi de 40,0 µg/ml.

Para rabeprazol sódico SQR, a solução foi obtida por dissolução deste em acetonitrila, a fim de obter uma solução de concentração final igual a 40,0 µg/ml.

---

---

A determinação de rabeprazol sódico nos comprimidos foi realizada em três dias diferentes a fim de se avaliar a precisão intermediária do método. Os cálculos foram realizados utilizando-se as equações descritas no item 4.2.3.1.4.1.

#### 4.2.3.3.4 Teste de recuperação

Para realização do teste de recuperação, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e de produto farmacêutico, como descrito no item 4.2.3.3.3, nas concentrações de 100,0 e 250,0 µg/ml, respectivamente.

A partir destas soluções, foram obtidas as soluções teste, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, e as soluções de rabeprazol sódico SQR, denominada P, e de comprimidos revestidos, denominada A, utilizadas no ensaio. A forma de preparo está esquematizada na Tabela 4.17. As alíquotas foram transferidas com auxílio de bureta.

Tabela 4.17 – Preparo das soluções para o teste de recuperação utilizando o método de CLAE

	<b>Volume da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos 250,0 µg/ml* (ml)</b>	<b>Volume da solução de rabeprazol sódico SQR 100 µg/ml* (ml)</b>	<b>Concentração final (µg/ml)</b>
A	4,0	-	40,0
R1	4,0	2,5	50,0
R2	4,0	5,0	60,0
R3	4,0	7,5	70,0
P	-	10,0	40,0

\* alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 25 ml

As soluções teste foram preparadas em triplicata. Para todas as soluções foram feitas três determinações. Os cálculos das quantidades recuperadas foram feitos de acordo com as equações do item 4.2.3.1.5.1.

---

---

#### **4.2.3.3.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação**

Os limites de detecção e quantificação para o método por cromatografia líquida de alta eficiência foram determinados com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média ( l ), obtidos a partir das três curvas padrão. Foram utilizadas as mesmas equações descritas no item 4.2.3.1.6 (ICH, 1996a).

#### **4.2.3.3.6 Avaliação da robustez**

A robustez do método foi avaliada através da observação do perfil cromatográfico após alterações na fase móvel, como proporção dos componentes e pH.

O preparo das soluções de rabeprazol sódico SQR e comprimidos revestidos foi realizado como descrito no item 4.2.3.3.3.

A fase móvel foi preparada como descrito no item 4.2.2.3, porém na avaliação da influência de seu pH foi realizada a mudança de pH 6,0 para 6,8, utilizando hidróxido de amônio. Para avaliação da proporção dos componentes, realizou-se a mistura de acetonitrila e água nas proporções 33:67 (v/v) e 37:63 (v/v), mantendo o pH 6,0.

#### **4.2.3.3.7 Resultados**

Os valores das áreas absolutas referentes às concentrações analisadas na curva padrão estão descritos na Tabela 4.18.

---



Tabela 4.18 – Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de rabeprazol sódico por cromatografia líquida de alta eficiência.

Concentração (µg/ml)	Áreas absolutas*	Área média ± e.p.m	DPR
10,0	350301,00	347790,6 ± 2548,00	1,27
	350376,00		
	342694,67		
20,0	695566,33	697795,4 ± 2702,54	0,67
	694645,67		
	703174,33		
30,0	1053935,67	1067842,0 ± 7730,78	1,25
	1068942,30		
	1080648,00		
40,0	1462041,33	1465897,0 ± 8133,22	0,96
	1481510,67		
	1454139,33		
50,0	1848147,33	1838908,0 ± 6184,42	0,58
	1827166,67		
	1841409,67		
60,0	2226275,33	2233965,0 ± 18099,45	1,40
	2268443,67		
	2207176,33		
70,0	2632195,67	2619062,0 ± 9616,65	0,64
	2624664,33		
	2600327,00		

\* cada valor é média de três determinações

e.p.m. = erro padrão da média

DPR = desvio padrão relativo

A Figura 4.18 mostra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

Os valores encontrados na ANOVA para avaliação da linearidade do método estão indicados na Tabela 4.19.

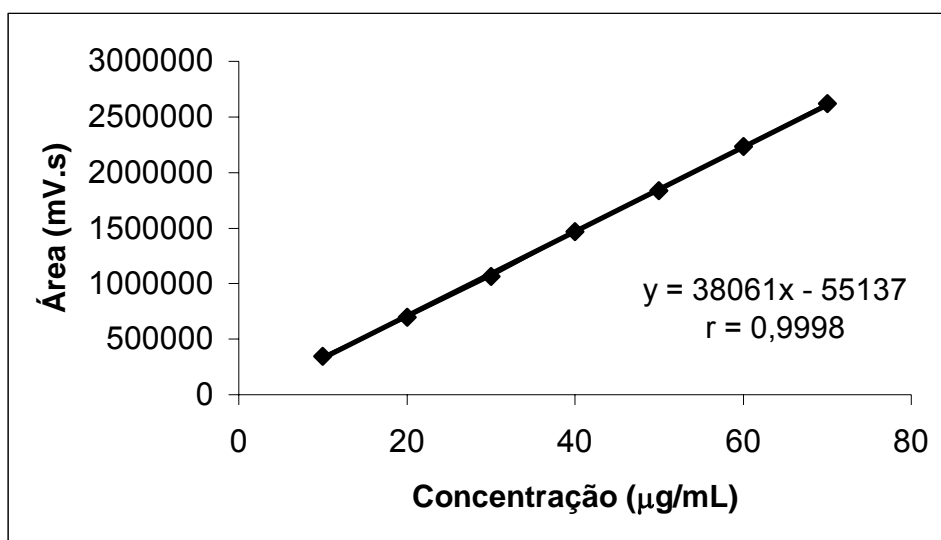


Figura 4.18 – Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4.19 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de rabeprazol sódico através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
<b>ENTRE</b>	6	$1,181 \times 10^{13}$	$1,9683 \times 10^{12}$	75,50*
- regressão linear	1	$1,1806 \times 10^{13}$	$1,1806 \times 10^{13}$	452,83*
- desvio de linearidade	5	3400171417,28	680034283,46	0,026
<b>RESÍDUO</b>	14	$3,65 \times 10^{11}$	26071428571,4	
<b>TOTAL</b>	20	$1,2175 \times 10^{13}$		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

Os valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência, em três dias, estão apresentados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência em três dias.

Amostra	Teor (%)*			Interdias	DPR
	1º Dia	2º Dia	3º Dia		
1	103,53	103,19	103,90		
2	104,94	103,67	103,00		
3	104,45	103,83	107,61		
4	103,54	103,53	105,34	104,06	1,03
5	103,29	104,10	104,08		
6	103,23	103,85	103,16		
Média	103,83	103,69	104,68		
DPR	0,67	0,30	1,54		

\* cada valor é média de três determinações

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação de rabeprazol sódico SQR estão apresentadas na Tabela 4.21.

Tabela 4.21 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação de rabeprazol sódico por cromatografia líquida de alta eficiência.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	10,0	10,19	101,90	
R <sub>2</sub>	20,0	20,26	101,30	101,61
R <sub>3</sub>	30,0	30,49	101,63	

\* cada valor é média de três determinações

---

Os cromatogramas obtidos na análise das soluções de rabeprazol sódico SQR e de solução placebo podem ser visualizados na Figura 4.19.

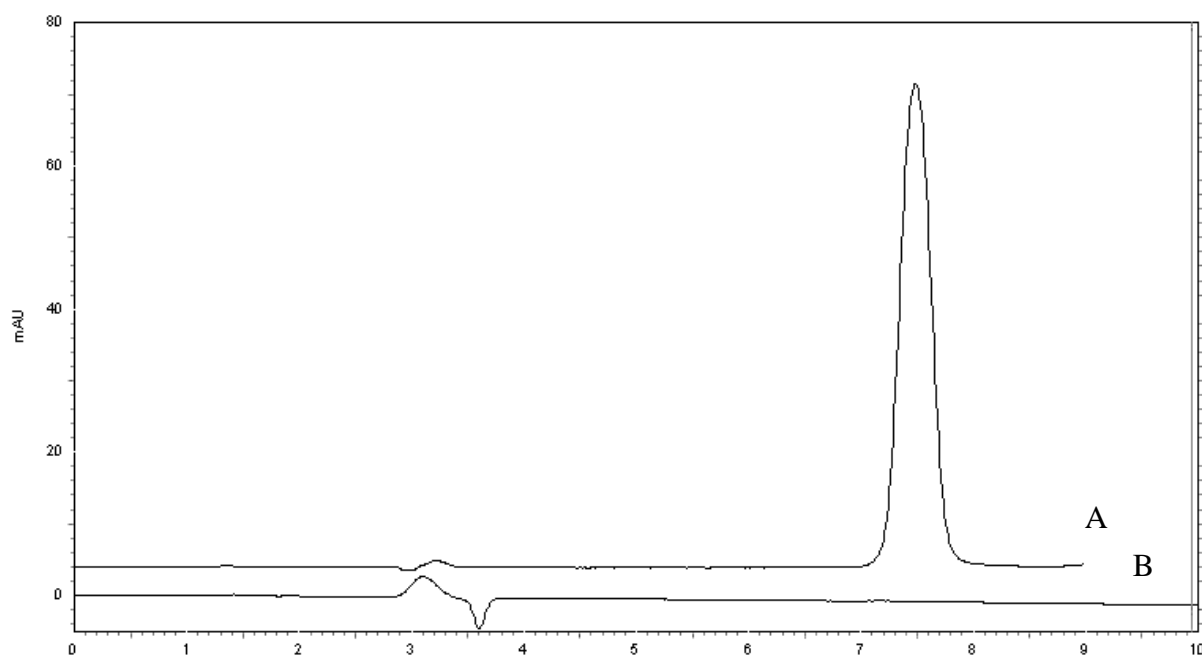


Figura 4.19 – Cromatogramas obtidos através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência das soluções de rabeprazol sódico SQR (A) e de solução placebo (B), na concentração de 40  $\mu\text{g/ml}$ . Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30  $^{\circ}\text{C}$ .

Os valores obtidos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação para o rabeprazol sódico, através do método proposto, foram 0,80  $\mu\text{g/ml}$  e 2,43  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Os valores encontrados para os parâmetros cromatográficos número de pratos teóricos (N), assimetria e fator capacidade ( $k'$ ), bem como os tempos de retenção obtidos para o rabeprazol sódico através de pequenas alterações nas condições cromatográficas estabelecidas, estão na Tabela 4.22.

---

Tabela 4.22 – Avaliação da robustez do método por cromatografia líquida de alta eficiência através da observação dos parâmetros cromatográficos número de pratos teóricos (N), assimetria e fator capacidade, alterando pH da fase móvel, proporção dos componentes da fase móvel e equipamento.

Alteração	Tempo de retenção (min)	N	Assimetria	k'
Fase móvel pH = 6,8	7,52	3425	0,89	5,80
Fase móvel acetonitrila:água (33:67 v/v) pH = 6,0	8,91	3600	0,94	7,03
Fase móvel acetonitrila:água (37:63 v/v) pH = 6,0	6,46	3350	0,90	4,75

A Figura 4.20 demonstra os cromatogramas obtidos na avaliação da robustez do método cromatográfico.

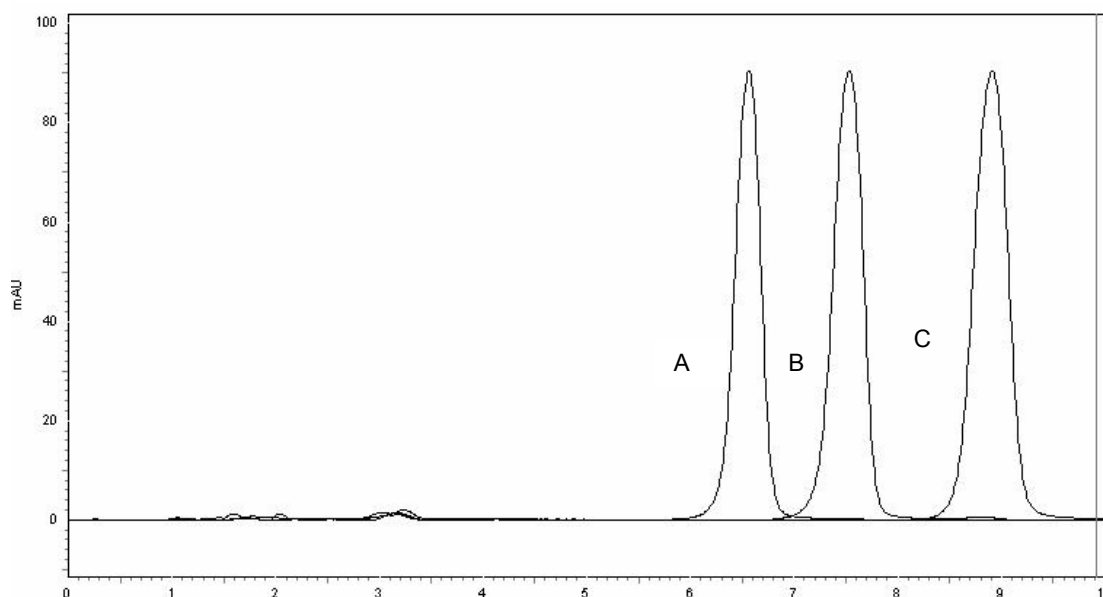


Figura 4.20 - Cromatogramas de solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos obtidos na avaliação da robustez. (A) Fase móvel acetonitrila-água 37:63 (v/v) pH 6,0, (B) fase móvel acetonitrila-água (35:65) pH 6,8; (C) fase móvel acetonitrila-água 33:67 (v/v) pH 6,0.

---

#### 4.2.3.3.8 Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é o método mais comumente utilizado na análise farmacêutica. A combinação desta técnica com diferentes detectores fornece um método preciso e exato para análise quantitativa dos produtos farmacêuticos (WATSON, 1999).

Como citado anteriormente, diferentes composições de fase móvel foram testadas durante o desenvolvimento do método até que fosse escolhida a mistura de acetonitrila e água, na proporção 35:65 (v/v). Da mesma forma, foram testados diferentes solventes para a amostra, uma vez que foi constatada a degradação do rabeprazol sódico em água após, aproximadamente, 5 horas. Considerando que alguns dias de análise, como a realização da curva padrão, podem durar mais de 8 horas desde o preparo das soluções até a injeção de todas as amostras, buscou-se um solvente que mantivesse o fármaco estável durante toda a análise. Neste sentido, foram testadas misturas contendo água com dibutilamina (pH = 7,0) e acetonitrila pura. Os resultados obtidos demonstraram que a acetonitrila era adequada, pois a solução resultante possuía pH aproximadamente 11,0, mantendo o fármaco estável por, pelo menos, 15 horas.

Tendo em vista a necessidade de utilização dos comprimidos de rabeprazol sódico inteiros no preparo das amostras, como já mencionado, foi padronizada a utilização de pequena quantidade de água com pH ajustado para 10,0 (aproximadamente 10% do volume), a fim de promover a desintegração dos comprimidos, que possuem revestimento gastrorresistente.

O tempo de retenção observado para o rabeprazol sódico foi de aproximadamente 7,5 minutos, adequado para análise de rotina.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva padrão, na faixa de concentração de 10,0 a 70,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas no mesmo dia, sendo evidenciada uma correlação linear entre as áreas médias obtidas e a concentração de rabeprazol sódico SQR. O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação de reta  $y = 38061 x - 55137$ , com um coeficiente de correlação (r) de 0,9998. Os resultados da

---

---

ANOVA demonstraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio da linearidade, o que confirma a linearidade do método.

A precisão do método foi avaliada através da determinação das amostras de produto farmacêutico em um mesmo dia e em dias diferentes (precisão intermediária). Os resultados obtidos indicaram um teor médio de 104,06% (DPR = 1,03) nos três dias de análise. O baixo valor de desvio padrão relativo observado nas análises caracteriza o método como preciso.

O teste de recuperação foi realizado para avaliação da exatidão do método proposto. A percentagem de recuperação média foi de 101,61%, demonstrando que o método é exato para a análise de rabeprazol sódico.

A avaliação da especificidade demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes na formulação na determinação de rabeprazol sódico, visto que não foi observado nenhum pico com tempo de retenção semelhante ao do fármaco. Desta forma, pode-se afirmar que o método é específico para análise de rabeprazol sódico.

Os valores encontrados para os limites de detecção (LD = 0,80 µg/ml) e de quantificação (LQ = 2,43 µg/ml) de rabeprazol sódico demonstram que o método apresenta boa sensibilidade, uma vez que esses valores são baixos.

A avaliação da robustez do método cromatográfico, realizada através de pequenas modificações nas condições cromatográficas, indicou que o método proposto é robusto, pois não houve alterações significativas no perfil dos cromatogramas, com exceção dos tempos de retenção, que variaram de 6,46 a 8,91 minutos. Os demais parâmetros cromatográficos mostraram-se satisfatórios e próximos aos originais.

Com base na avaliação dos resultados obtidos, é possível afirmar que o método por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado de maneira satisfatória para determinação de rabeprazol sódico.

---

---

#### **4.2.3.4 Eletroforese Capilar (EC) (GARCIA *et al.*, 2005)**

Os procedimentos necessários para a análise estão descritos no item 4.2.2.4. As condições eletroforéticas empregadas estão na Tabela 4.4.

Os parâmetros analíticos avaliados para a validação do método por eletroforese capilar foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, e limites de detecção e de quantificação.

##### **4.2.3.4.1 Teste de especificidade**

Para o teste de especificidade, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e comprimidos revestidos, na concentração de 20,0 µg/ml, conforme descrito a seguir no item 4.2.3.4.3. Da mesma forma, preparou-se uma solução placebo contendo os excipientes presentes na formulação nas mesmas quantidades descritas no item 4.2.3.1.1, em uma concentração teórica de 20,0 µg/ml.

As soluções de produto farmacêutico e de placebo foram filtradas em papel filtro e todas as soluções foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro.

Os eletroferogramas obtidos a partir das soluções foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na análise.

##### **4.2.3.4.2 Curva Padrão**

A obtenção da curva padrão foi realizada partindo-se de solução de rabeprazol sódico SQR na concentração de 100,0 µg/ml preparada em água pH 10,0. Alíquotas de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0 ml foram transferidas para balões volumétricos de 20 ml e os volumes completos com o mesmo solvente, obtendo-se soluções com concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µg/ml. Para cada concentração de análise, foram preparadas soluções em triplicata, sendo efetuadas três determinações por solução.

---



---

#### **4.2.3.4.2.1 Cálculos para a curva padrão**

A curva padrão foi traçada através da construção de um gráfico de concentração *versus* área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a ANOVA foi realizada para verificação da linearidade do método.

#### **4.2.3.4.3 Determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos**

A solução da amostra produto farmacêutico foi preparada colocando-se cinco comprimidos revestidos, contendo 10 mg de rabeprazol sódico cada, em balão volumétrico de 250 ml e adicionando-se 30,0 ml de água (pH = 10,0). O balão foi levado ao banho de ultra-som por 20 minutos e após, completou-se o volume com o mesmo solvente. A solução foi filtrada em papel filtro e, a partir dela, foram transferidas alíquotas de 2,0 ml para seis balões volumétricos de 20 ml, respectivamente, completando-se o volume com água pH 10,0. A concentração final das soluções foi de 20,0 µg/ml.

A solução de rabeprazol sódico SQR foi obtida por dissolução deste em água pH 10,0, obtendo-se uma solução de concentração final igual a 20,0 µg/ml.

A determinação de rabeprazol sódico nos comprimidos foi realizada em três dias diferentes a fim de se avaliar a precisão intermediária do método.

A determinação da concentração e dos teores de fármaco presente nos comprimidos foi realizada conforme as equações descritas anteriormente no item 4.2.3.1.4.1.

#### **4.2.3.4.4 Teste de recuperação**

Para realização do teste de recuperação, foram preparadas soluções de rabeprazol sódico SQR e de produto farmacêutico, como descrito no item 4.2.3.4.3, nas concentrações de 100,0 µg/ml, respectivamente.

---

---

A partir destas soluções, foram obtidas as soluções teste, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, e as soluções de rabeprazol sódico SQR, denominada P e de comprimidos revestidos, denominada A, utilizadas no ensaio. A forma de preparo está esquematizada na Tabela 4.23. As alíquotas foram transferidas com auxílio de bureta.

Tabela 4.23 – Preparo das soluções para o teste de recuperação de rabeprazol sódico utilizando o método de eletroforese capilar

	<b>Volume da solução de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos 100,0 µg/ml* (ml)</b>	<b>Volume da solução de rabeprazol sódico SQR 100 µg/ml* (ml)</b>	<b>Concentração final (µg/ml)</b>
A	2,0	-	10,0
R1	2,0	2,0	20,0
R2	2,0	4,0	30,0
R3	2,0	6,0	40,0
P	-	2,0	10,0

\* alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 20 ml

As soluções teste foram preparadas em triplicata. Para todas as soluções foram feitas três determinações.

As percentagens de recuperação de rabeprazol sódico SQR foram calculadas através da equação descrita anteriormente no item 4.2.3.1.5.1 (AOAC, 1990).

#### **4.2.3.4.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação**

Os limites de detecção e quantificação para o método de eletroforese capilar foram determinados com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (l), obtidos a partir das três curvas padrão. Foram utilizadas as mesmas equações descritas no item 4.2.3.1.6 (ICH, 1996a).

---

#### 4.2.3.4.6 Resultados

Os valores das áreas absolutas referentes às concentrações analisadas na curva padrão estão descritos na Tabela 4.24.

A Figura 4.21 ilustra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ).

Os valores encontrados na ANOVA para avaliação da linearidade do método estão indicados na Tabela 4.25.

Tabela 4.24 – Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de rabeprazol sódico por eletroforese capilar.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Áreas absolutas*	Área média $\pm$ e.p.m.	DPR
5,0	6,28	$6,35 \pm 0,078$	2,0
	6,27		
	6,51		
10,0	11,88	$11,68 \pm 0,130$	1,92
	11,44		
	11,74		
20,0	22,59	$22,98 \pm 0,220$	1,65
	23,01		
	23,35		
30,0	32,55	$33,04 \pm 0,257$	1,34
	33,15		
	33,42		
40,0	45,34	$44,99 \pm 0,506$	0,48
	45,65		
	44,00		

\* cada valor é média de três determinações

e.p.m. = erro padrão da média

DPR = desvio padrão relativo

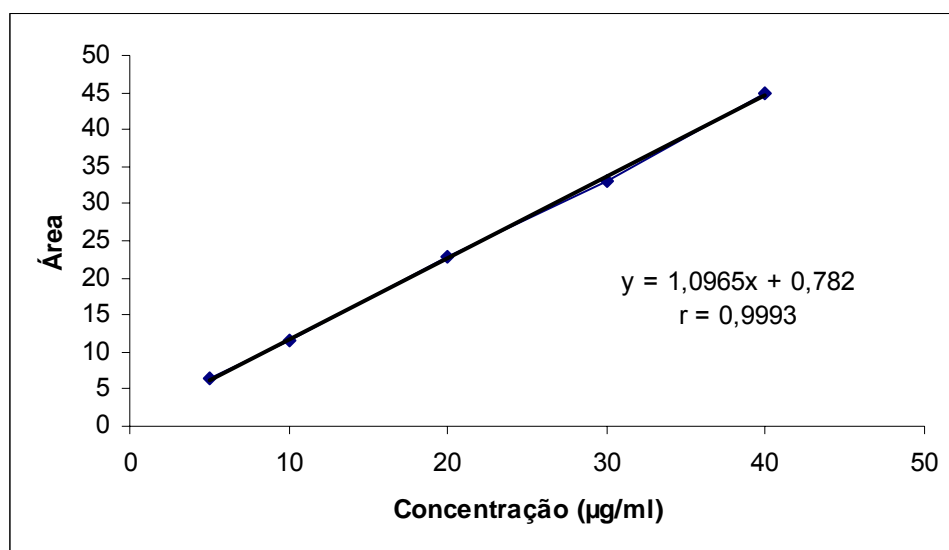


Figura 4.21 – Representação gráfica da curva padrão de rabeprazol sódico obtida por eletroforese capilar.

Tabela 4.25 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de rabeprazol sódico através de eletroforese capilar.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
<b>ENTRE</b>	4	2959,38	739,84	3134,91*
- regressão linear	1	2957,54	2957,54	12531,94*
- desvio de linearidade	3	1,839	0,613	2,59
<b>RESÍDUO</b>	10	2,362	0,236	
<b>TOTAL</b>	14	2961,75		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

Os valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por eletroforese capilar, em três dias, estão apresentados na Tabela 4.26.

Tabela 4.26 – Valores experimentais obtidos na determinação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos por eletroforese capilar.

Amostra	Teor (%)*			Interdias	DPR
	1º Dia	2º Dia	3º Dia		
1	99,30	102,13	100,90		
2	101,20	101,38	98,79		
3	103,17	100,36	101,37		
4	102,02	98,27	100,86	101,06	1,69
5	99,10	99,29	104,52		
6	103,68	101,56	101,20		
Média	101,41	100,49	101,27		
DPR	1,89	1,47	1,82		

\* cada valor é média de três determinações

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação de rabeprazol sódico SQR estão apresentadas na Tabela 4.27.

Tabela 4.27 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por eletroforese capilar

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	10,0	10,59	105,86	
R <sub>2</sub>	20,0	20,80	104,01	103,12
R <sub>3</sub>	30,0	29,83	99,46	

\* cada valor é média de três determinações

Os eletroferogramas obtidos na análise das soluções de rabeprazol sódico SQR e de solução placebo estão representados na Figura 4.22.

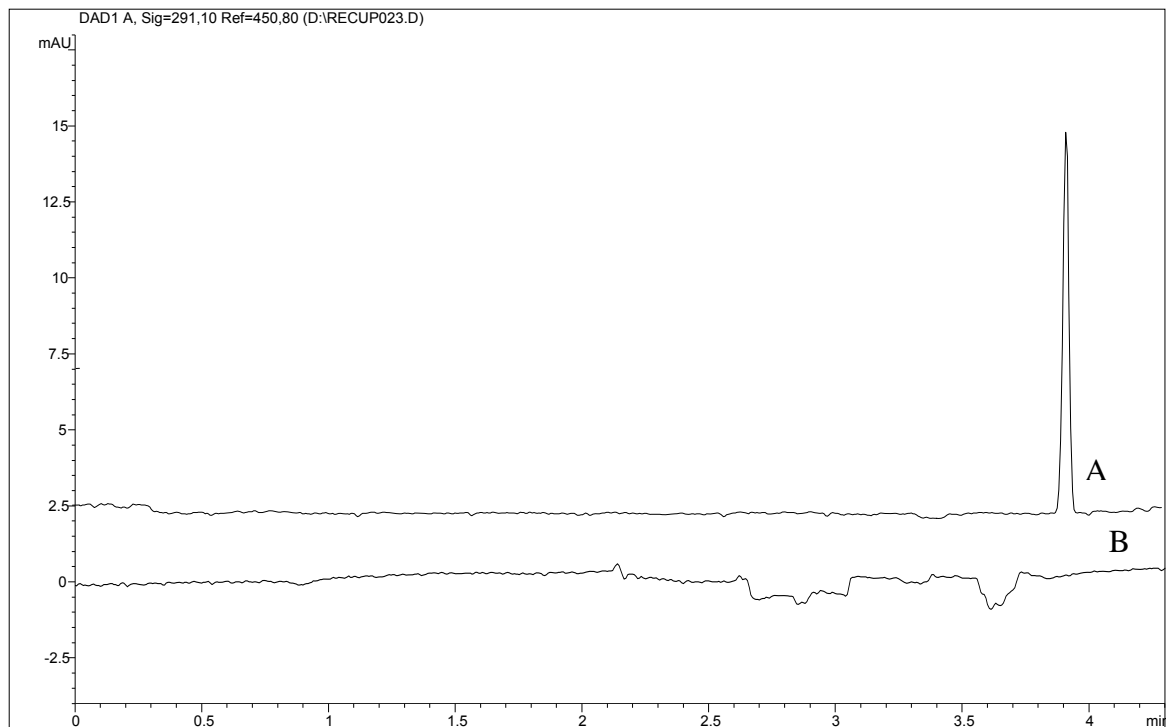


Figura 4.22 – Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de rabeprazol sódico SQR (A) e de solução placebo (B), na concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$ . Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 48 cm; tampão tetraborato de sódio 10 mM como eletrólito de corrida; tensão de 20kV em rampa; detecção UV a 291 nm; temperatura de análise 25 °C.

Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação para o rabeprazol sódico, através do método proposto, foram 1,29  $\mu\text{g/ml}$  e 3,91  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

#### 4.2.3.4.7 Discussão

Durante o desenvolvimento do método, dois parâmetros principais foram avaliados: concentração do eletrólito e diluente para a amostra. A importância da avaliação da concentração do eletrólito já foi discutida anteriormente no item 4.2.2.4.1, sobre a análise qualitativa. O diluente da amostra também deve ser selecionado com cuidado, pois influencia diretamente na estabilidade do composto. Foram testados água (pH ajustado para 10,0 com hidróxido de amônio), tampão borato de sódio 10 mM e 15 mM. As últimas não foram satisfatórias, uma vez que resultaram em linha de base irregular e pico assimétrico. O trabalho de ÖRNSKOV

---

e colaboradores (2003) descreve algumas estratégias para a determinação de compostos instáveis, como rabeprazol, por eletroforese capilar. Segundo os autores, compostos lábeis devem ser dissolvidos em um meio estabilizante a fim de minimizar sua degradação *in vitro* durante a análise. Sendo assim, foi necessário o ajuste de pH da água para 10,0, pois o rabeprazol é instável em meio ácido ou neutro, o que poderia prejudicar a análise.

A etapa de pré-condicionamento do capilar, realizada no início de todas as corridas eletroforéticas, é necessária a fim de estabilizar o capilar e evitar a adsorção da amostra em seu interior. Além disso, torna o tempo de migração mais reprodutível (ALTRIA, 1996).

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva padrão, na faixa de concentração de 5,0 a 40,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas no mesmo dia, sendo evidenciada uma correlação linear entre as áreas médias obtidas e a concentração de rabeprazol sódico SQR. O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação de reta  $y = 1,096x + 0,786$ , com um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9993. Os resultados da ANOVA demonstraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio da linearidade, o que confirma a linearidade do método.

A precisão do método foi avaliada através da determinação das amostras de produto farmacêutico em um mesmo dia e em dias diferentes (precisão intermediária). Os resultados obtidos indicaram um teor médio de 101,06% (DPR = 1,69), em três dias de análise. Os valores de desvio padrão relativo observados nas análises estão abaixo de 2,0, o que caracteriza o método como preciso.

O teste de recuperação, realizado para avaliação da exatidão do método proposto, apresentou recuperação média de 101,61%, demonstrando que o método é exato para a análise de rabeprazol sódico.

A avaliação da especificidade demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes na formulação na determinação de rabeprazol sódico, visto que não foi observado nenhum pico com tempo de migração igual ao do rabeprazol sódico. Desta forma, pode-se afirmar que o método é específico para análise do fármaco.

---

---

Os baixos valores encontrados para os limites de detecção (1,29 µg/ml) e de quantificação (3,91 µg/ml) de rabeprazol sódico demonstram que o método apresenta boa sensibilidade.

Considerando os resultados obtidos na análise dos parâmetros de validação, o método proposto foi satisfatoriamente validado.

#### **4.2.4 Teste de dissolução dos comprimidos revestidos (GARCIA *et al.*, 2006b)**

A avaliação das quantidades de rabeprazol sódico dissolvidas no meio de dissolução foi realizada através da técnica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando as condições descritas no item 4.2.3.3. A única alteração realizada foi no diluente das amostras que, para esta finalidade, foi acetonitrila-tampão borato pH 9,0 (50:50 v/v).

As amostras de produto farmacêutico utilizadas no desenvolvimento e na validação do teste de dissolução foram os comprimidos revestidos contendo 20 mg de fármaco.

O teste foi realizado em aparelho dissolutor Sotax modelo AT7 contendo 6 cubas.

As condições empregadas no teste de dissolução estão descritas na Tabela 4.28.



---

Tabela 4.28 – Condições empregadas no teste de dissolução de comprimidos de rabeprazol sódico.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Aparato	pá
Velocidade de agitação	75 rpm
Meio de dissolução	
- etapa ácida	HCl 0,1 M – 2 horas
- etapa básica	tampão borato pH 9,0 – 1 hora
Volume de meio	900 ml (para as duas etapas)
Modo de desaeração	banho de ultra-som – 15 minutos
Tempos de coleta	5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos
Temperatura	37 ± 0,5 °C

---

As soluções tampão testadas para o desenvolvimento foram preparadas de acordo com a USP 28 (2005).

Os parâmetros avaliados para a validação do teste de dissolução foram: estabilidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

#### **4.2.4.1 Determinação das condições *sink***

As condições *sink* para rabeprazol sódico foram determinadas em tampão fosfato de potássio pH 6,8, tampão fosfato de potássio pH 7,5 e tampão borato pH 9,0, utilizando quantidades de fármaco equivalentes a 3 vezes a dose presente na forma farmacêutica em 900 ml de meio de dissolução.

#### **4.2.4.2 Avaliação da estabilidade nos meios**

A estabilidade de rabeprazol sódico nos meios de dissolução foi avaliada preparando-se soluções a partir dos comprimidos em 3 meios de dissolução: tampão

---

---

fosfato de potássio pH 6,8, tampão fosfato de potássio pH 7,5 e tampão borato pH 9,0 (1 comprimido para cada meio). Essas soluções foram mantidas em temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) e monitoradas por 2 horas através de CLAE.

As soluções preparadas em tampão borato pH 9,0 e diluídas em acetonitrila para análise por CLAE, foram monitoradas por 11 horas.

#### **4.2.4.3 Avaliação da especificidade**

Para avaliação da especificidade do teste, uma mistura placebo contendo os excipientes presentes na formulação em suas concentrações usuais, foi preparada e quantidades equivalentes a um comprimido foram transferidas para cubas contendo 900 ml de meio de dissolução. A agitação do meio foi promovida por 2 horas a 150 rpm, utilizando o aparato pá e temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C. Alíquotas desta solução foram filtradas e analisadas por CLAE e espectrofotometria UV.

#### **4.2.4.4 Curva Padrão**

Para construção da curva padrão, preparou-se uma solução de rabeprazol sódico SQR na concentração de 100 µg/ml utilizando a mistura de acetonitrila-tampão borato pH 9,0 (50:50 v/v) como diluente. A partir desta solução, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, obtendo-se soluções com concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 10,0 e 20,0 µg/ml ao completar o volume com o diluente. Para cada concentração de análise, foram preparadas soluções em triplicata, sendo efetuadas três determinações por solução.

##### **4.2.4.4.1 Cálculos para a curva padrão**

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração *versus* área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a ANOVA foi realizada para verificação da linearidade do método.

---

---

#### **4.2.4.5 Precisão**

A repetibilidade foi avaliada pela análise dos valores de desvio padrão relativo (DPR) dos dados obtidos da curva padrão. A precisão intermediária foi analisada através dos resultados obtidos na dissolução em dias diferentes, com analistas diferentes, utilizando um lote com uniformidade de conteúdo avaliada.

#### **4.2.4.6 Exatidão**

Conforme a guia do ICH (1996a), a exatidão foi inferida a partir dos dados de linearidade, especificidade e precisão.

#### **4.2.4.7 Quantidade dissolvida na etapa ácida**

A fim de determinar a quantidade de rabeprazol sódico dissolvida nesta etapa, os comprimidos foram removidos após duas horas e seu doseamento foi realizado através de CLAE.

#### **4.2.4.8 Determinação do perfil de dissolução**

Após duas horas em meio ácido, os comprimidos foram transferidos para o meio básico, nas condições descritas na Tabela 4.33. Conforme os tempos de coleta, alíquotas de 10 ml eram retiradas e volumes iguais de meio de dissolução eram repostos a fim de manter o mesmo volume total. As amostras foram filtradas usando membranas de nylon com 0,45 µm, diluídas em acetonitrila a concentração de 11,0 µg/ml e analisadas por CLAE.

#### **4.2.4.9 Resultados**

A avaliação das condições *sink* para rabeprazol sódico demonstrou que o fármaco era solúvel em tampão fosfato pH 6,8, em tampão fosfato pH 7,5 e em

---

tampão borato pH 9,0. Entretanto, a solução em pH 6,8 tornou-se amarela em poucos minutos, enquanto que em pH 7,5 tornou-se esverdeada dentro de uma hora, indicando a baixa estabilidade do fármaco nestes meios.

A Figura 4.23 apresenta o gráfico de decaimento de rabeprazol sódico nas duas primeiras horas de avaliação de sua estabilidade nos meios de dissolução. Observa-se que em pH 6,8, o fármaco degrada em torno de 30% na primeira hora, enquanto que em pH 7,5 a degradação é de 13,4% no mesmo período. Em pH 9,0, o fármaco demonstrou ser mais estável.

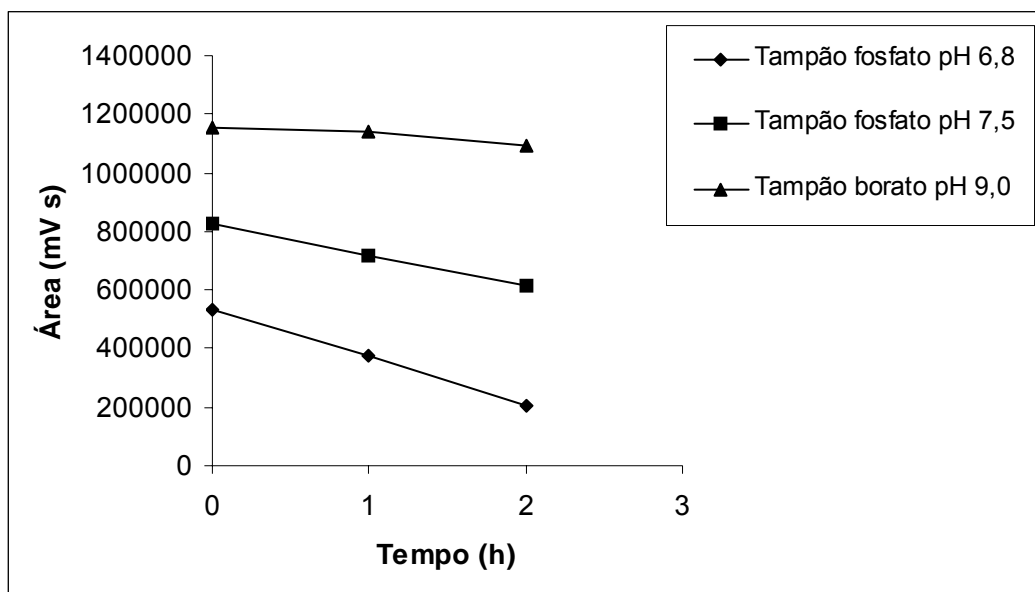


Figura 4.23 - Perfil de decaimento de rabeprazol sódico nas duas primeiras horas de avaliação de sua estabilidade nos meios de dissolução: (♦) Tampão fosfato pH 6,8; (■) Tampão fosfato pH 7,5; (▲) Tampão borato pH 9,0.

A avaliação da estabilidade das soluções coletadas do teste de dissolução e diluídas em acetonitrila para doseamento, por 11 horas, está representada na Figura 4.24.

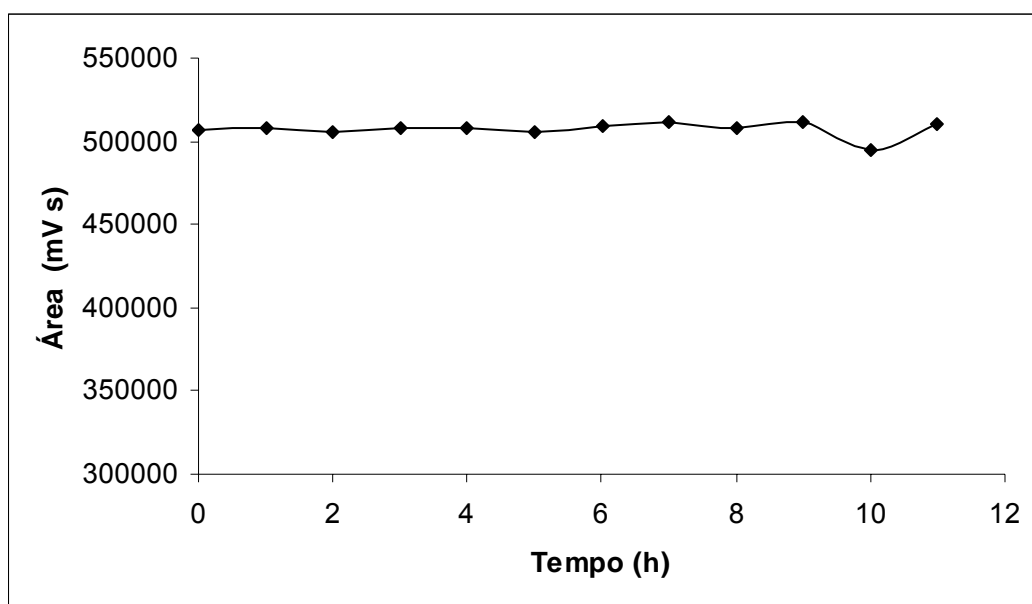


Figura 4.24 - Perfil de decaimento de rabeprazol sódico na mistura tampão borato pH 9,0 e acetonitrila (50:50 v/v) por CLAE.

O cromatograma e o espectro UV referentes à avaliação da especificidade estão representados nas Figuras 4.25 e 4.26, respectivamente.

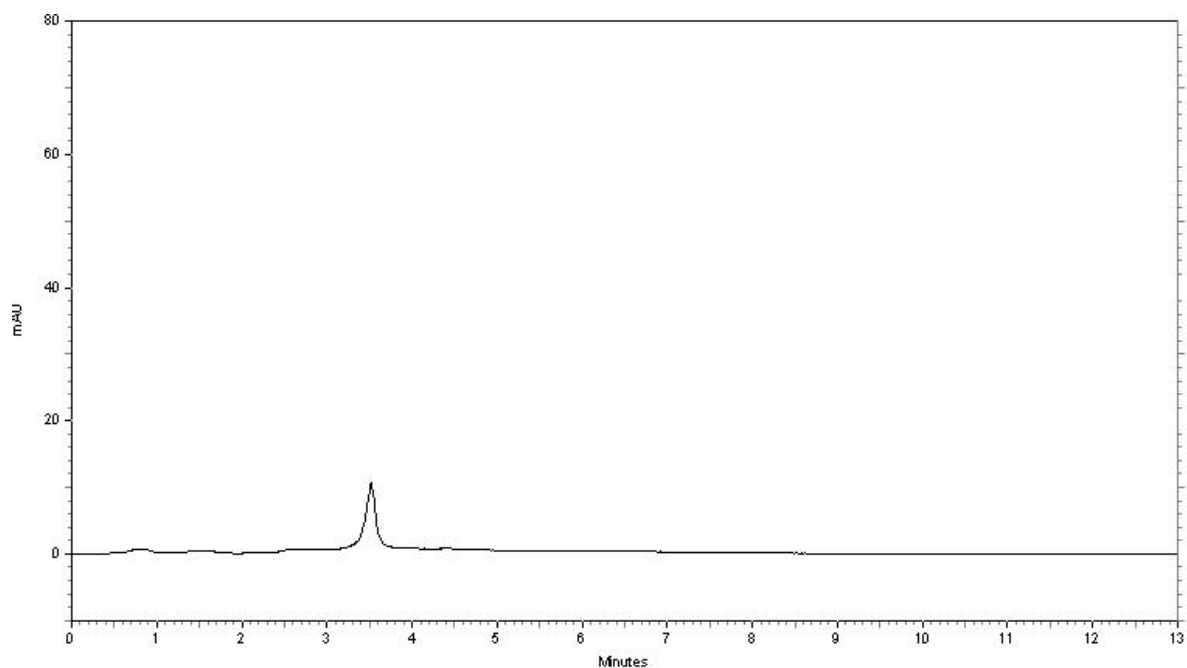


Figura 4.25 - Cromatograma da amostra placebo, em tampão borato pH = 9,0.

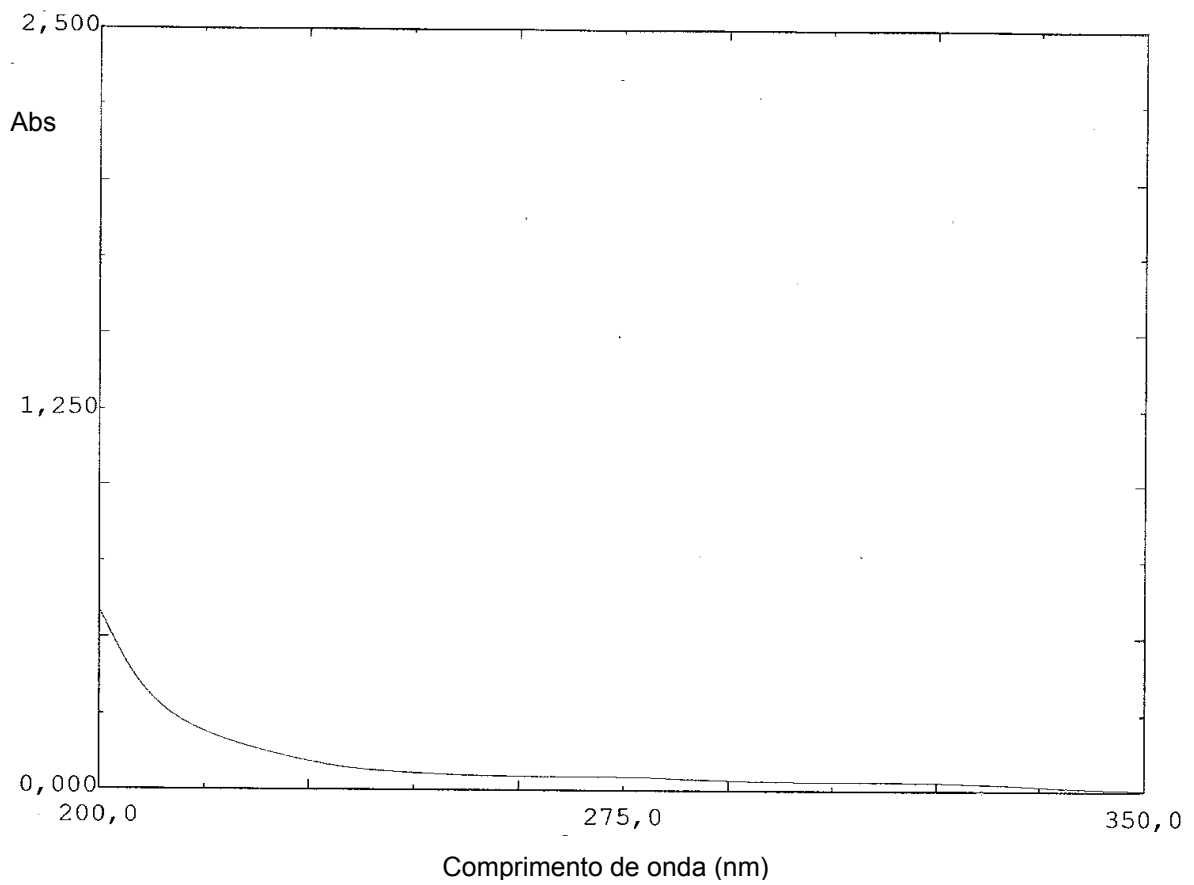


Figura 4.26 – Espectro UV da solução placebo, em tampão borato pH = 9,0.

Os valores das áreas absolutas referentes às concentrações analisadas na curva padrão para o teste de dissolução estão descritos na Tabela 4.29.

---

Tabela 4.29 – Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão por CLAE para o teste de dissolução de comprimidos de rabeprazol sódico.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Áreas absolutas*	Área média $\pm$ e.p.m.	DPR
1,0	40095,67	40221,39 $\pm$ 574,59	2,47
	39295,00		
	41273,50		
2,0	79893,33	80406,67 $\pm$ 555,18	1,19
	79810,67		
	81516,00		
4,0	163618,00	163654,89 $\pm$ 150,29	0,15
	163931,67		
	163415,00		
5,0	203197,67	205290,11 $\pm$ 1358,89	1,14
	204834,33		
	207838,33		
10,0	408648,00	413409 $\pm$ 2382,54	0,99
	415960,33		
	415618,67		
20,0	828286,00	831815,33 $\pm$ 1768,85	0,37
	833369,33		
	833790,67		

\* cada valor é média de três determinações

e.p.m. = erro padrão da média

DPR = desvio padrão relativo

A Figura 4.27 ilustra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ).

Os valores encontrados na ANOVA para avaliação da linearidade estão indicados na Tabela 4.30.

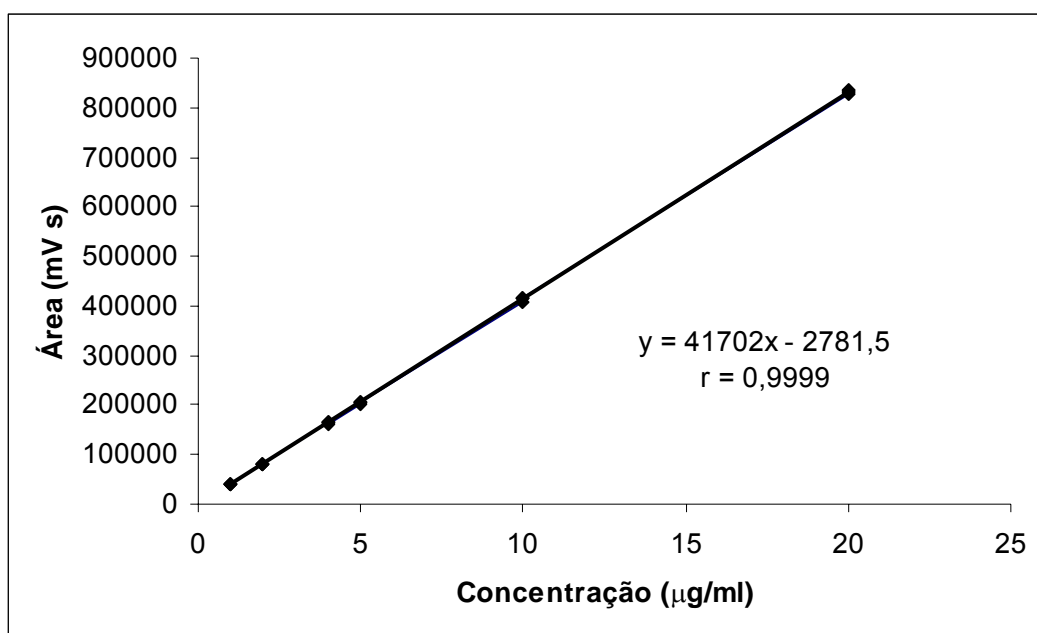


Figura 4.27 - Representação gráfica da curva padrão por CLAE para o teste de dissolução comprimidos de rabeprazol sódico.

Tabela 4.30 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do teste de dissolução por CLAE para comprimidos de rabeprazol sódico.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
<b>ENTRE</b>	5	$1,3147 \times 10^{12}$	$2,6294 \times 10^{11}$	46486,42*
- regressão linear	1	$1,3147 \times 10^{12}$	$1,3147 \times 10^{12}$	232430,49*
- desvio de linearidade	4	9201936,65	2300484,16	0,406
<b>RESÍDUO</b>	12	67877369,03	5656447,42	
<b>TOTAL</b>	17	$1,3148 \times 10^{12}$		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

A avaliação da repetibilidade do método demonstrou que os valores de DPR para os dados da curva padrão estão entre 0,15 e 2,47, considerados baixos (Tabela 4.29). Da mesma forma, os valores de DPR para percentagens de dissolução, em dias diferentes, com analistas diferentes, estavam abaixo de 5% para valores acima de 85% de dissolução (DPR = 0,96; 0,35 e 0,18 para os tempos 30, 45 e 60 minutos, respectivamente).



---

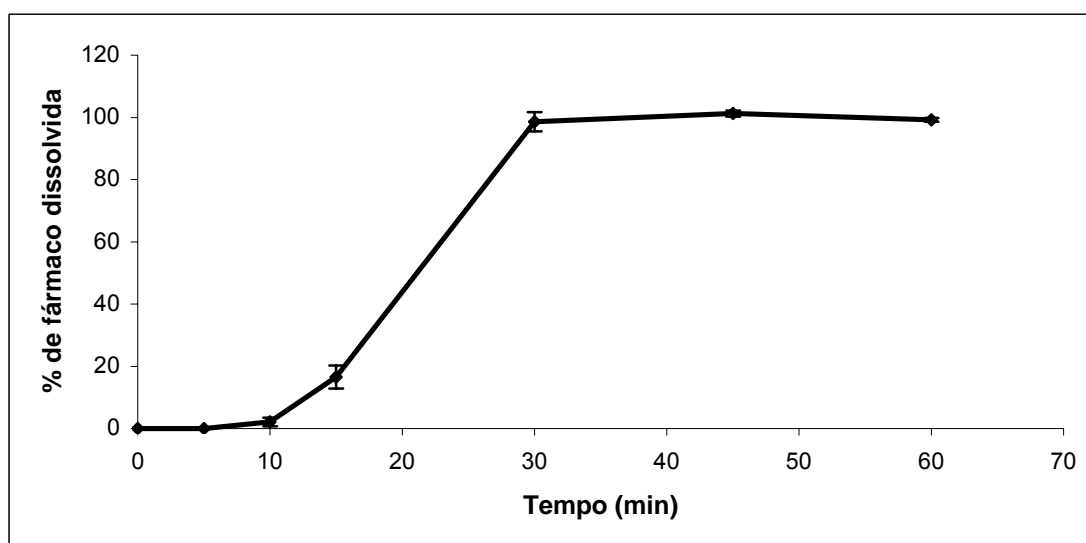
O teor residual médio de rabeprazol encontrado nos comprimidos da etapa ácida foi de 98,05%, com DPR = 1,18. O resultado indica que o revestimento oferece boa proteção à integridade da formulação em meio ácido.

As quantidades de rabeprazol, dissolvidas em cada tempo de coleta, e os valores de DPR estão listados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31 - Quantidade de rabeprazol sódico dissolvida no teste de dissolução (n = 12), usando tampão borato pH 9,0 como meio e velocidade de 75 rpm (pás).

Tempo (minutos)	% fármaco dissolvida	DPR
0	0	0
5	0	0
10	2,14	68,10
15	15,01	25,98
30	98,65	3,27
45	101,26	1,00
60	99,21	0,66

O perfil de dissolução obtido está representado na Figura 4.28.



.Figura 4.28 - Perfil de dissolução de comprimidos revestidos de rabeprazol sódico (n = 12) usando tampão borato pH 9,0 como meio e velocidade de 75 rpm (pás).

---

---

#### 4.2.4.10 Discussão

O teste de dissolução é apontado como uma importante ferramenta para a caracterização de um produto na área farmacêutica. O mesmo fornece informações úteis tanto na pesquisa e desenvolvimento como na produção e controle de qualidade de formas farmacêuticas (MARQUES e BROWN, 2002). Além de demonstrar a equivalência lote-a-lote, o teste é uma exigência para o registro de novos produtos e um parâmetro essencial a ser avaliado em um protocolo de controle de qualidade (ANSEL *et al.*, 1999; FURLANETTO *et al.*, 2003; FROST, 2004).

Apesar de não ter sido encontrada a classificação de rabeprazol no Sistema de Classificação Biofarmacêutico, pode-se inferir que o fármaco seja Classe III, visto que apresenta uma alta solubilidade e biodisponibilidade de 52%. Neste caso, a análise poderia ter sido realizada em apenas um ponto (FDA, 1997). Entretanto, como não havia dados sobre o teste de dissolução para os comprimidos contendo rabeprazol, optou-se por realizar o perfil de dissolução, a fim de conhecer as informações geradas a partir do teste desenvolvido.

Para o desenvolvimento do teste de dissolução, é necessário considerar a solubilidade do fármaco no meio de dissolução, bem como sua estabilidade no mesmo. Considerando que os meios de dissolução usuais para comprimidos de liberação modificada são tampão fosfato pH 6,8 e tampão fosfato pH 7,5, estes meios foram testados, juntamente com um de pH mais alto, tampão borato pH 9,0. Apesar de rabeprazol ter demonstrado ser solúvel nos três meios, aqueles com pH 6,8 e 7,5 parecem não manter a estabilidade do fármaco, enquanto que em pH 9,0, a degradação é mínima. Mesmo tratando-se de um valor de pH não-fisiológico, esta condição foi necessária a fim de não haver a degradação do fármaco durante o teste. De acordo com MARQUES e BROWN (2002), a faixa aceitável para a estabilidade da solução é de 98 a 102%.

O trabalho de FARINHA e colaboradores (2000) descreve o estudo da dissolução para o fármaco omeprazol, no qual também foi necessário trabalhar com pH elevado (8,0), a fim de manter a estabilidade da substância durante o teste.

---

---

O teste de estabilidade das soluções coletadas do meio pH 9,0 e diluídas em acetonitrila demonstrou que o fármaco é estável por, pelo menos, 11 horas (Figura 4.24).

A análise da especificidade demonstrou que o método por CLAE não sofre a interferência dos excipientes da formulação, uma vez que não há outros picos no cromatograma, além daquele referente ao tampão. A ferramenta *peak purity* também demonstrou que o pico de rabeprazol está 100% puro. Por outro lado, o método de espectrofotometria no ultravioleta não foi específico para esta determinação, pois os excipientes absorvem no comprimento de onda de análise (282 nm), mesmo após filtração em membrana de 0,45 µm. Este fato pode ser atribuído à dissolução dos excipientes no meio por ação da temperatura e da agitação. A aplicação da técnica de espectrofotometria UV derivada seria uma alternativa adequada para contornar este problema.

A velocidade de agitação foi selecionada de acordo com faixa recomendada para pás (50-75 rpm) (USP, 2004; FDA, 1997). Considerando que os resultados obtidos nos testes preliminares com 75 rpm foram satisfatórios, não foram testadas outras velocidades. Os filtros também foram avaliados e a membrana de 0,45 µm foi escolhida.

A avaliação da linearidade do método foi realizada através da construção de uma curva padrão, na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas no mesmo dia, sendo evidenciada uma correlação linear entre as áreas médias obtidas e a concentração de rabeprazol sódico SQR. O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação de reta  $y = 41702,6 x - 2789,07$ , com coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9999. Os resultados da ANOVA demonstraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio da linearidade, o que confirma a linearidade do método.

Através da análise dos baixos valores de DPR, obtidos para os dados da curva padrão, e para as percentagens de dissolução obtidas em dias diferentes, foi possível observar a repetibilidade e a precisão intermediária do método.

Tendo em vista os resultados satisfatórios para os parâmetros linearidade, especificidade e precisão, a exatidão pôde ser inferida e considerada adequada.

---

---

Outra possibilidade descrita nas guias (ICH, 2005) é a realização do teste de recuperação nas cubas.

Para o teste de dissolução de comprimidos com revestimento gastrorresistente, é importante realizar uma etapa inicial ácida, a fim de verificar a influência do pH ácido sobre a integridade da formulação. No caso de rabeprazol, a quantidade da substância que eventualmente fosse liberada seria rapidamente degradada. Assim, foi necessário remover e analisar os comprimidos provenientes da etapa ácida, antes de executar o teste completo. Considerando que o teor médio encontrado no teste de uniformidade de conteúdo foi de 105,5% (DPR = 1,92), a perda na etapa ácida foi de aproximadamente 7,5% (menor que 10%, conforme F. Bras. IV ed). Os resultados encontrados indicaram que o revestimento oferece boa proteção à substância ativa.

O perfil de dissolução obtido para os comprimidos contendo rabeprazol sódico foi satisfatório. Após 30 minutos, mais de 95% do fármaco estava dissolvido no meio. A análise de um ou mais pontos entre os tempos 15 e 30 minutos seria interessante, a fim de conhecer melhor o comportamento da formulação e ser mais adequado para a comparação entre perfis. Como especificação do teste, pode ser sugerida a análise de um ponto, por exemplo, 30 minutos, onde mais de 85% do fármaco deverá estar dissolvido.

Não foi possível realizar a comparação de perfis entre formulações, pois, até o momento, existe apenas uma especialidade farmacêutica contendo rabeprazol disponível no mercado brasileiro.

---

---

### 4.3 DISCUSSÃO DO CAPÍTULO I

---

---

---

---

A validação de metodologia analítica para o rabeprazol sódico em comprimidos revestidos foi um dos objetivos gerais do presente trabalho, tendo em vista que, no início do desenvolvimento do projeto, não existiam trabalhos sobre a determinação quantitativa do fármaco na forma farmacêutica e não há, ainda, monografia oficial dessa substância ativa.

A seleção dos métodos utilizados baseou-se em questões como tempo de análise, exatidão, custo, disponibilidade e capacidade de aplicação em estudos de estabilidade. Além disso, buscaram-se métodos que fossem usualmente descritos em códigos oficiais.

Os métodos qualitativos utilizados possibilitaram a identificação de rabeprazol sódico nas amostras, sendo a cromatografia em camada delgada o mais simples e rápido.

A espectrofotometria na região do ultravioleta é uma técnica bastante utilizada devido à sua simples execução e ao baixo custo de reagentes (WATSON, 1999). Neste trabalho, foi aplicada para a identificação das amostras e quantificação do fármaco, produzindo resultados satisfatórios. Entretanto, a técnica oferece problemas de especificidade, como foi comprovado durante o desenvolvimento do método e no teste de dissolução dos comprimidos revestidos, o que limita sua aplicação em algumas condições sem a realização de um pré-tratamento das amostras.

Uma alternativa para contornar esse problema foi a utilização da espectrofotometria ultravioleta derivada, a qual também é de fácil execução, mas necessita equipamento adequado. A observação de que a filtração das amostras em membrana de 0,45 µm permitia a utilização do método por ultravioleta para o doseamento de rabeprazol na formulação, possibilitou, então, a validação dos dois métodos espectrofotométricos.

A cromatografia líquida de alta eficiência constitui-se um método bastante aplicado em razão de sua capacidade de separação e versatilidade. Entretanto, necessita de equipamento e reagentes de maior custo. O método validado neste trabalho mostrou-se adequado para a identificação e quantificação de rabeprazol sódico, inclusive no teste de dissolução (GARCIA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2006).

---

---

O método de eletroforese capilar tem apresentado grande aplicabilidade na área farmacêutica, observando-se um crescente número de trabalhos na literatura. Trata-se de uma técnica rápida e com baixa utilização de solventes, mas cujo equipamento não está acessível a todos os laboratórios de controle de qualidade. Nas condições utilizadas neste trabalho, o método foi adequado para a identificação e quantificação do fármaco na forma farmacêutica.

Não existem especificações oficiais para o teor de rabeprazol sódico nos comprimidos revestidos. Os limites preconizados pelas farmacopéias para a determinação do teor de fármacos em formas farmacêuticas encontram-se na faixa de 90,0 a 110,0 % (F. Bras. IV, 1988; USP 29, 2006). Através dos métodos estudados, os teores encontrados para as amostras encontram-se entre 99 e 104% do valor declarado, dentro dos limites usuais.

O desenvolvimento do teste de dissolução é uma etapa muito importante, considerando que o mesmo é uma ferramenta de avaliação de produtos farmacêuticos. Os dados de especificidade e estabilidade são necessários a fim de considerar qual será o método de doseamento do fármaco, no meio de dissolução. As condições estabelecidas foram adequadas e o perfil obtido considerado satisfatório. Entretanto, a análise de mais pontos seria importante, a fim de tornar mais favorável a comparação entre perfis. O teste desenvolvido supre uma necessidade, visto que não havia método de dissolução descrito na literatura para os comprimidos contendo rabeprazol.

Cabe salientar que para a validação dos métodos propostos neste trabalho, houve a necessidade de utilização da substância química de referência, a qual foi caracterizada por espectrofotometria no infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e de correlação, dados estes importantes para futuros estudos de estabilidade.

---



---

#### **4.4 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO I**

---

---

---

- 
- A análise por espectrofotometria no infravermelho e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, de carbono, juntamente com espectros de correlação, permitiram a caracterização do rabeprazol sódico;
  - Os métodos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar são adequados para a identificação de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos;
  - Os métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta e ultravioleta derivada de 1ª ordem foram validados adequadamente para a determinação quantitativa do fármaco, apresentando especificidade, linearidade, precisão e exatidão;
  - O método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado e mostrou-se linear, preciso, exato, sensível, específico e robusto;
  - O método por eletroforese capilar foi validado para o doseamento de rabeprazol sódico na forma farmacêutica, demonstrando ser linear, preciso, exato, específico e sensível;
  - O teste de dissolução dos comprimidos revestidos contendo rabeprazol sódico foi desenvolvido e validado e o perfil de dissolução obtido foi considerado satisfatório.
-

---

---

---

---

## 4.5 PUBLICAÇÕES

---

---

---

---

## New Liquid Chromatographic Method for Determination of Rabeprazole Sodium in Coated Tablets

CÁSSIA V. GARCIA, CLÉSIO S. PAIM, and MARTIN STEPPE

Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga, 2752.Lab.. 402 Porto Alegre/RS CEP 90610-000, Brazil

Rabeprazole sodium is a proton pump inhibitor that covalently binds and inactivates the gastric parietal cell proton pump ( $H^+/K^+$  ATPase). Little has been published about the quantitative determination of this drug. The aim of this research was to develop a new liquid chromatographic method for quantitative determination of rabeprazole in coated tablets. The system consisted of a Hypersil Keystone Betabasic C8 column (250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m particle size), an isocratic acetonitrile–water (35 + 65) mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, and a diode array detector set at 282 nm. The following validation parameters were evaluated: linearity, precision, accuracy, specificity, detection and quantitation limits, and robustness. The method showed good linearity in the concentration range of 10–70  $\mu$ g/mL. The quantitation limit was 2.43  $\mu$ g/mL, and the detection limit was 0.80  $\mu$ g/mL. The intra- and interday precision data showed that the method has good reproducibility (relative standard deviation = 1.03). Accuracy and robustness were also evaluated, and the results were satisfactory. The mean recovery was 101.61%. The analysis of a placebo mixture demonstrated the method is also specific.

Rabeprazole ( $\pm$ )-sodium 2-[[4-(3-methoxypropoxy)-3-methylpyridin-2-yl]methylsulfinyl]-1H-benzimidazole is a proton pump inhibitor that covalently binds and inactivates the gastric parietal cell proton pump ( $H^+/K^+$  ATPase). It has proven efficacy in healing, symptom relief, and prevention of relapse of gastric ulcer, duodenal ulcer, and gastro-oesophageal reflux disease (1). In addition, it has a great activity against *Helicobacter pylori*, an organism strongly associated with peptic ulcer disease, through different mechanisms not well understood (2, 3). The structural formula is given in Figure 1.

This drug is not present in any pharmacopoeia, and few publications address its determination. Of these references,

3 describe liquid chromatography (LC) methods for analysis of rat and dog plasma (4–6), and only one describes spectrophotometric and chromatographic methods for determination of rabeprazole in the presence of its degradation products (7). A screening method using nonaqueous capillary electrophoresis for purity analysis of the pyridinyl- methyl-sulfinyl-benzimidazoles, including rabeprazole, was also published (8).

Considering the relative instability of this drug under acid conditions and the few publications concerning quantitative methods for pharmaceutical dosage forms, it is important to study, develop, and validate new methods to be used for quality control and to increase safety for the patients that use this therapy. The present paper reports the development and validation of a new LC method for determination of rabeprazole sodium in coated tablets.

### Experimental

#### Chemicals

(a) *Rabeprazole sodium*.—Reference standard was supplied by Janssen-Cilag (São Paulo, Brazil).

(b) *Pariet<sup>®</sup> coated tablets, containing 10 mg rabeprazole sodium*.—Obtained commercially.

(c) *Pharmaceutical form excipients*.—Reported by the manufacturer, were mannitol, hydroxypropyl cellulose, magnesium oxide, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate, ethylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, diacetylated monoglycerides, talc, titanium dioxide, carnauba wax, and ferric oxide (red) as a coloring agent. All were obtained from different local distributors.

(d) *Acetonitrile*.—Used for preparation of the mobile phase and as a diluent; LC grade (Merck, Darmstadt, Germany).

(e) *Water*.—Purified using a Millipore<sup>®</sup> system.

(f) *Filter*.—All solutions were filtered using a 0.45  $\mu$ m nylon filter (MFS, São Paulo, Brazil).

#### Instrumentation and Analytical Conditions

(a) *Liquid chromatograph*.—Shimadzu (Kyoto, Japan); consisted of a series LC 10 AD VP pump, SCL-10A VP system controller, autosampler, CTO-10AC VP column oven, and SPD-M10A diode array detector (set at 282 nm).

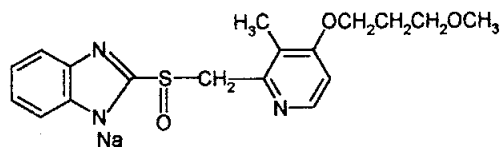


Figure 1. Structural formula of rabeprazole sodium.

(b) *LC column*.—Thermo Hypersil Keystone (Winsford, UK) Betabasic C8 (250 × 4.6 mm, 5 μm particle size), endcapped.

(c) *Software*.—Data acquisition was performed on Class-VP software, Version 6.12 (Shimadzu).

(d) *Mobile phase*.—Prepared daily by mixing acetonitrile and water in a volume ratio of (35 + 65), filtered by using a 0.45 μm nylon filter, and degassed by helium gas flow. Mobile phase flow rate, 1.0 mL/min; column oven temperature, 30° ± 1°C; and injection volume, 20 μL.

#### Validation Protocol

The proposed method was validated according to International Conference on Harmonization (ICH; 9), AOAC INTERNATIONAL (10), and U.S. Pharmacopoeia (USP; 11) guidelines.

(a) *Linearity*.—The standard curve was prepared by taking aliquots of a 125 μg/mL solution of rabeprazole sodium reference standard and diluting with acetonitrile to obtain final concentrations of 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, and 70.0 μg/mL. Each solution was prepared in triplicate. The linearity was evaluated by linear regression analysis that was calculated by the least-square regression method.

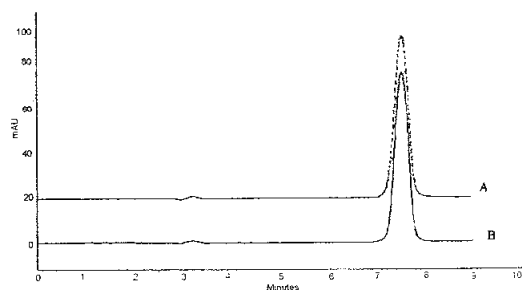


Figure 2. Chromatogram of rabeprazole sodium (40 μg/mL) in acetonitrile. (A) Reference substance, (B) commercial sample. Chromatographic conditions: column, Hypersil Keystone Betabasic C8 (250 × 4.6 mm; 5 μm); mobile phase, acetonitrile–water (35 + 65); flow rate, 1.0 mL/min; injection volume, 20.0 μL; detection, 282 nm; and temperature, 30° ± 1°C.

Table 1. Suitability test parameters of the liquid chromatographic method for determination of rabeprazole

Parameter	Mean
Retention time	7.52
Theoretical plates	3.49 × 10 <sup>3</sup>
Capacity factor	4.80
Asymmetry	0.98

(b) *Precision*.—Five tablets were transferred to a 200 mL volumetric flask containing 20 mL water at pH 10.2 (adjusted with ammonium hydroxide) and ultrasonicated for 20 min. Then acetonitrile was added into the flask to obtain a concentration of 250 μg/mL. This solution was passed through a paper filter and diluted to reach a final concentration of 40 μg/mL. Six solutions of 40 μg/mL were prepared each day. The procedure was repeated over 3 days in order to evaluate the interday precision by calculation of the relative standard deviation (RSD).

(c) *Accuracy*.—To evaluate the accuracy of the proposed method, a recovery test was performed. This test consisted of analyzing test solutions prepared as sample solutions [section (b)], but also containing known amounts of rabeprazole sodium reference standard. To each 25 mL volumetric flask containing 4 mL 250 μg/mL sample solution, an aliquot of 2.5, 5.0, or 7.5 mL 100 μg/mL rabeprazole sodium reference standard solution was added to give final concentrations of 50.0, 60.0, and 70.0 μg/mL, respectively. Each solution was prepared 3 times.

(d) *Quantitation and detection limits*.—Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated from

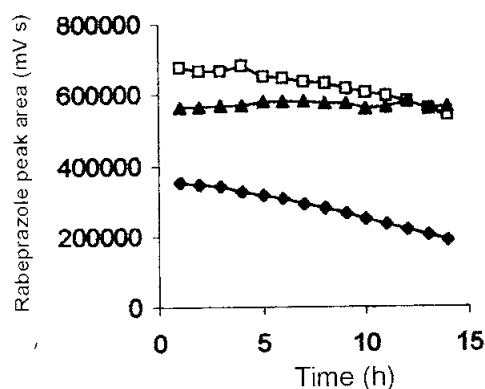


Figure 3. Profile of rabeprazole in different solvents used for its determination by liquid chromatography. Water (♦), water + dibutylamine (◻), and acetonitrile (▲).



**Table 2. Analysis of variance of the data obtained from the standard curve of rabeprazole**

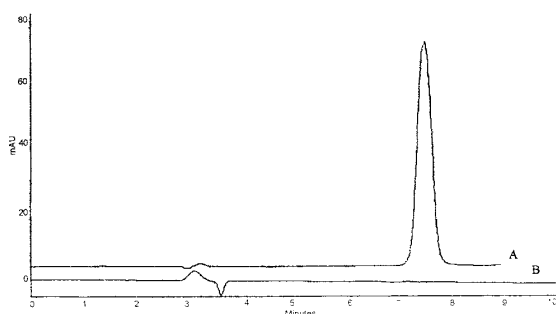
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean squares	F
Between	6	$1.181 \times 10^{13}$	$1.968 \times 10^{12}$	75.50 <sup>a</sup>
Regression	1	$1.1806 \times 10^{13}$	$1.1806 \times 10^{13}$	452.83 <sup>a</sup>
Deviation	5	$3.40 \times 10^9$	$6.80 \times 10^8$	0.026
Within	14	$3.65 \times 10^{11}$	$2.607 \times 10^{10}$	
Total	20	$1.217 \times 10^{13}$		

<sup>a</sup> Significant at  $P < 0.05$ .**Table 3. Results of intra- and interday precision analysis of rabeprazole sodium 40 µg/mL**

Sample	Amount relative to target concentration, % <sup>a</sup>				RSD
	1st day	2nd day	3rd day	Interday	
1	103.53	103.19	103.90		
2	104.94	103.67	103.00		
3	104.45	103.83	107.61		
4	103.54	103.53	105.34	104.06	1.03
5	103.29	104.10	104.08		
6	103.23	103.85	103.16		
Mean	103.83	103.69	104.68		
RSD	0.67	0.30	1.54		

<sup>a</sup> Mean of 3 determinations.**Table 4. Values obtained in the recovery test for rabeprazole sodium**

Amount of reference substance added, µg	Amount of reference substance found, µg	Recovery, %	Mean
10.00	10.19	101.90	
20.00	20.26	101.30	101.61
30.00	30.49	101.63	



**Figure 4.** Chromatogram of (A) rabeprazole sodium reference substance at 40  $\mu\text{g/mL}$  in acetonitrile and (B) placebo mixture in acetonitrile. Chromatographic conditions as in Figure 2.

the standard deviation (SD) of response and slope of the curve (S) using the equations:

$$\text{LOD} = 3.3 (\text{SD/S}) \text{ and } \text{LOQ} = 10 (\text{SD/S})$$

(e) *Specificity.*—Specificity was evaluated by analysis of a mixture containing all of the excipients of the pharmaceutical formulation. An amount of mixture equivalent to 5 tablets was weighed and transferred to a 200 mL volumetric flask with 20 mL water (pH 10.2). The preparation of the test solution was the same described in section (b).

(f) *Robustness.*—In order to evaluate the robustness of the method, small changes in the chromatographic conditions were made, such as pH (7.3 to 8.6) and percentage of acetonitrile (35 to 37 and 33%). Equipment changes were also made (Shimadzu LC-10 A, C-R6A integrator, SPD 10 A UV-Vis detector, and manual injection).

## Results and Discussion

During the development of this method, different compositions of mobile phase were tested. They included water–methanol, as used in a previous publication (7), acetonitrile–phosphate buffer, and acetonitrile–water, all of them in different volume proportions. Acetonitrile–water (35 + 65) proved to be best because it resulted in a good retention time (ca 7.5 min) and a satisfactory peak profile. Figure 2

shows typical chromatograms of rabeprazole sodium reference standard solution (A) and sample solution (B) at 40  $\mu\text{g/mL}$ . Different chromatographic parameters, i.e., theoretical plates, capacity factor, and asymmetry, were evaluated, and the results were satisfactory (Table 1).

Different sample diluents were also evaluated. Since the drug is soluble in water, it was thought to be the diluent of choice. However, it was observed that the drug suffered rapid degradation in water, probably because of the low pH, which causes difficulty in achieving accurate results. Also tested as diluents was water that was pH adjusted to 7.5 with dibutylamine or acetonitrile. The former decreased the degradation rate, but the drug stability did not last enough to complete the analysis. On the other hand, the latter kept the drug stable during the period of analysis. The representation of the drug profile in the different solvents tested is shown in Figure 3. After this study, it was established that the use of a small amount of water (pH 10.0) in order to disintegrate the tablets, followed by the dilution with acetonitrile, should be the sample preparation procedure.

Under the experimental conditions described, a standard plot of rabeprazole sodium was constructed, and it was found to be linear over a concentration range of 10–70  $\mu\text{g/mL}$  (correlation coefficient 0.9998). The representative linear equation was

$$y = 38061 x - 55137$$

where  $x$  is the concentration in  $\mu\text{g/mL}$  and  $y$  is the peak area in mV/s. The data were validated by analysis of variance (ANOVA), which demonstrated significant linear regression and no significant linearity deviation ( $P < 0.05$ ; Table 2).

The LOD and LOQ values were 0.80 and 2.43  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. These low values indicated the good sensitivity of the LC method.

The precision of the method was evaluated by intra- and interday analysis of 6 sample solutions. The results obtained are in Table 3. The RSD values were all less than 2.0%, which demonstrated good precision. The mean content found in tablets was 104.06%.

For evaluation of accuracy, the recovery test was performed, as described in *Validation Protocol*, (c). The excellent recoveries of standard addition amounts (Table 4) suggest that the method is accurate.

The proposed method was shown to be specific for the intended purpose. The specificity test demonstrated there was

**Table 5.** Results of the robustness test of the chromatographic method for rabeprazole determination

Parameter	pH	Modification		Equipment <sup>a</sup>
		Mobile phase acetonitrile–water (33 + 67)	Mobile phase acetonitrile–water (37 + 63)	
Retention time, min	6.5	8.9	6.4	7.6
Asymmetry	0.92	0.94	0.90	0.96

<sup>a</sup> Shimadzu LC-10 A, C-R6A integrator, SPD 10 A UV-Vis detector, and manual injection.

no interference with the drug peak (no other peak at the retention time of rabeprazole; Figure 4). Also, the peak purity index of the rabeprazole peak in the sample chromatogram was 100%.

The robustness of the method was demonstrated by the chromatograms obtained with the small variations in chromatographic conditions cited in *Validation Protocol*, (f). With these modifications, the retention time of rabeprazole sodium showed small changes, but the symmetry of the peak was conserved, indicating there was no negative effect on the analysis (Table 5).

### Conclusions

The new LC method proposed for determination of rabeprazole sodium in coated tablets was demonstrated to be simple, linear, accurate, precise, specific, and sensitive. It can be recommended for this purpose in routine quality control because there is, as yet, no official method.

### Acknowledgments

The authors wish to thank Janssen-Cilag, LCQFar, and LEPCQ. We also thank CAPES for financial support.

### References

- (1) Carswell, C., & Goa, K. (2001) *Drugs* **61**, 2327–2356
- (2) Barth, J., & Hahne, W. (2002) *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 31–33
- (3) Horn, J. (2000) *Clin. Ther.* **22**, 266–280
- (4) Takakuwa, S., Chiku, S., Nakata, H., Yuzuriha, T., Mano, N., & Asakawa, N. (1995) *J. Chromatogr. B.* **673**, 113–122
- (5) Mano, N., Oda, Y., Takakuwa, S., Chiku, S., Nakata, H., & Asakawa, N. (1996) *J. Pharm. Sci.* **85**, 903–907
- (6) Nakai, H., Shimamura, Y., Kanazawa, T., Yasuda, S., & Kayano, M. (1994) *J. Chromatogr. B* **660**, 211–220
- (7) El-Gindy, A., El-Yazby, F., & Maher, M. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**, 229–242
- (8) Tivesten, A., Folestad, S., Schönbacher, V., & Svensson, K. (1999) *Chromatographia* **49**, S7–S11
- (9) *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* (1996) Q2B: Guideline on Validation of Analytical Procedure—Methodology, ICH, Geneva, Switzerland
- (10) *Official Methods of Analysis* (2000) 17th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, p. XXVII
- (11) *U.S. Pharmacopoeia* (2003) 26th Ed., U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD

---

---

## Validation of a Capillary Electrophoresis Method for Analysis of Rabeprazole Sodium in a Pharmaceutical Dosage Form

CÁSSIA V. GARCIA, JULIANA SIPPEL, and LETICIA L. SFAIR

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, Lab. 402 -Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil

SÍLVIA S. GARCIA and ANDRÉ JABLONSKI

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, LAGEAM, Av. Osvaldo Aranha, 99, Lab.513 - Porto Alegre/RS, CEP 90035-190, Brazil

MARTIN STEPPE and ELFRIDES E.S. SCHAPOVAL

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, Lab. 402 -Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil

**Rabeprazole sodium is an antisecretory agent that inhibits the enzyme  $H^+/K^+$  ATPase present in the stomach parietal cells. There are few data about its quantitative determinations in laboratorial routines. Capillary electrophoresis is a method being used increasingly for analysis of pharmaceutical compounds, the main advantages of which are the simplicity of instrumentation, low consumption of sample and reagents, and fast analysis. The aim of this study was to develop and validate a capillary electrophoresis method for determination of rabeprazole sodium in coated tablets. The conditions used were a bare fused silica capillary with 48.0 cm length (39.5 cm effective) and 75  $\mu$ m id; a 10mM, pH 9.0, sodium tetraborate run buffer; a diode array detector set at 291 nm; hydrodynamic injection (50 mbar/5 s); and a voltage of 20 kV. HP Chemstation CE rev. A.06.03 software was used for system control, data acquisition, and analysis. The method was demonstrated to be linear in the concentration range of 5.0–40.0  $\mu$ g/mL ( $r = 0.9993$ ), precise (interday relative standard deviation = 0.49), accurate (mean recovery = 103.1%), and specific. The limits of detection and quantitation were 1.29 and 3.91  $\mu$ g/mL, respectively.**

**R**abeprazole, ( $\pm$ )-sodium 2-[[4-(3-methoxypropoxy)-3-methylpyridin-2-yl]methylsulfinyl]-1H-benzimidazole (Figure 1), is a potent inhibitor of the proton pump ( $H^+/K^+$  ATPase), which is an enzyme present in the parietal cells of stomach (1). This drug has demonstrated efficacy in healing and symptom relief of gastric and duodenal ulcers, as well as a high eradication rate of the microorganism

*Helicobacter pylori* when associated with antimicrobial therapy (2).

Literature concerning the quantitative determination of rabeprazole is relatively limited. Liquid chromatography (LC) was applied to rat and dog plasma (3–5), human plasma (6), and pharmaceutical dosage forms (7, 8). A voltammetric method was published for analysis of the drug in tablets (9), and a nonaqueous capillary electrophoresis was used in the purity investigation of pyridinyl-methyl-sulfinyl-benzimidazoles, including rabeprazole (10).

Capillary electrophoresis (CE) is a technique with distinct applicability toward the separation of compounds of different chemical character, size, and structural features (11). In pharmaceutical analysis, this separation technique is well established and shows many advantages, such as simple instrumentation, good efficacy, precision, and rapid analysis (12). When compared to LC methods, CE has low cost because the volumes of samples needed and the consumption of solvents are low. In addition, there is no need to purchase large amounts of organic solvents and to dispose of them.

The aim of this work was to develop and validate a CE method for the quantitative determination of rabeprazole sodium in coated tablets. The validation protocol followed the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH; 13), AOAC INTERNATIONAL (14), and United States Pharmacopoeia (USP; 15).

### Experimental

#### Chemicals

(a) *Rabeprazole sodium reference substance*.—Supplied by Janssen-Cilag (São Paulo, Brazil).

(b) *Pariet® coated tablets*.—Tablets containing 10 mg rabeprazole sodium were obtained commercially.

(c) *Excipients*.—The pharmaceutical form excipients in the tablet reported by the manufacturer were mannitol, hydroxypropyl cellulose, magnesium oxide, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate, ethylcellulose.

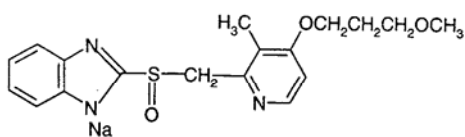


Figure 1. Structure of rabeprazole sodium.

hydroxypropyl methylcellulose phthalate, diacetylated monoglycerides, talc, titanium dioxide, carnauba wax, and ferric oxide (red) as a coloring agent. All of them were of pharmaceutical grade and obtained from Galena (São Paulo, Brazil), except hydroxypropyl cellulose, which was supplied by Denver (Cotia, Brazil) and diacetylated monoglycerides, supplied by Danisco (Cotia, Brazil).

(d) *Sodium tetraborate decahydrate*.—Analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany); used as running electrolyte.

(e) *Sodium hydroxide*.—Analytical grade (Merck); used for capillary activation.

(f) *Water*.—Purified with a Millipore (Billerica, MA) system; used to prepare all solutions.

(g) *Ammonium hydroxide*.—Analytical grade (Grupo Química, Rio de Janeiro, Brazil); used for pH adjustment of water in sample preparation.

(h) *Filters*.—All solutions were filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter (MFS, São Paulo, Brazil).

#### Preparation of Solutions and Samples

(a) *Sodium tetraborate buffer*.—An adequate amount of sodium tetraborate decahydrate was weighed, dissolved in water with heating in a water bath, and diluted to 100 mL with water in order to have a 100mM solution. The pH was adjusted to 9.0, when necessary, with 0.1M NaOH. From this solution, an aliquot of 10 mL was transferred to a 100 mL volumetric flask, diluted to volume with water, and filtered.

(b) *Rabeprazole sodium standard stock solution*.—10.0 mg of the reference substance was weighed and transferred to a 100 mL volumetric flask. It was diluted to volume with water (pH 10.0) to obtain a final concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

(c) *Sample stock solution*.—Prepared by adding 5 tablets to a 250 mL volumetric flask containing 30 mL water (pH 10.0) and ultrasonicated it for 20 min. The solution was brought to volume and filtered. The final concentration was 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### Apparatus and Conditions

The CE instrument model HP<sup>3D</sup> was purchased from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) and consisted of a diode array detector, automatic injector, and temperature control system. The apparatus was connected to a personal computer equipped with a HP Chemstation CE software (rev. A.06.03 Hewlett-Packard) used for instrument control, data acquisition, and data analysis. Sample injection was performed in a hydrodynamic mode during 5 s with a pressure of 50 mbar. The voltage during the analysis was 20 kV in ramp

(current: 30  $\mu\text{A}$ ) and the temperature was thermostatted at 25°C. The diode array detector was set at 291 nm.

The pH levels of buffer solution and water used for sample preparation were determined by a Digimed potentiometer, Model DM-20 (São Paulo, Brazil).

All separations were performed using a fused-silica capillary (Agilent, Waldbronn, Germany) of total length 48 cm (39.5 cm to the detector) and 75  $\mu\text{m}$  id. The running buffer was a 10mM sodium tetraborate at pH 9.0. At the beginning and end of the day, the capillary was flushed with 0.1M NaOH and water for 5 min each. Before each injection, the capillary was preconditioned by flushing for 1 min with 0.1M NaOH, for 2 min with water, and for 2.5 min with the electrolyte. The polyimide film was removed both from detector window and the capillary ends to avoid undesired effects on injection reproducibility.

#### Validation Protocol

(a) *Linearity*.—Appropriate aliquots of the standard stock solution of rabeprazole sodium reference substance, prepared as cited above, were transferred separately into 20 mL volumetric flasks and diluted to volume with water (pH 10.0). Concentrations ranged from 5.0 to 40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Each solution was prepared in triplicate and injected 3 times. The linearity was evaluated by linear regression analysis that was calculated by the least-squares method.

(b) *Repeatability*.—Sample solutions were prepared by taking aliquots from the sample stock solution, prepared as cited above. Aliquots of 2 mL were transferred to six 20 mL volumetric flasks, diluted to volume with water (pH 10.0), and filtered. This procedure was repeated on 3 days. The repeatability was evaluated through the relative standard deviation (RSD) obtained for 6 solutions in the same day and new solutions prepared on 3 different days.

(c) *Accuracy*.—The accuracy of the proposed method was evaluated through the recovery test. Samples solutions, prepared as cited in Section (b), were spiked by adding aliquots of 2.0, 4.0, and 6.0 mL rabeprazole sodium reference substance solution (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The final concentrations were 20.0, 30.0 and 40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

(d) *Specificity*.—The interference of the excipients present in the pharmaceutical dosage form was evaluated from a placebo solution. The quantities of each excipient were weighed according to their usual concentration stated in the

Table 1. Suitability test parameters of the capillary electrophoresis method for determination of rabeprazole in pharmaceutical dosage form

Parameter	Mean
Migration time, min	3.9
Asymmetry	1.1
Theoretical plates	115 507

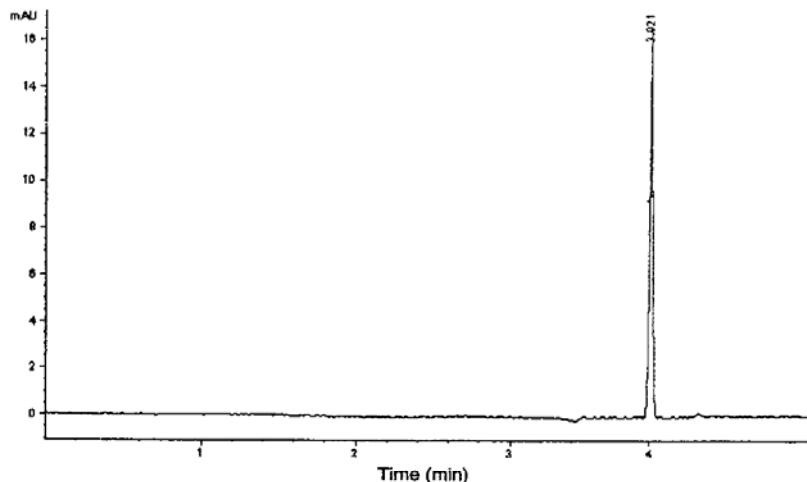


Figure 2. Electropherogram of rabeprazole sodium commercial sample (20  $\mu\text{g/mL}$ ) in water, pH 10.0. Buffer consisted of sodium tetraborate 10mM (pH 9.0), voltage of 20 kV, and UV detection at 291 nm.

literature, in order to obtain a pool. From this pool, an amount of excipients was weighed and diluted to 20  $\mu\text{g/mL}$ .

(e) *Limits of detection and quantitation.*—The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated from the standard deviation (SD) of response and the slope of the curve (S) in accordance with the equations:  $\text{LOD} = 3.3 (\text{SD}/S)$  and  $\text{LOQ} = 10 (\text{SD}/S)$  (12).

### Results and Discussion

Two main variables were tested during the development of the method: electrolyte concentration and sample solvent. The concentrations studied were 10.0 and 15.0mM sodium tetraborate, pH 9.0. The results obtained with both concentrations were satisfactory respecting peak asymmetry,

baseline stability, and current generated; however, the lower concentration resulted in a better migration time and also decreased the possibility of capillary heating.

The other parameter evaluated was the sample solvent. Water and solutions of 10.0 and 15.0mM sodium tetraborate were studied. The electrolyte solutions were not satisfactory, because they resulted in an irregular baseline (high noise), a very asymmetric peak, and an inconstant migration time for rabeprazole sodium. On the other hand, water proved to be a good solvent and gave satisfactory results. Örnskov et al. (16) discussed some strategies for determination of labile compounds, such as rabeprazole, by CE. It was cited that the labile compound should be dissolved in a stabilizing medium to minimize analyte degradation in the sample container during the CE separation sequence. As is known, rabeprazole

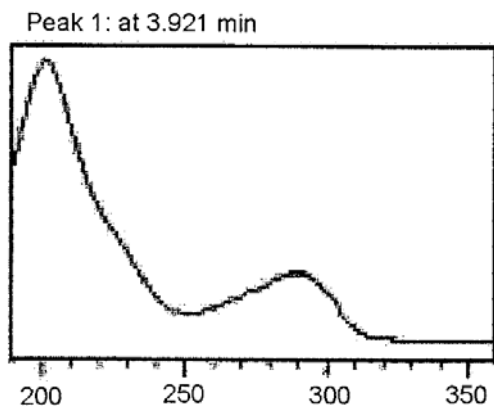


Figure 3. Illustration of the rabeprazole peak UV spectrum from 190 to 360 nm by capillary electrophoresis method using diode-array detector.

Table 2. Results of intraday and interday repeatability evaluations of the capillary electrophoresis method for rabeprazole sodium<sup>a</sup>

Sample	Amount, %			Interday	RSD
	1 <sup>st</sup> day	2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day		
1	99.30	102.13	100.90		
2	101.20	101.38	98.79		
3	103.17	100.36	101.37		
4	102.02	98.27	100.86	101.06	1.69
5	99.10	99.29	104.52		
6	103.68	101.56	101.20		
Mean	101.41	100.49	101.27		
RSD	1.89	1.47	1.82		

<sup>a</sup> Each value is mean of 3 determinations.

**Table 3. Results of recovery tests of rabeprazole sodium in pharmaceutical dosage form by capillary electrophoresis**

Amount added, $\mu\text{g/mL}$	Amount found, $\mu\text{g/mL}$	Recovery, %	Mean recovery, %
10.0	10.59	105.86	103.12
20.0	20.80	104.01	
30.0	29.83	99.46	

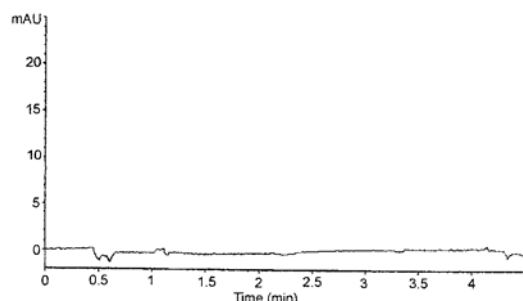
and the other pyridinyl-methyl-sulfinyl-benzimidazoles are very unstable under acid and neutral conditions. Thus, in the proposed method, it was dissolved in water with pH adjusted to a high value (pH 10.0) to minimize any analyte degradation in the vials during the analysis.

Hydrodynamic injection was preferred also because of the necessity to keep the drug stable during the analysis. This kind of injection is advantageous because the sample is injected as a plug, and the analyte is maintained in a stabilizing matrix until the effective separation starts (16).

The capillary preconditioning step was necessary in order to stabilize it and avoid the adsorption of the analyte on its walls. This also resulted in a stable and repeatable migration time (17).

Under the experimental conditions proposed, asymmetry, theoretical plates, and migration time were demonstrated to be satisfactory. These results can be seen in Table 1. A typical electropherogram of rabeprazole is shown in Figure 2. The rabeprazole peak could be identified using the diode-array detector; the rabeprazole ultraviolet (UV) spectrum obtained from 190 to 360 nm is represented in Figure 3.

The standard curve, constructed in the concentration range of 5.0 to 40.0  $\mu\text{g/mL}$ , had the regression equation  $y = 1.096x + 0.786$ , where  $y$  is the peak area in mAU and  $x$  is the rabeprazole concentration in  $\mu\text{g/mL}$ . The correlation coefficient ( $r$ ) obtained was 0.9993. These results were validated by means of analysis of variance (ANOVA), which



**Figure 4. Electropherogram of placebo solution in water, pH 10.0. Buffer consisted of sodium tetraborate 10mM (pH 9.0), voltage of 20 kV, and UV detection at 291 nm.**

gave evidence of significant linear regression and no significant linearity deviation ( $P < 0.05$ ).

The LOD and LOQ values calculated were 1.29 and 3.91  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. These values are very low and indicate the high sensitivity of the CE method described.

Table 2 shows the results of the intraday and interday repeatability evaluations. The values of RSD are low (below 2.0), which can be considered very satisfactory and demonstrate the precision of the method. The mean content found in rabeprazole tablets was 101.06% of the declared amount.

The recovery test, applied for accuracy evaluation, produced good results (Table 3). The analysis of a placebo solution demonstrated there was no interference from the tablet excipients, because no other peak was found in the electropherogram with the same migration time as rabeprazole (Figure 4).

Considering all of the advantages of the CE method and the range of options in qualitative and quantitative determinations, this work is very important for pharmaceutical analysis.

## Conclusions

The capillary electrophoresis method proposed for determination of rabeprazole sodium in coated tablets was successfully validated and demonstrated to be adequate and useful for the quality control of this pharmaceutical product.

## Acknowledgments

We thank Janssen-Cilag for the reference substance and CAPES for the financial support.

## References

- (1) Sugano, K. (2002) *J. Gastroenterol.* **37**, 233–234
- (2) Carswell, C., & Goa, K. (2001) *Drugs* **61**, 2327–2356
- (3) Takakuwa, S., Chiku, S., Nakata, H., Yuzuriha, T., Mano, N., & Asakawa, N. (1995) *J. Chromatogr. B* **673**, 113–122
- (4) Mano, N., Oda, Y., Takakuwa, S., Chiku, S., Nakata, H., & Asakawa, N. (1996) *J. Pharm. Sci.* **85**, 903–907
- (5) Nakai, H., Shimamura, Y., Kanazawa, T., Yasuda, S., & Kayano, M. (1994) *J. Chromatogr. B* **660**, 211–220
- (6) Zhang, Y., Chen, X., Gu, Q., & Zhong, D. (2004) *Anal. Chim. Acta* **523**, 171–175
- (7) El-Gindy, A., El-Yazby, F., & Maher, M. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**, 229–242
- (8) Garcia, C.V., Paim, C.S., & Steppe, M. (2004) *J. AOAC Int.* **87**, 842–846
- (9) Radi, A., Abd El-Ghany, N., & Wahdan, T. (2004) *Il Farmaco* **59**, 515–518
- (10) Tivesten, A., Folestad, S., Schönbacher, V., & Svensson, K. (1999) *Chromatographia* **49**, S7–S11
- (11) Steppe, M., Prado, M.S., Tavares, M.F., Pinto, T.J., Kedor-Hackmann, E.R., & Santoro, M.I.R. (2003) *J. AOAC Int.* **86**, 707–713



- (12) Santoro, M.I.R., Prado, M.S., Steppe, M., & Kedor-Hackmann, E.R. (2000) *Rev. Bras. Ciênc. Farmacol.* **36**, 97–110
  - (13) *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* (1996) Guideline on Validation of Analytical Procedure—Methodology, Geneva, Switzerland
  - (14) *Official Methods of Analysis*, 17th Ed. (2003) AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, p. 27
  - (15) *United States Pharmacopoeia*, 27th Ed. (2004) United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 2748
  - (16) Ørnskov, E., Linusson, A., & Folestad, S. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33**, 379–391
  - (17) Altria, K.D. (1996) *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, p. 42
-

---

---

PHARMACEUTICAL ANALYSIS

**Development and Validation of Derivative Spectrophotometric Method for Determination of Rabeprazole Sodium in Pharmaceutical Formulation**

**C. V. Garcia, J. Sippel, M. Steppe, and E. E. S. Schapoval**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, Porto Alegre, RS, Brazil

**Abstract:** The aim of this work is to develop and validate the derivative spectrophotometric method for determination of the proton pump inhibitor rabeprazole sodium in pharmaceutical formulations. The technique was applied using water (pH 10.0) as diluent. The first-order derivative spectra were obtained at  $N = 5$ ,  $\Delta\lambda = 4.0$  nm, and determinations were made at 304 nm. The method showed high specificity in the presence of formulation excipients and good linearity in the concentration range of 6.0 to 18.0  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . The intra- and interday precision data demonstrated the method has good reproducibility [Relative Standard Deviation ((RSD) = 1.0 interdays)]. Accuracy was also evaluated and results were satisfactory (mean recovery of 99.15%). The detection and quantitation limits were 0.055 and 0.17  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , respectively. The method was demonstrated to be adequate for routine analysis in quality control.

**Keywords:** Rabeprazole sodium, first-order derivative method, method validation, quality control

Received 25 June 2005; accepted 28 October 2005

The authors would like to thank LEPCQ and CAPES for financial support.

Address correspondence to Cássia V. Garcia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, Lab. 402, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: cassiavgarcia@yahoo.com.br

## 1. INTRODUCTION

Rabeprazole ( $\pm$ )-sodium 2-[[4-(3-methoxypropoxy)-3-methylpyridine-2-yl]methylsulfinyl]-1*H*-benzimidazole is a proton pump inhibitor that covalently binds and inactivates the gastric parietal cell proton pump ( $H^+/K^+$  ATPase). It has proven efficacy in healing, symptom relief, and prevention of relapse of gastric ulcer, duodenal ulcer, and gastroesophageal reflux disease (Carswell and Goa 2001). Another great activity rabeprazole has is against *Helicobacter pylori*, an organism strongly associated with peptic ulcer disease. There are several different mechanisms supposed for this, but they are not well understood (Barth and Hanne 2002; Horn 2000). Since it is an acid labile drug, it is commercialized in enteric coated tablets (Janssen-Glag 1999). The structural formula of rabeprazole sodium is given in Fig. 1.

The literature survey reveals a crescent number of publications related to rabeprazole sodium determination. For rat and dog plasma analysis, three liquid chromatographic methods were applied (Takakuwa et al. 1995; Mano et al. 1996; Nakal et al. 1994), as well as there were works for human plasma, using tandem mass spectrometry (Zhang 2004), solid-phase extraction (Ramakrishna et al. 2005), and column switching (Singh et al. 2004). For tablet analysis, there were two chromatographic methods (El-Gindy et al. 2003; Garcia et al. 2004) and a voltametric one (Radi et al. 2004). Also, capillary electrophoresis was applied for tablets in aqueous media (Garcia et al. 2005) and for bulk substance in nonaqueous media (Tivesten et al. 1999). It is important to state that rabeprazole sodium was not listed in any pharmacopoeia until this moment.

Although the work of El-Gindy et al. (2003) comprises a derivative ratio spectra method also, it is very useful for stability indication, the method proposed in this work is intended to be applied for routine analysis, since it is simple and fast and does not need sophisticated tools. The derivative technique in UV spectrophotometry tends to emphasize subtle spectral features by presenting them in a new and visually more accessible way, allowing the resolution of multicomponent analysis, and reducing the effect of spectral background interferences (Ojeda and Rojas 2004). It was employed with success for omeprazole and pantoprazole, other proton pump inhibitors, in the presence of corresponding impurities

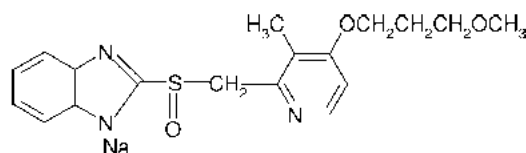


Figure 1. Chemical structure of rabeprazole sodium.

(Karljikovic-Rajic et al. 2003), and in stability studies of omeprazole (Castro et al. 1999).

The aim of this study was to develop and validate a first-order spectrophotometric method for rabeprazole sodium determination in the presence of formulation excipients. The validation procedures followed the (ICH) International Conference on Harmonization (1996) guidelines evaluating the parameters specificity, linearity, precision, detection, and quantitation limits and accuracy.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Chemicals

Rabeprazole sodium reference standard was supplied by Janssen-Cilag (São Paulo, SP, Brazil). The coated tablets (Pariet<sup>®</sup>), containing 10 mg of rabeprazole sodium, were obtained commercially. The excipients of the pharmaceutical formulation were mannitol, hydroxypropyl cellulose, magnesium oxide, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate, ethylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, diacetylated monoglycerides, talc, titanium dioxide, carnauba wax, and ferric oxide (red) as a coloring agent. All of them were obtained from different local distributors. Water was purified using the Millipore<sup>®</sup> system and its pH was adjusted to 10.0 with ammonium hydroxide analytical grade (Grupo Química, Rio de Janeiro, Brazil).

### 2.2 Apparatus and Conditions

A Shimadzu UV-160A double-beam spectrophotometer with 1 cm quartz cells and data processing capacity was used. The first-order derivative spectra were obtained over the 200–400 nm range and  $N = 5$ ,  $\Delta\lambda = 4.0$  nm. The determinations were made at 304 nm ( $^1D_{304}$ ).

The Digimed potentiometer, model DM-20 (São Paulo, Brazil) was used to determine the water pH before the preparation of all solutions.

### 2.3 Validation protocol

#### Specificity

The specificity of the method was evaluated through the analysis of a placebo solution, which was prepared with the excipients of the pharmaceutical formulation in their usual concentration.

#### Linearity

Aliquots of a  $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  solution of rabeprazole sodium reference standard were transferred to 25 mL volumetric flasks to obtain the final concentrations of 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, and  $18.0 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Each solution was prepared in triplicate. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

#### Precision

Five tablets were transferred to a 500 mL volumetric flask containing 50 mL of water with a pH of 10.0 and shaken for 20 minutes in an ultrasonic bath. The volume was completed with the same solvent. The solution was filtered and diluted to  $12 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . New solutions were prepared in 3 days for interday precision evaluation.

#### Accuracy

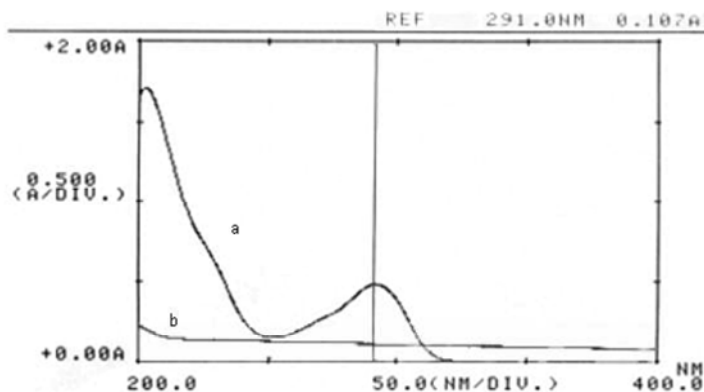
The accuracy of the method was evaluated through the recovery test. From a rabeprazole sodium standard solution of  $25 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , aliquots of 2.0, 4.0, and 6.0 mL were taken and transferred to 25 mL volumetric flasks containing 3.0 mL of the sample solution at  $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  (prepared as cited in the Precision section). The volume was completed with water that had a pH of 10.0, obtaining the final concentrations of 14.0, 16.0, and  $18.0 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ , respectively. Each solution was done in triplicate.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

In the beginning of the development of this method, different solvents were tested, such as water, methanol, and ethanol. Water was considered the best since it had a great capability to disintegrate the tablets and the absorbance of the aqueous solutions of rabeprazole was high. Besides, it does not offer toxicological risks and does not demand residue storage. The adjustment in pH was necessary because rabeprazole sodium is unstable under acid conditions.

In order to choose the optimal conditions for the derivative method, different orders were tested, as well as different N (experimental points as smoothing function). The first-order demonstrated to be adequate and  $N = 5$  the condition that allowed high amplitude and good spectra profile. Values of N higher than 5 produced noisy spectra and distorted the spectral resolution. The derivative wavelength difference ( $\Delta\lambda$ ) originated from this combination was 4.0 nm, according to the equipment used.

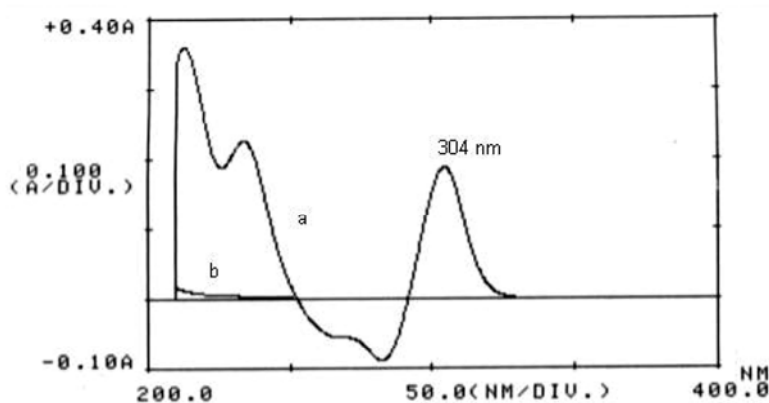
The UV spectra of rabeprazole sodium and placebo solution are represented in Fig. 2. It is possible to observe the well-defined peak at 291 nm



**Figure 2.** UV spectra of rabepazole sodium reference standard (a) and placebo (b), both in water (pH 10.0), concentration of  $12 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ .

and the interference of the placebo solution at this wavelength. It means that the zero order UV spectrophotometric method cannot be used to analyze the pharmaceutical dosage form without another tool. On the other hand, the first-order spectrum (Fig. 3) did not suffer any interference at the determination wavelength (304 nm), as expected. Compared with conventional spectrophotometric determinations, derivative spectrophotometry has proved to be of great value in eliminating the interference from excipients and co-formulated drugs (Ojeda and Rojas 2004).

The results from linearity (regression equation, correlation coefficient) are demonstrated in Table 1. The data was validated by means of analysis of



**Figure 3.** First-order derivative spectra of rabepazole sodium reference standard (a) and placebo (b) in water (pH 10.0) at concentration of  $12 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ .  $N = 5$ ,  $\Delta\lambda = 4.0 \text{ nm}$ .

**Table 1.** Results of standard curve of first-order derivative spectrophotometric method for rabeprazole sodium determination

Feature	$^1D_{304}$
Regression equation	$y = 0.0103x + 0.0022$
Correlation coefficient (r)	0.9997
Linear range ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	6.0 18.0

variance (ANOVA), which demonstrated significant linear regression and nonsignificant linearity deviation ( $P < 0.05$ ). From this data [standard deviation (SD) of response and slope curve (S)], it was possible to calculate the detection and quantitation limits (ICH 1996). The results found were  $\text{LOD} = 0.055 \mu\text{g/mL}^{-1}$  and  $\text{LOQ} = 0.17 \mu\text{g/mL}^{-1}$ . These low values indicated the good sensitivity of the method proposed.

The determinations of commercial samples showed good reproducibility, with  $\text{RSD} = 1.0$  for  $^1D_{304}$ , in 3 days. The results obtained each day are presented in Table 2. All values for relative standard deviation are below 2.0. The mean amount of rabeprazole found was 99.5%.

The evaluation of accuracy of the method, made through the recovery test, showed it is accurate, with mean recovery of 99.15% for  $^1D_{304}$  (Table 3).

Considering that chromatographic methods are more expensive, time consuming, and need more steps, the proposed spectrophotometric method is adequate for routine analysis and much cheaper. It is a safe alternative for quality control of rabeprazole sodium in coated tablets. Another important application could be in dissolution studies, which need rapid and accurate results.

It is important to conduct the development of this kind of method with precaution and respect the issues present in international guidelines in order to avoid errors. In this work, problems concerning reproducibility were not found, but the analyst has to give attention to this matter. According to Karpinska (2004), the main disadvantage of the derivative method is the low reproducibility.

**Table 2.** Determinations of commercial samples of rabeprazole sodium by first-order derivative spectrophotometric method – precision test

Method	Amount (%)			Mean	RSD Interdays
	First day <sup>a</sup>	Second day <sup>a</sup>	Third day <sup>a</sup>		
$^1D_{304}$	100.4	98.3	99.9	99.5	1.0
RSD	0.52	0.32	0.11		

<sup>a</sup>Mean of six determinations.



**Table 3.** Recovery test for rabepazole sodium by first-order derivative spectrophotometric method

Method	Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		% of recovery <sup>a</sup>	Mean (%)
	Added	Found		
<sup>1</sup> D <sub>304</sub>	2.0	1.97	98.71	99.15
	4.0	3.95	98.75	
	6.0	6.0	100.0	

<sup>a</sup>Each value is mean of three determinations.

#### 4. CONCLUSIONS

The first-order derivative spectrophotometric method was successfully validated and demonstrated to be simple, linear, accurate, precise, specific, and sensitive, which indicates its adequacy for routine pharmaceutical analysis.

#### REFERENCES

- Barth, J. and Hahne, W. 2002. Review article: rabepazole-based therapy in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16 (suppl.1): 31–33.
- Carswell, C. and Goa, K. 2001. Rabepazole – an update of its use in acid-related disorders. *Drugs*, 61 (15): 2327–2356.
- Castro, D., Moreno, M., Torrado, S., and Lastres, J. 1999. Comparison of derivative spectrophotometric and liquid chromatographic method for the determination of omeprazole in aqueous solutions during stability studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21: 291–298.
- El-Gindy, A., El-Yazby, F., and Maher, M. 2003. Spectrophotometric and chromatographic determination of rabepazole in presence of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31: 229–242.
- Garcia, C., Paim, C., and Steppe, M. 2004. New liquid chromatographic method for determination of rabepazole sodium in coated tablets. *J. AOAC. Int.*, 87 (4): 842–846.
- Garcia, C., Sippel, J., Sfair, L., Garcia, S., Jablonski, A., Steppe, M., and Schapoval, E. 2005. Validation of capillary electrophoresis method for analysis of rabepazole sodium in pharmaceutical dosage form. *J. AOAC. Int.*, 88 (4): 1081–1085.
- Horn, J. 2000. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin. Ther.*, 22 (3): 266–280.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). 1996. Q2B: Guideline on Validation of Analytical Procedure Methodology.
- Janssen-Cilag. 1999. *Pariet*, 1–30.
- Karlijkovic-Rajic, K., Novovic, D., Marinkovic, V., and Agbaba, D. 2003. First-order UV-derivative spectrophotometry in the analysis of omeprazole and pantoprazole sodium salt and corresponding impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32: 1019–1027.

- Karpinska, J. 2004. Derivative spectrophotometry – recent applications and directions of developments. *Talanta*, 64 (4): 801–822.
- Mano, N., Oda, Y., Takakuwa, S., Chiku, S., Nakata, H., and Asakawa, N. 1996. Plasma direct injection high-performance liquid chromatographic method for simultaneously determining E3810 enantiomers and their metabolites by using flavoprotein-conjugated column. *J. Pharm. Sci.*, 85 (9): 903–907.
- Nakai, H., Shimamura, Y., Kanazawa, T., Yasuda, S., and Kayano, M. 1994. Determination of a new H<sup>+</sup>–K<sup>+</sup> ATPase inhibitor (E3810) and its four metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 660: 211–220.
- Ojeda, C. and Rojas, F. 2004. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, 518: 1–24.
- Radi, A., Abd El-Ghany, N., and Wahdan, T. 2004. Voltametric behaviour of rabeprazole at a glassy carbon electrode and its determination in tablet dosage form. *II Farmaco*, 59 (7): 515–518.
- Ramakrishna, N., Vishwottam, K., Wishu, S., Koteshwara, M., and Kumar, S. 2005. High-performance liquid chromatography method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 816 (1–2): 209–214.
- Singh, S., Jain, M., Shah, H., Gupta, S., Thakker, P., Shah, R., and Lohray, B. 2004. Direct injection, column switching-liquid chromatographic technique for the estimation of rabeprazole in bioequivalence study. *J. Chromatogr. B*, 813: 247–254.
- Takakuwa, S., Chiku, S., Nakata, H., Yuzuriha, T., Mano, N., and Asakawa, N. 1995. Enantioselective high-performance liquid chromatographic assay for determination of the enantiomers of a new anti-ulcer agent, E3810, in Beagle dog plasma and rat plasma. *J. Chromatogr. B*, 673: 113–122.
- Tivesten, A., Folestad, S., Schonbacher, V., and Svensson, K. 1999. Nonaqueous capillary electrophoresis for the analysis of labile pharmaceutical compounds. *Chromatographia*, 49 (suppl. 1): S7–S11.
- Zhang, Y., Chen, X., Gu, Q., and Zhong, D. 2004. Quantification of rabeprazole in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 523 (2): 171–175.



## Development and validation of a dissolution test for rabeprazole sodium in coated tablets

Cassia V. Garcia\*, Clesio S. Paim, Martin Steppe, Elfrides E.S. Schapoval

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752 Lab. 402, Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil*

Received 18 August 2005; received in revised form 23 January 2006; accepted 25 January 2006  
Available online 2 March 2006

### Abstract

The aim of this work is to develop and validate a dissolution test for rabeprazole sodium coated tablets using a reverse-phase liquid chromatographic method. After test sink conditions, dissolution medium and stability of the drug, the best conditions were: paddle at 75 rotations per minute (rpm) stirring speed, HCl 0.1M and borate buffer pH 9.0 as dissolution medium for acidic and basic steps, respectively, volume of 900 ml for both. The quantitation method was also adapted and validated. Less than 10% of the label amount was released in the acid step, while more than 95% was achieved over 30 min in the basic one. The dissolution profile for tablets was considered satisfactory. The dissolution test developed was adequate for its purpose and could be applied for quality control of rabeprazole tablets, since there is no official monograph.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Rabeprazole sodium; Dissolution test; HPLC; Method validation; Stability; Quality control

### 1. Introduction

Dissolution test has emerged in the pharmaceutical field as a very important tool to characterize drug product performance [1]. It provides measurements of the bioavailability of a drug as well as can demonstrate bioequivalence from batch-to-batch. Besides, dissolution is a requirement for regulatory approval for product marketing and is a vital component of the overall quality control program [2,3].

Rabeprazole ( $\pm$ )-sodium 2-[[4-(3-methoxypropoxy)-3-methylpyridine-2-yl]methylsulfonyl]-1H-benzimidazole (Fig. 1) is a proton pump inhibitor that covalently binds and inactivates the gastric parietal cell proton pump ( $H^+/K^+$  ATPase). It has proven efficacy in healing, symptom relief and prevention of relapse of gastric ulcer, duodenal ulcer and gastro-oesophageal reflux disease [4]. Since it is an acid labile drug, it is commercialize as enteric coated tablets [5].

Although there is a crescent number of works describing the determination of rabeprazole in biological fluids [6–11] and

pharmaceutical formulation [12–15] by several methods, this drug is not listed in any pharmacopoeia and there is no dissolution test for tablets reported in literature.

The aim of the present work is to develop and validate a dissolution test for rabeprazole sodium coated tablets using a high performance liquid chromatographic method (HPLC) adapted from the previously published method for drug determination in tablets [13].

### 2. Experimental

#### 2.1. Chemicals

Rabeprazole sodium reference standard, 99.3% purity, was supplied by Janssen-Cilag (São Paulo, SP, Brazil) and was used as received. The coated tablets (Pariet®), containing 20 mg of rabeprazole sodium, were obtained commercially. The excipients of the pharmaceutical formulation were mannitol, hydroxypropyl cellulose, magnesium oxide, low-substituted hydroxypropyl cellulose, magnesium stearate, ethylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, diacetylated mono-glycerides, talc, titanium dioxide, carnauba wax, and ferric oxide (yellow) as a coloring agent. All of them were obtained from different local distributors. Water was purified using Millipore®

\* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga, 2752 Lab. 402, Porto Alegre/RS, CEP 90610-000, Brazil. Tel.: +55 51 3316 5214; fax: +55 51 3316 5378.

E-mail address: [cassiavgarcia@yahoo.com.br](mailto:cassiavgarcia@yahoo.com.br) (C.V. Garcia).

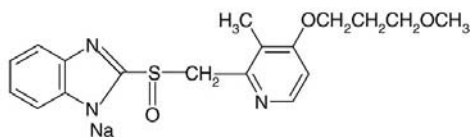


Fig. 1. Chemical structure of rabeprazole sodium.

system. All the other reagents were of analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany). Buffer solutions were prepared according to USP 28 [16].

## 2.2. Instrumentation

The dissolution test was performed in a Sotax AT7 multi-bath ( $n=6$ ) dissolution test system (Basel, Switzerland), in accordance with the United States Pharmacopeia (USP) general methods [16].

A liquid chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a model LC-10ADvp binary pump, SIL-10ADvp autosampler, CTO-10ACvp column oven, SPD-M10Avp PDA detector, SCL-10Avp system controller and CLASS-VP software was used to quantify the samples.

The Digimed potentiometer, model DM-20 (São Paulo, Brazil) was used to determine the pH of all solutions.

The ultrasonic bath used for deaeration was the model USC 2850 (Unique, São Paulo, Brazil) and the 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membranes were Millex (Millipore, São Paulo, Brazil).

## 2.3. Chromatographic conditions

The HPLC method was adapted from a previously published one [13] validated for rabeprazole sodium coated tablets analysis. The chromatographic conditions are listed in Table 1.

**Standard preparation for content uniformity.** An amount of powder equivalent to 10 mg of rabeprazole sodium was weighed and transferred to a 50 ml volumetric flask with 5 ml of water pH 10 (adjusted with ammonium hydroxide). The volume was completed with acetonitrile. An aliquot of 4 ml of this standard solution was transferred to 20 ml volumetric flask and diluted with acetonitrile obtaining the final concentration of 40.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The solution was filtered in a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter before the analysis. For the dissolution test, the solution was diluted to 11  $\mu\text{g ml}^{-1}$  using the mixture of acetonitrile-borate buffer pH 9.0 (50:50, v/v) as solvent.

Table 1  
Chromatographic conditions for rabeprazole sodium determination in tablets [13]

Equipment	Shimadzu SPD-M10A diode array detector
Column	Keystone Betabasic C8 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
Mobile phase	Acetonitrile–water (35:65, v/v)
Flow rate	1.0 ml min <sup>-1</sup>
Wavelength	282 nm
Injection volume	20.0 $\mu\text{l}$
Temperature	30 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$

**Sample preparation for content uniformity.** One tablet was transferred to each 100 ml volumetric flask containing 10 ml of water pH 10 (adjusted with ammonium hydroxide). They were kept in the ultrasonic bath for 25 min, shaken for 15 min and the volume was completed with acetonitrile. Aliquots of 4 ml of the solutions were transferred to 20 ml volumetric flasks and diluted with the mixture of acetonitrile obtaining the final concentration of 40.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The solutions were filtered in a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter before the analysis. This procedure is according to the previous published method for tablets [13].

**Sample preparation for acidic step.** One tablet was transferred to each 100 ml volumetric flask containing 10 ml of water pH 10 (adjusted with ammonium hydroxide). They were kept in the ultrasonic bath for 25 min, shaken for 15 min and the volume was completed with acetonitrile. Aliquots of 1 ml of the solutions were transferred to 20 ml volumetric flasks and diluted with the mixture of acetonitrile-borate buffer (50:50, v/v) obtaining the final concentration of 10.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The solutions were filtered in a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter before the analysis.

## 2.4. Determination of sink conditions

Rabeprazole sodium sink conditions were determined in different solvents, such as: phosphate buffer pH 6.8, phosphate buffer pH 7.5 and borate buffer pH 9.0 (using an amount of drug equivalent a three times of the dose in the pharmaceutical formulation in 900 ml of medium).

## 2.5. Validation

In order to demonstrate the method was adequate for dissolution test purposes, it was validated through the analysis of stability, specificity, linearity, precision and accuracy parameters [17,18].

**Stability.** The rabeprazole stability were evaluated for at least 10 h in phosphate buffer pH 6.8, phosphate buffer pH 7.5 and borate buffer pH 9.0. The solutions were kept at 37  $^{\circ}\text{C}$  during the period of the test, verifying the chromatograms obtained by the HPLC method (peak area and degradation products formation).

**Specificity.** It was evaluated by preparing a placebo sample of commercial formulation of tablets in their usual concentration. This sample was transferred to a vessel with 900 ml of the dissolution medium and stirred for 2 h at 150 rpm using paddle (USP apparatus 2) and temperature of 37  $^{\circ}\text{C}$ . Aliquots of this solution were filtered and analyzed by HPLC and UV methods.

**Linearity.** Aliquots of a 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  solution of rabeprazole sodium reference standard, prepared in a mixture of acetonitrile-borate buffer (50:50, v/v), were transferred to 25 ml volumetric flasks to obtain the final concentrations of 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 10.0 and 20.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Each solution was prepared in triplicate. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

**Precision.** The evaluation of the intermediate precision of the dissolution tests was performed using a well-characterized lot of the drug product of tight content uniformity (according to USP 28) and compared with the results of the dissolution tests. The

repeatability was evaluated through the R.S.D. from the data of calibration curve.

**Robustness.** It was evaluated through deliberate changes in the chromatographic conditions, such as pH (7.3–8.6) and percentage of acetonitrile in the mobile phase (35–37% and 35–33%). The equipment change was also done (Shimadzu LC-10 A, C-R6A registrator, SPD 10 A UV–Vis detector and manual injection) in order to evaluate the system suitability.

**Accuracy.** It was inferred from precision, linearity and specificity data, according to ICH Q2B 1996 [19].

## 2.6. Dissolution test conditions

After preliminary studies, the dissolution test was conducted in two steps [20], both using paddle, at stirring speed of 75 rpm and temperature of  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

### 2.6.1. Acidic step

The dissolution medium was 900 ml of 0.1 M hydrochloric acid, deaerated in ultrasonic bath for 15 min. After 2 h, the tablets were removed and the amount of rabeprazole determined by HPLC method (prepared as cited in Section 2.3).

### 2.6.2. Basic step

After 2 h in the acidic medium, the new set of tablets were transferred to the borate buffer pH 9.0 dissolution medium (900 ml), deaerated in ultrasonic bath for 15 min. Aliquots of 10 ml were withdrawn of each vessel at 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min and equal volume of fresh medium was replaced to maintain a constant total volume. Samples were filtered using  $0.45 \mu\text{m}$  nylon membrane (first 3 ml discarded), diluted with acetonitrile at  $11 \mu\text{g ml}^{-1}$  and assayed by HPLC method. The dissolution profile was obtained.

## 3. Results and discussion

Drug solubility and solution stability are important properties to be considered when selecting the dissolution medium [21]. In this study, the first approach was compare pH 6.8 and 7.5 media, as commonly used for delayed-release solid dosage forms, and also a high pH medium (borate buffer pH 9.0), considering the higher stability of rabeprazole sodium under alkaline conditions.

The evaluation of sink conditions for rabeprazole sodium bulk demonstrated the drug is soluble in phosphate buffer pH 6.8, phosphate buffer pH 7.5 and borate buffer pH 9.0. However, the phosphate buffer pH 6.8 solution became yellow in few minutes, while the phosphate buffer pH 7.5 became green in almost 1 h, indicating poor stability of rabeprazole sodium in those media.

In order to evaluate the rabeprazole sodium stability in each medium, chromatograms were obtained. The representation of drug profile in phosphate buffer pH 6.8, phosphate buffer pH 7.5 and borate buffer pH 9.0, for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ , is shown in Fig. 2. It is possible to observe rabeprazole sodium rapid degradation at pH 6.8 and 7.5, even during the first hour (30% and 13.4%, respectively). On the other hand, it was more stable at pH 9.0 and degraded only 1.3% in the first hour, time set for the dissolution

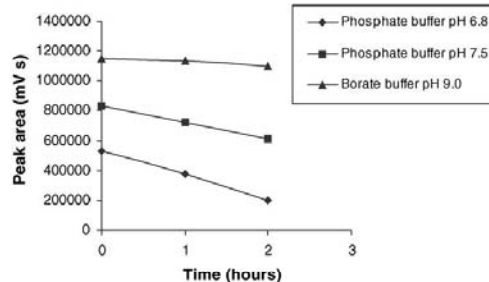


Fig. 2. Rabeprazole sodium profile in different media by HPLC: (●) phosphate buffer pH 6.8; (■) phosphate buffer pH 7.5; (▲) borate buffer pH 9.0.

test. According to literature [18], the acceptable range for solution stability is 98–102%. The stability of the pH 9.0 solutions prepared for analysis (diluted in acetonitrile) was also evaluated for 11 h (considering the analysis time for routine quality control and dissolution profiles determination). The solutions remained stable for the period tested (Fig. 3). So, it was possible to guarantee the integrity of the drug during all the analysis time and observe that acetonitrile had an important role in avoid drug degradation. Typical chromatograms of rabeprazole sodium reference standard and commercial sample are represented in Fig. 4.

The dissolution guidelines cite pH medium, in general, should not exceed 8.0 [22], and, although pH 9.0 is above physiologic conditions, in this case it was proved the drug required pH 9.0 to keep stable during the dissolution test. The same situation was reported by Farinha et al. [23], working with omeprazole in dissolution studies. The results obtained by Farinha et al. suggested that dissolution procedure for delayed-release solid oral dosage forms recommended by the general monograph of USP was not adequate for oral formulations containing omeprazole, which required pH 8.0 medium.

The specificity analysis revealed the HPLC method did not suffer interference by the formulation excipients, since there was not another peak in the retention time of rabeprazole sodium (about 7.5 min), only the buffer peak (Fig. 5). The chromatographic peak purity tool, applied for rabeprazole sodium peak, demonstrated that it was 100% pure. The same analysis was

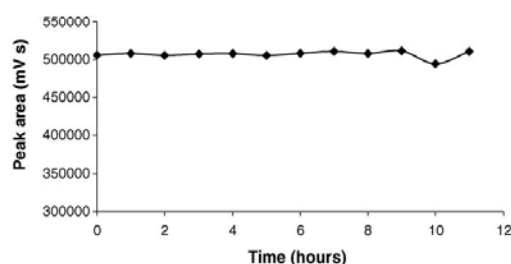


Fig. 3. Rabeprazole sodium profile in borate buffer pH 9.0 and acetonitrile (50:50, v/v) by HPLC.

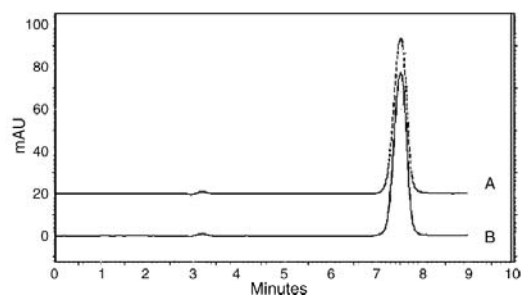


Fig. 4. Chromatograms of rabeprazole sodium (A) reference standard; (B) commercial sample (both at  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Chromatographic conditions: Hypersil Keystone Betabasic C8 (250 mm  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ); mobile phase acetonitrile–water (35:65, v/v); flow rate  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ; injection volume  $20.0 \mu\text{l}$ ; detection UV 282 nm and temperature of  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

done using the UV method. The result obtained suggested the UV method could not be used for rabeprazole sodium coated tablets determination in dissolution tests, once the formulation excipients had significant absorbance at 282 nm.

The linearity was tested in the concentration range of  $1.0\text{--}20.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ . The method demonstrated to be linear, with a correlation coefficient of 0.9999. The slope obtained was 41702.6 and the intercept was  $-2789.07$ . The data were validated by means of analysis of variance (ANOVA), which showed significant linear regression and no-significant linearity deviation ( $P < 0.05$ ) [20].

The stirring speed selection was done based on the range recommended (50–75 rpm) for apparatus 2 [21,22] and the usual value for tablets. Since the results obtained using 75 rpm in the preliminary studies were satisfactory, no other speed was tested. The filters were also evaluated and the  $0.45 \mu\text{m}$  membrane was selected. It demonstrated not adsorb the drug during the process.

Once the rabeprazole sodium tablets are enteric coated, it is usual to carry out an initial acid step to evaluate the influence of acid pH on the integrity of the formulation. The amount of rabeprazole sodium eventually dissolved in the acidic medium

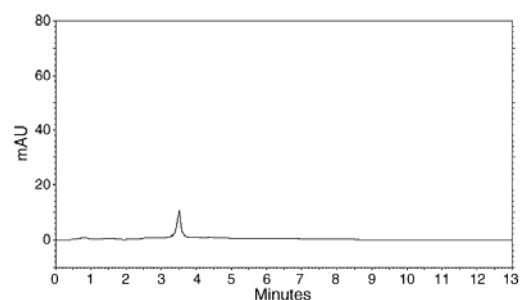


Fig. 5. Chromatogram of placebo sample in borate buffer pH 9.0. Chromatographic conditions: Hypersil Keystone Betabasic C8 (250 mm  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ); mobile phase acetonitrile–water (35:65, v/v); flow rate  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ ; injection volume  $20.0 \mu\text{l}$ ; detection UV 282 nm and temperature of  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

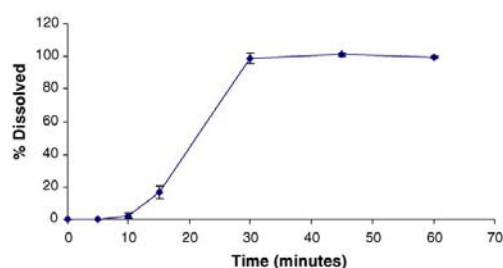


Fig. 6. Dissolution profile of rabeprazole sodium coated tablets ( $n = 12$ ) using borate buffer pH 9.0 medium and 75 rpm stirring speed.

would become rapidly degraded. Thus, it was necessary to remove and analyze the tablets from the acidic step by HPLC method. The same procedure is applied for omeprazole pellets in USP 28 [16]. The mean percentage of rabeprazole sodium remaining in the tablets was 98.05% (R.S.D. = 1.18), indicating the resistance of the coating.

The drug release profile obtained in the dissolution test, at the conditions mentioned in Section 2.6, was considered satisfactory (Fig. 6). After 30 min, more than 95% of drug was dissolved in the medium. The values for percentage of rabeprazole sodium dissolved per time and the R.S.D. values are in Table 2. The results for R.S.D. were higher for times 10 and 15 min, since the concentration of rabeprazole sodium dissolved was small. Once there is only one rabeprazole sodium brand in the Brazilian market, it was not done the comparison of dissolution profiles between products.

The precision of the dissolution tests was evaluated through the comparison of the results of uniformity of content and the percentage drug release. The mean value found to uniformity of content to rabeprazole sodium tablets was 105.55%, with R.S.D. of 1.92. Considering that the remaining drug in acidic step was 98.05%, the loss of rabeprazole sodium was about 7.5% (less than 10%, as usually recommended). The amount reached in basic step was 101.26% (R.S.D. = 1.0). Adding the acidic and the basic steps mean amounts, the result is 108.7%. The small difference between the uniformity of content and percentage of drug release can be explained by the variation of the method applied for each step and for content uniformity. The repeatability evaluation demonstrated small R.S.D. for the results from each concentration in the calibration curve. The R.S.D. obtained

Table 2  
Percentage of rabeprazole sodium dissolved in the dissolution test ( $n = 12$ ), using borate buffer pH 9.0 medium and 75 rpm stirring speed

Time (min)	Drug dissolved (%)	R.S.D.
0	0	0
5	0	0
10	2.14	68.1
15	15.01	25.98
30	98.65	3.27
45	101.26	1.0
60	99.21	0.66

Table 3  
Results of the robustness and system suitability evaluation of the chromatographic method for rabeprazole sodium

Chromatographic parameters	Modification			Equipment <sup>a</sup>
	pH	Mobile phase acetonitrile:water (33:67, v/v)	Mobile phase acetonitrile:water (37:63, v/v)	
Retention time (min)	6.5	8.9	6.4	7.6
Asymmetry	0.92	0.94	0.90	0.96

<sup>a</sup> Shimadzu LC-10 A, C-R6A registrator, SPD 10 A UV–Vis detector and manual injection.

were between 2.35 and 0.41. These results can demonstrate the good precision of the method for dissolution test.

The robustness of the method was demonstrated through the analysis of the chromatograms obtained under small variations in the chromatographic conditions. During these modifications, the retention time of rabeprazole sodium suffer small modifications, mainly with percentage of acetonitrile variation, but the symmetry of the peak was conserved, indicating there was no damage for the analysis (Table 3). The increase in the pH value of the mobile phase resulted in a smaller retention time. The theoretical plates kept around  $3.49 \times 10^3$ .

#### 4. Conclusions

The dissolution test developed and validated for rabeprazole sodium coated tablets was considered satisfactory. It was carefully studied in order to guarantee the drug stability during all analysis time. The conditions that allowed the dissolution profile determination were borate buffer pH 9.0 medium, paddle (USP apparatus 2) and 75 rpm stirring speed. The method demonstrated to be adequate for quality control of rabeprazole sodium dosage form, since there is no official monograph.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank to LCQFar, to CAPES and Farmacopéia Brasileira by the financial support and to LEPCQ.

#### References

- [1] S. Furlanetto, F. Maestrelli, S. Orlandini, S. Pinzauti, P. Mura, J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) 159–165.
- [2] S.M.A. Prost, Dissol. Tech. Feb. (2004) 19–21.
- [3] H. Ansel, L. Allen Jr., N. Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1999.
- [4] C. Carswell, K. Goa, Drugs 61 (2001) 2327–2356.
- [5] Janssen-Cilag, Pariet (1999) 1–30.
- [6] S. Takakuwa, S. Chiku, H. Nakata, T. Yuzuriha, N. Mano, N. Asakawa, J. Chromatogr. B 673 (1995) 113–122.
- [7] N. Mano, Y. Oda, S. Takakuwa, S. Chiku, H. Nakata, N. Asakawa, J. Pharm. Sci. 85 (1996) 903–907.
- [8] H. Nakai, Y. Shimamura, T. Kanazawa, S. Yasuda, M. Kayano, J. Chromatogr. B 660 (1994) 211–220.
- [9] Y. Zhang, X. Chen, Q. Gu, D. Zhong, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 171–175.
- [10] N. Ramakrishna, K. Vishwottam, S. Wishu, M. Koteswara, S. Kumar, J. Chromatogr. B 816 (2005) 209–214.
- [11] S. Singh, M. Jain, H. Shah, S. Gupta, P. Thakker, R. Shah, B. Lohray, J. Chromatogr. B 813 (2004) 247–254.
- [12] A. El-Gindy, F. El-Yazby, M. Maher, J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 229–242.
- [13] C.V. Garcia, C.S. Paim, M. Steppe, J. AOAC Int. 87 (2004) 842–846.
- [14] A. Radi, N. Abd El-Ghany, T. Wahdan, II Farmaco 59 (2004) 515–518.
- [15] C.V. Garcia, J. Sippel, L. Sfair, S. Garcia, A. Jablonski, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, J. AOAC Int. 88 (2005) 1081–1085.
- [16] The United States Pharmacopoeia, 28th ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2005.
- [17] J.W. Skoug, G. Halstead, D.L. Theis, J. Freeman, D. Fagam, B.R. Rohrs, Pharm Tech. 20 (1996) 58–72.
- [18] M.R.C. Marques, W. Brown, Analytica 1 (2002) 48–51.
- [19] ICH Q2B, International Conference on Harmonisation, Validation of analytical procedures. Methodology, 1996.
- [20] Farmacopéia Brasileira, 4th ed., Atheneu, Rio de Janeiro, 1988.
- [21] The United States Pharmacopoeia, Pharmacopoeial Forum 30 (2004) 351–363.
- [22] FDA, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Food and Drug Administration, Rockville, 1997.
- [23] A. Farinha, A. Bica, J.M. Martins, J.P. Pais, Drug Dev. Ind. Pharm. 26 (2000) 785–790.

---

---



---

**5. CAPÍTULO II**

**ESTUDO DA ESTABILIDADE**

---

---

---

---

---

---

---

## 5.1 INTRODUÇÃO

---

---

---

---

---

Diversas razões podem ser apontadas para a realização de um estudo de estabilidade de medicamentos. Entre elas, estão a questão da administração de produtos estáveis e seguros ao paciente, a exigência legal de que os medicamentos cumpram com suas condições de identidade, potência e pureza até o momento de seu uso, e os aspectos econômicos, relacionados à imagem do produto e à expectativa de eficácia do paciente frente ao mesmo (NUDELMAN, 1975).

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação, em uma determinada embalagem, de manter suas características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. Em geral, a perda da estabilidade de um produto afeta sua eficácia, segurança e aceitabilidade pelo paciente. A perda da potência é considerada o efeito mais importante, sendo 90% do valor rotulado o mínimo aceitável (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; VADAS, 2000).

Os fatores que podem afetar a estabilidade de um produto incluem a estabilidade da(s) substância(s) ativa(s), o potencial de interação entre fármacos e excipientes, processo de produção, forma farmacêutica, embalagem, condições ambientais durante o armazenamento e o transporte, tempo entre produção e uso pelo paciente, além de fatores externos, tais como temperatura, radiações, umidade, pressão, solventes, gases atmosféricos, pH e contaminação microbiana (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; BRASIL, 2005).

Os estudos de estabilidade podem ser divididos em duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios (NUDELMAN, 1975; BRASIL, 2005). Os estudos acelerados são projetados para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Este tipo de estudo permite determinar quais os principais fatores que afetam a estabilidade do produto e qual a magnitude, além de elucidar produtos e rotas de degradação e fornecer dados importantes para o desenvolvimento de métodos analíticos a serem utilizados nos testes confirmatórios. Para avaliação da concentração do fármaco e/ou produtos de degradação formados, diferentes técnicas analíticas podem ser empregadas (físico-químicas e microbiológicas) (NUDELMAN, 1975).

---

---

Os estudos confirmatórios de longa duração são realizados a fim de verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (BRASIL, 2005).

Em relação às reações fotoquímicas, pode-se afirmar que são processos complexos, bastante comuns em fármacos, uma vez que a maioria destes apresenta máximos de absorção na região de comprimento de onda das fontes normalmente usadas, como ultravioleta (NUDELMAN, 1975). Diferentes tipos de reações podem ser desencadeadas por ação da luz, como reduções, hidrólises, oxidações, isomerizações, alterações de anel, polimerizações e remoção de substituintes (TONNESEN, 2001).

Os estudos de fotoestabilidade de substâncias podem ser realizados em duas etapas: testes de degradação forçada, com o objetivo de avaliar a fotosensibilidade do material e seus produtos de degradação, empregando a substância isoladamente ou em solução/suspensão, e submetendo-a a condições variadas de exposição; testes confirmatórios, que propiciarão informações necessárias sobre a manipulação e embalagem do produto (ICH, 1996b; TONNESEN, 1996).

As fontes de radiação preconizadas para os estudos de fotoestabilidade podem ser: 1) fonte com emissão padrão similar ao D65 (luz do dia externa)/ID65 (luz do dia indireta), que pode ser obtida com lâmpadas fluorescentes combinadas com lâmpadas com emissão UV ou visível, xenônio ou metal-haletos, com filtros que permitam emissão ao redor de 320 nm; 2) lâmpada branca fluorescente fria e fonte de luz UV fluorescente, que possua uma distribuição espectral de 320 a 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm (ICH, 1996b).

No presente capítulo serão apresentados os testes preliminares de estabilidade de rabeprazol sódico frente aos fatores temperatura, acidez, oxidação e luz. Além disso, serão descritos o estudo da cinética de fotodegradação do fármaco e os métodos de isolamento e identificação de três produtos de degradação formados frente a luz.

---

---

---

**5.2 PARTE EXPERIMENTAL**

---

---

---

---



---

### **5.2.1 Avaliação preliminar da estabilidade de rabeprazol**

Amostras de comprimidos revestidos de rabeprazol sódico ou soluções obtidas a partir dos mesmos foram submetidas a diferentes fatores de degradação, em condições drásticas, a fim de observar quais fatores eram mais relevantes para sua degradação. As amostras foram avaliadas por CLAE após cada período de exposição, em relação à possível formação de produtos de degradação. Cabe salientar que, em alguns testes por cromatografia líquida, foi utilizada uma coluna semipreparativa (Hypurity C18, 250 x 10 mm, 5 $\mu$ m - THERMO) acoplada a um cromatógrafo a líquido Hewlett-Packard, série 1100, com detector UV e fase móvel composta por acetonitrila-água (35:65, v/v), a fim de obter um perfil mais claro e otimizar processos de isolamento posteriores. O tempo de retenção de rabeprazol nesta coluna e, nas condições utilizadas, variava entre 29 e 32 minutos.

As condições cromatográficas por CLAE, empregadas para avaliação da degradação, estão descritas na Tabela 4.3 (Capítulo I).

#### **5.2.1.1 Estabilidade térmica**

A estabilidade térmica preliminar foi desenvolvida em estufa (BIOMATIC) contendo termômetro para verificação da temperatura interna.

As amostras de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos (10 mg) foram colocadas sobre vidro de relógio no interior da estufa e mantidas em temperatura constante de 50 °C. Os tempos de exposição das amostras foram zero, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 15 e 20 dias. Outra amostra de comprimidos revestidos foi colocada em estufa (BIOMATIC), à temperatura de 80 °C por 4 dias.

Cada amostra era composta por três comprimidos revestidos de rabeprazol sódico.

O preparo das amostras foi realizado transferindo-se os três comprimidos revestidos para balão volumétrico de 200 ml e levando ao banho de ultra-som por 20 minutos com 20 ml de água (pH = 10,0). Após, completou-se o volume com acetonitrila e filtrou-se em papel filtro. A partir desta solução transferiu-se uma

---

---

alíquota de 5,0 ml para balão volumétrico de 25 ml a fim de obter a concentração de 40,0 µg/ml. Simultaneamente, foi preparada uma solução de rabeprazol sódico SQR, em acetonitrila, na mesma concentração da amostra.

#### 5.2.1.1.1 Resultados

A percentagem residual de rabeprazol sódico presente nas amostras de comprimidos revestidos, armazenadas à temperatura de 50 °C manteve-se aproximadamente constante (104%) até o 20º dia, o que indica que praticamente não houve degradação das amostras nas condições estabelecidas.

Através dos cromatogramas, foi verificada a ausência de produtos de degradação em quantidade.

O cromatograma ampliado, referente ao 20º dia de armazenamento a 50 °C, está representado na Figura 5.1.

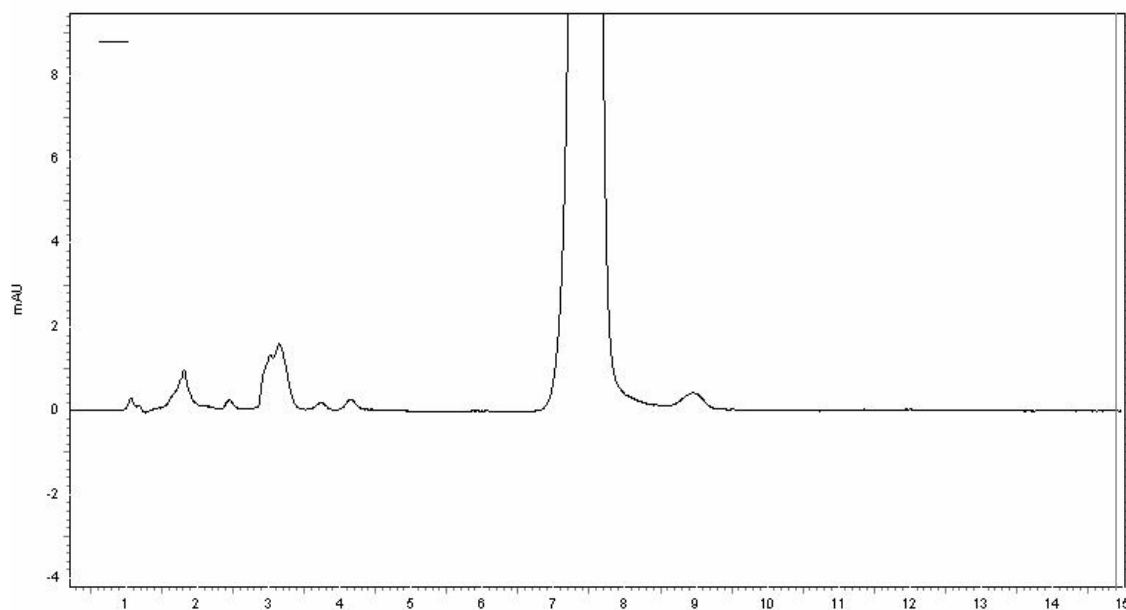


Figura 5.1 – Cromatograma ampliado obtido a partir de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos armazenados a 50 °C, durante 20 dias. Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

---

---

O teor residual de rabeprazol sódico encontrado nos comprimidos armazenados em estufa, durante quatro dias, à temperatura de 80 °C, foi de 74,38%. A Figura 5.2 apresenta o cromatograma referente a esta amostra, onde é possível observar o início da formação de produtos de degradação.

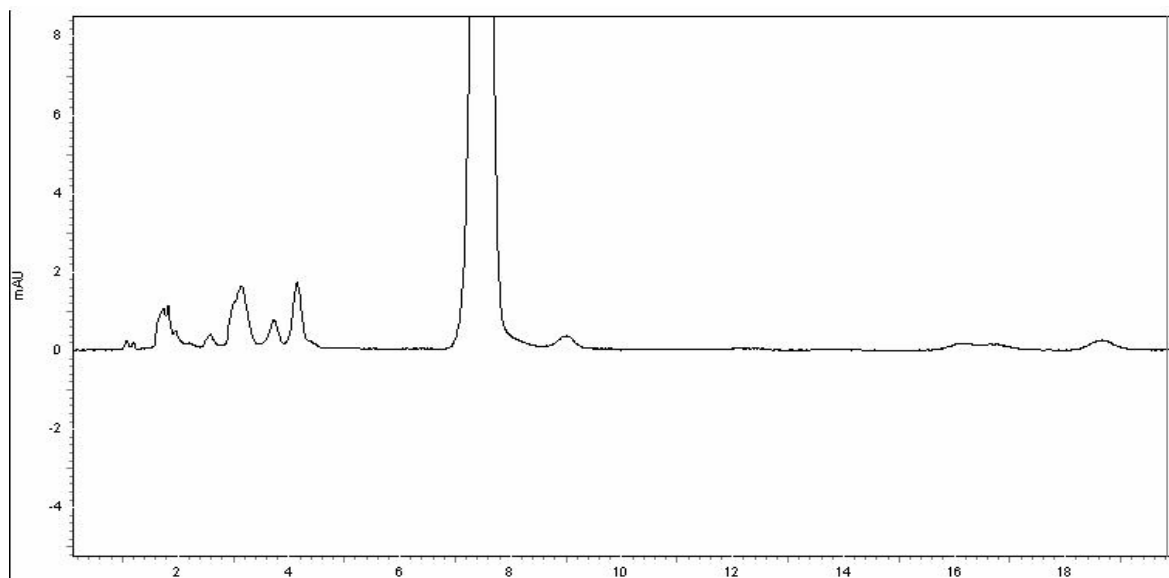


Figura 5.2 - Cromatograma ampliado obtido a partir de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos armazenada a 80 °C, durante 4 dias. Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

#### 5.2.1.1.2 Discussão

A temperatura de 50 °C foi escolhida para o estudo, pois presumia-se que esta poderia acelerar a degradação do fármaco, o qual já havia demonstrado ser bastante instável mesmo à temperatura ambiente e, principalmente, em solução aquosa. Os tempos de exposição foram selecionados aleatoriamente.

O produto farmacêutico não apresentou alteração das características organolépticas, como coloração e odor, durante a realização do estudo.

Os resultados da determinação do teor residual de rabeprazol sódico indicam que não houve degradação significativa, mantendo-se em torno de 104% após 20 dias de exposição.

---

---

A análise do cromatograma referente ao 20º dia demonstra o início da formação de produtos de degradação. Provavelmente, a esta temperatura, as reações de degradação são lentas, sendo necessário maior tempo de exposição para observação de tais produtos.

Em virtude dos resultados obtidos, realizou-se um teste colocando-se uma amostra de comprimidos revestidos de rabeprazol sódico à temperatura de 80 °C, por um período de 4 dias. Sob estas condições, houve um decaimento mais acentuado do teor de fármaco, chegando a 74,38%. O cromatograma referente a esta amostra sugere a presença de alguns produtos de degradação em baixa concentração.

A avaliação dos resultados indica que o rabeprazol sódico é sensível à temperatura, de maneira mais significativa quando esta é elevada ou quando o período de exposição é maior. Este fato foi verificado no trabalho de EL-GINDY e colaboradores (2003), que demonstrou que o tempo de meia-vida do fármaco, em tampão Britton-Robinson pH 7,0, é menor quanto maior a temperatura.

#### **5.2.1.2 Estabilidade em meio ácido**

Para avaliação da estabilidade preliminar do fármaco em meio ácido, uma amostra de comprimido (20 mg) foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, contendo 10 ml de água pH 10,0, e levada ao banho de ultra-som por 25 minutos. Após este período, o volume do balão foi completado com HCl 0,1 M e a solução mantida em temperatura ambiente. Alíquotas desta solução foram retiradas em intervalos de 15 e 60 minutos, sendo neutralizadas com NaOH 0,1 M até pH próximo de 7,0 e diluídas à concentração de 40,0 µg/ml com acetonitrila. As soluções foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm antes da análise cromatográfica.

Amostras de comprimidos triturados foram diluídas a 800 µg/ml, em ácido clorídrico 0,1 M, 0,05 M e 0,01M, mantidas a temperatura ambiente por 1 hora e analisadas por cromatografia líquida, utilizando coluna semipreparativa.

---

---

### 5.2.1.2.1 Resultados

A solução aquosa de rabeprazol, na presença do ácido 0,1 M, adquiriu a coloração amarelo intenso. Através dos cromatogramas (Figuras 5.3 e 5.4), foi possível observar que o fármaco estava totalmente degradado após 15 minutos e que após 60 minutos havia a formação de outro produto com tempo de retenção próximo a 4 minutos.. O cromatograma desta solução, obtido em coluna semipreparativa está representado na Figura 5.5.

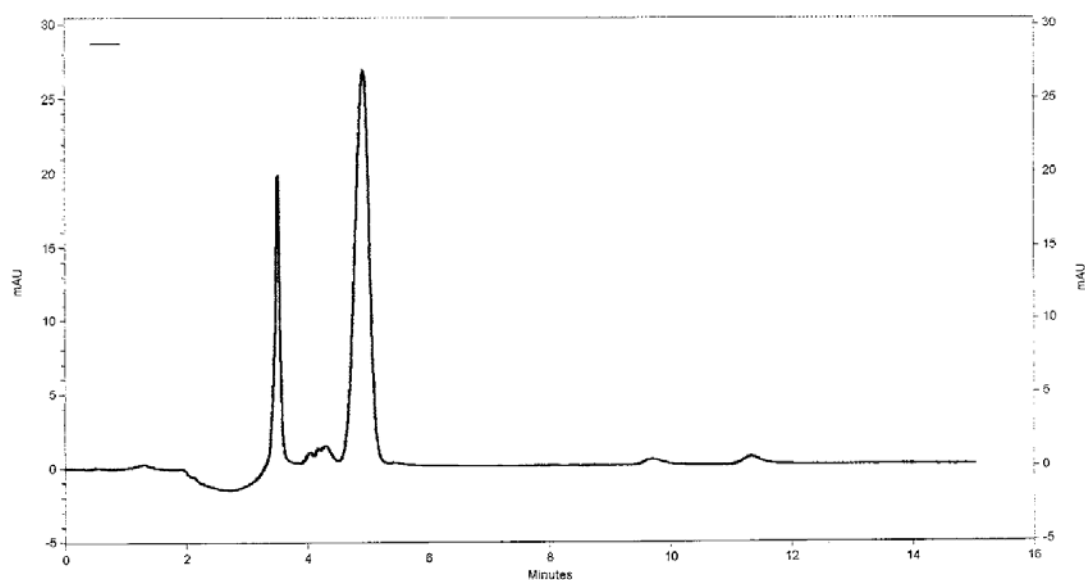


Figura 5.3 – Cromatograma de rabeprazol em ácido clorídrico 0,1 M por 15 minutos (40,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

---

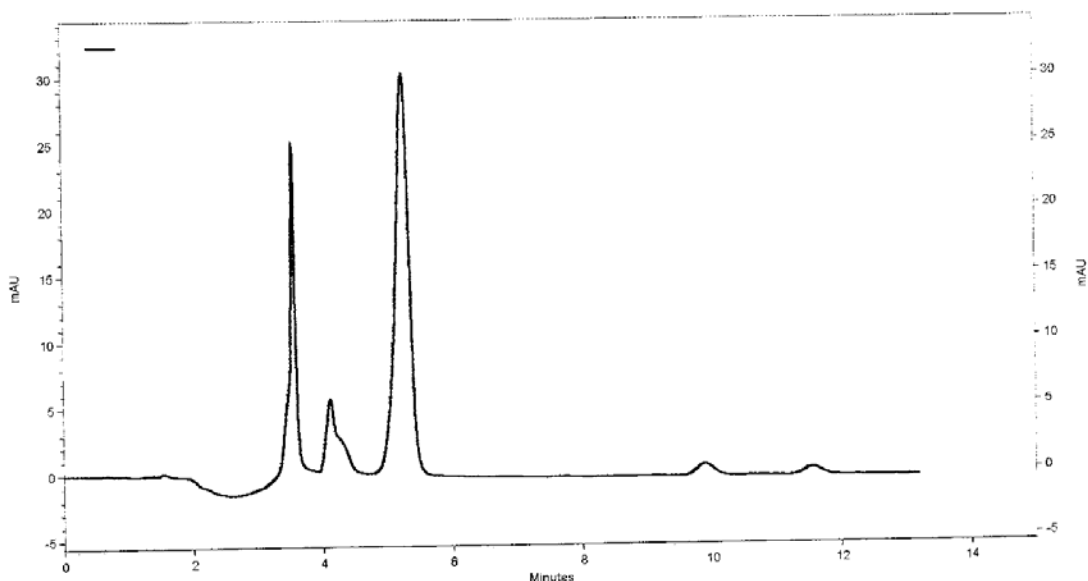


Figura 5.4 – Cromatograma de rabeprazol em ácido clorídrico 0,1 M por 60 minutos (40,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

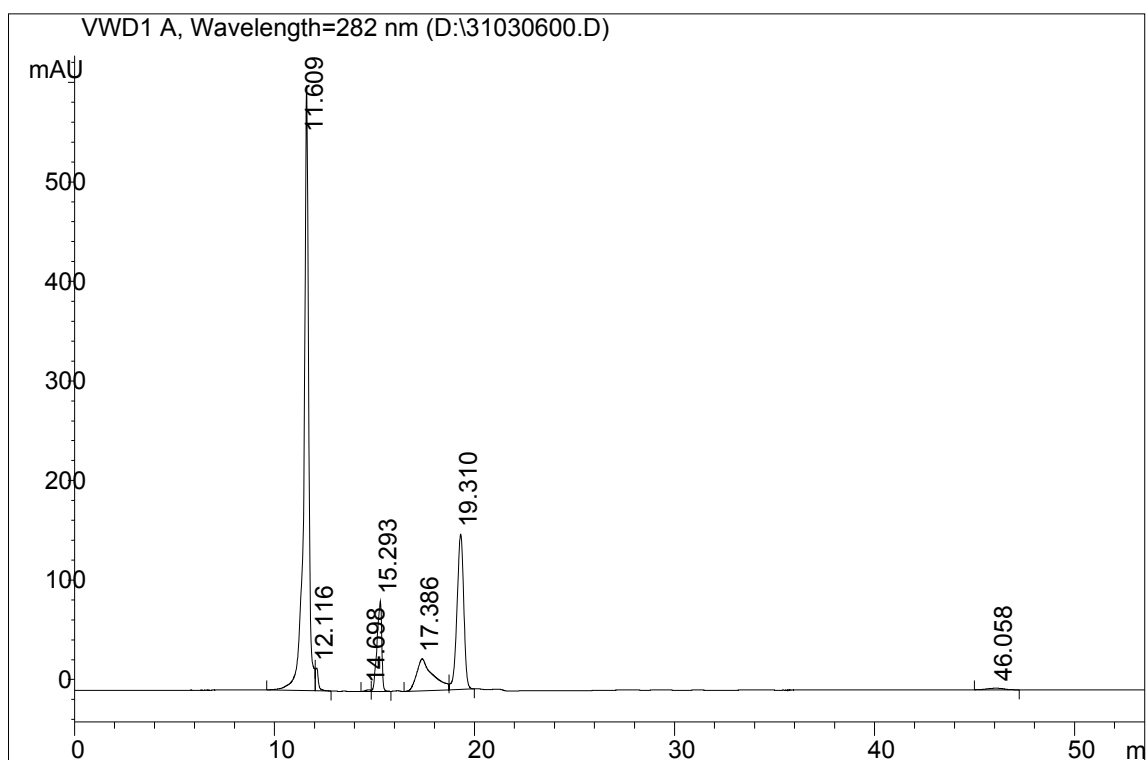


Figura 5.5 – Cromatograma de rabeprazol em meio ácido clorídrico 0,1 M, após 1 hora de contato (800,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna semipreparativa Hypurity C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

Os cromatogramas referentes à degradação em ácido clorídrico 0,05 e 0,01 M estão representados nas Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente.

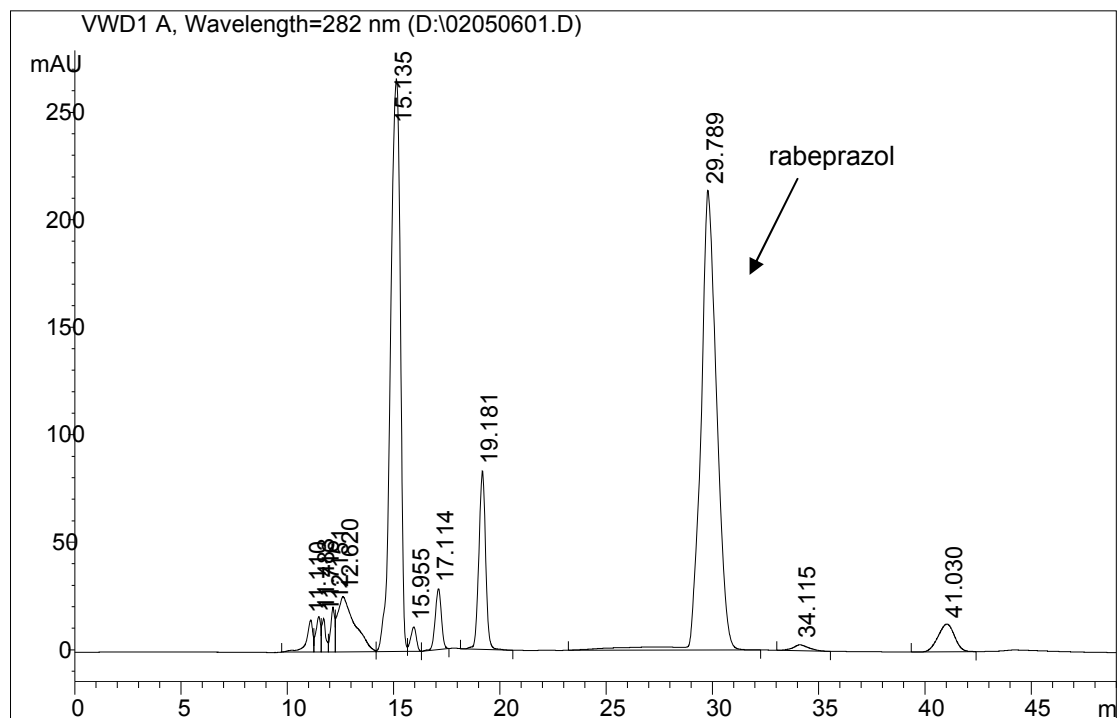


Figura 5.6 – Cromatograma de rabeprazol em meio ácido clorídrico 0,05 M, após 1 hora de contato (800,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna semipreparativa Hypurity C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

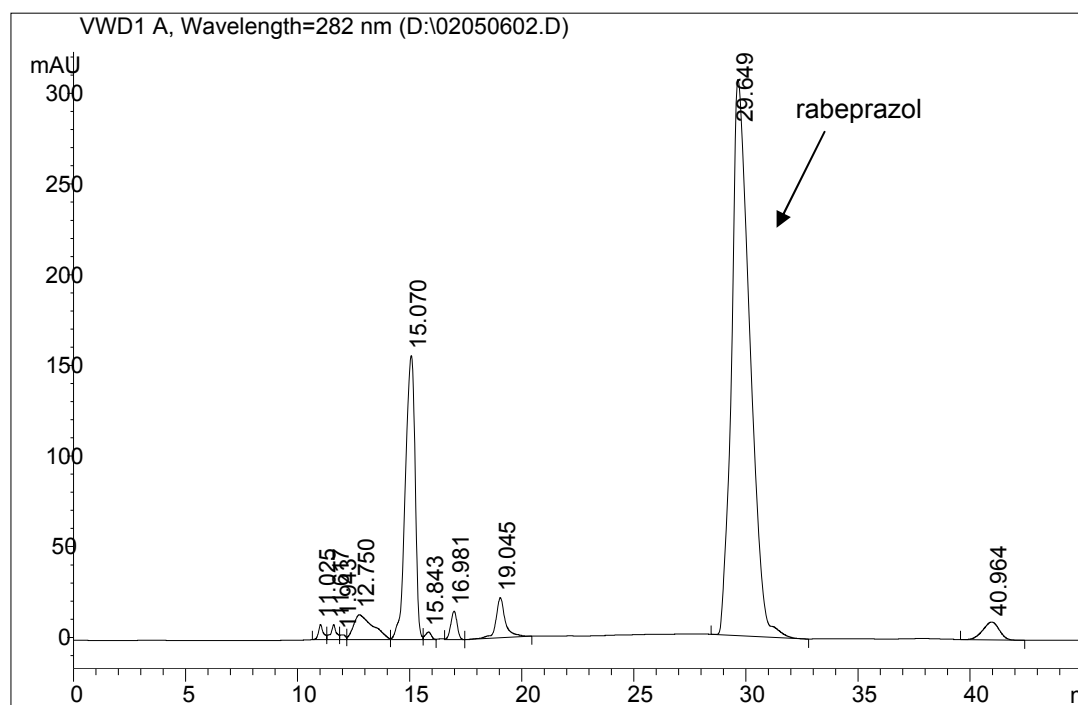


Figura 5.7 – Cromatograma de rabeprazol em meio ácido clorídrico 0,01 M, após 1 hora de contato (800,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

#### 5.2.1.2.2 Discussão

A instabilidade de rabeprazol, bem como dos demais inibidores da bomba de prótons, em meio ácido é descrita na literatura (HORN e HOWDEN, 2005; QAISI *et al.*, 2006). Porém, os dados a respeito de número de produtos formados, além da forma sulfenamida, não são exatos.

É possível verificar através dos cromatogramas obtidos em coluna analítica que, provavelmente, alguns produtos de degradação estejam sobrepostos, sendo separados mais adequadamente em coluna semipreparativa.

Vários testes preliminares foram realizados a fim de otimizar condições de isolamento para os produtos de degradação formados em meio ácido. Entretanto, observou-se que a degradação não ocorria de forma reprodutível, ou seja, os produtos formados não eram sempre os mesmos e as quantidades formadas variavam em diferentes dias. Os resultados publicados por EL-GINDY e



---

colaboradores (2003) mostram que em meio ácido são formados apenas dois produtos de degradação, ao contrário dos dados obtidos neste estudo. Isto reforça o fato de que as reações que o rabeprazol sofre em meio ácido são mais complexas, o que dificulta a etapa de isolamento de produtos de degradação.

Os resultados obtidos para a degradação em ácido clorídrico, em concentrações menores, indicaram que rabeprazol se degrada mais lentamente quanto mais diluído for o ácido, mas os produtos formados são os mesmos.

### **5.2.1.3 Estabilidade oxidativa**

A solução foi preparada transferindo-se um comprimido de rabeprazol (20 mg) para balão volumétrico de 25 ml, contendo água (pH = 10,0), e levando-o ao banho de ultra-som por 25 minutos. A solução foi filtrada e alíquotas de 2 ml foram transferidas para balões volumétricos de 10 ml. Ao primeiro balão foram adicionados 8 ml de peróxido de hidrogênio 3%. A amostra foi analisada por CLAE logo após 1 hora a temperatura ambiente e após 30 minutos de aquecimento em banho-maria.

Ao segundo balão, foram adicionados 5 ml de peróxido de hidrogênio 30% e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 1 hora. Após o período, completou-se o volume com acetonitrila e analisou-se por CLAE.

#### **5.2.1.3.1 Resultados**

Os cromatogramas referentes às amostras degradadas com peróxido de hidrogênio 3%, à temperatura ambiente e com aquecimento, e peróxido de hidrogênio 30% estão representados nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10, respectivamente. O pico com tempo de retenção próximo a 3 minutos refere-se ao estabilizante presente no reagente.

---

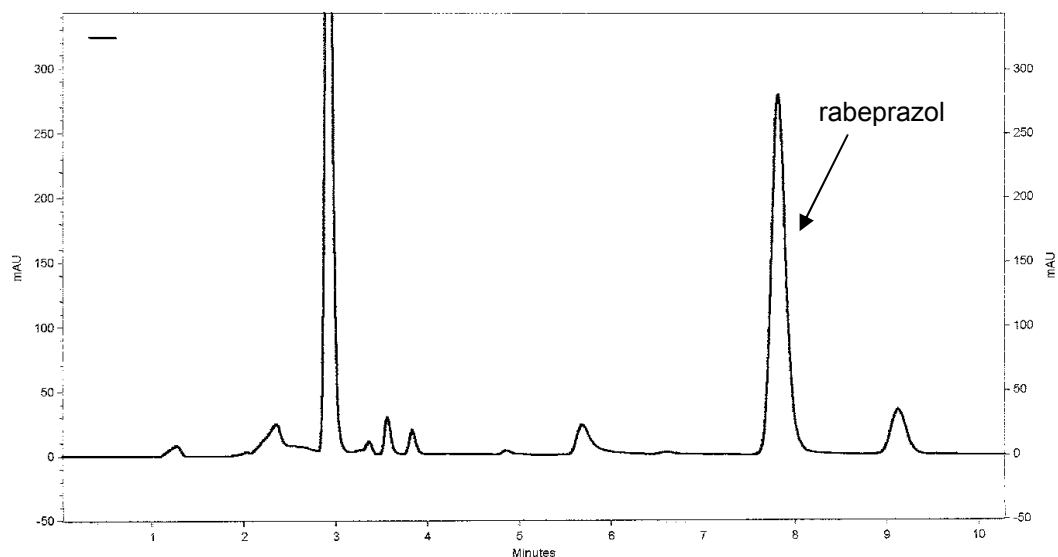


Figura 5.8 – Cromatograma ampliado de rabeprazol em peróxido de hidrogênio 3%, sem aquecimento, após 1 hora (160,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

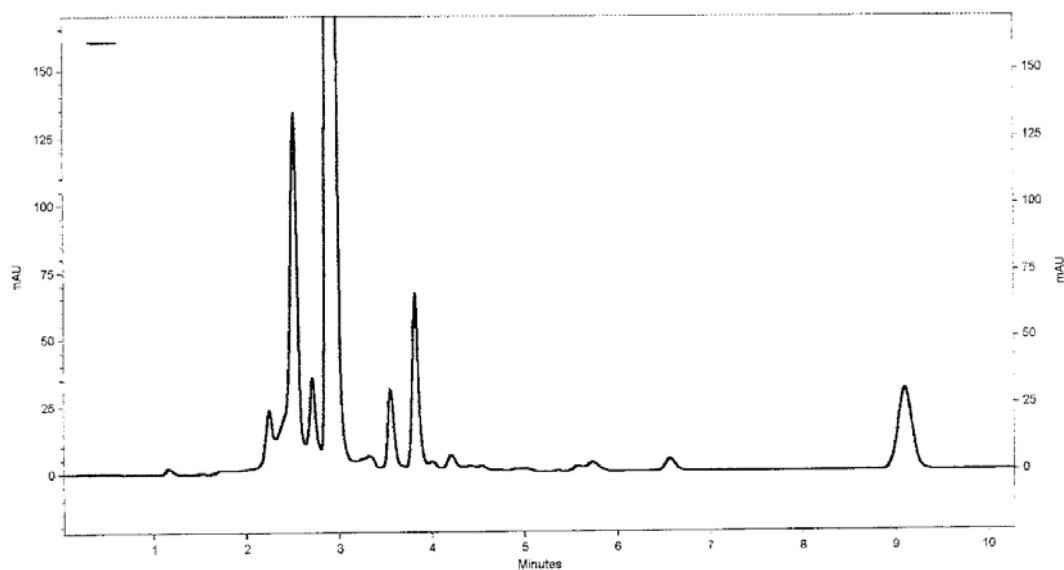


Figura 5.9 – Cromatograma ampliado de rabeprazol em peróxido de hidrogênio 3%, aquecido por 30 minutos (160,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

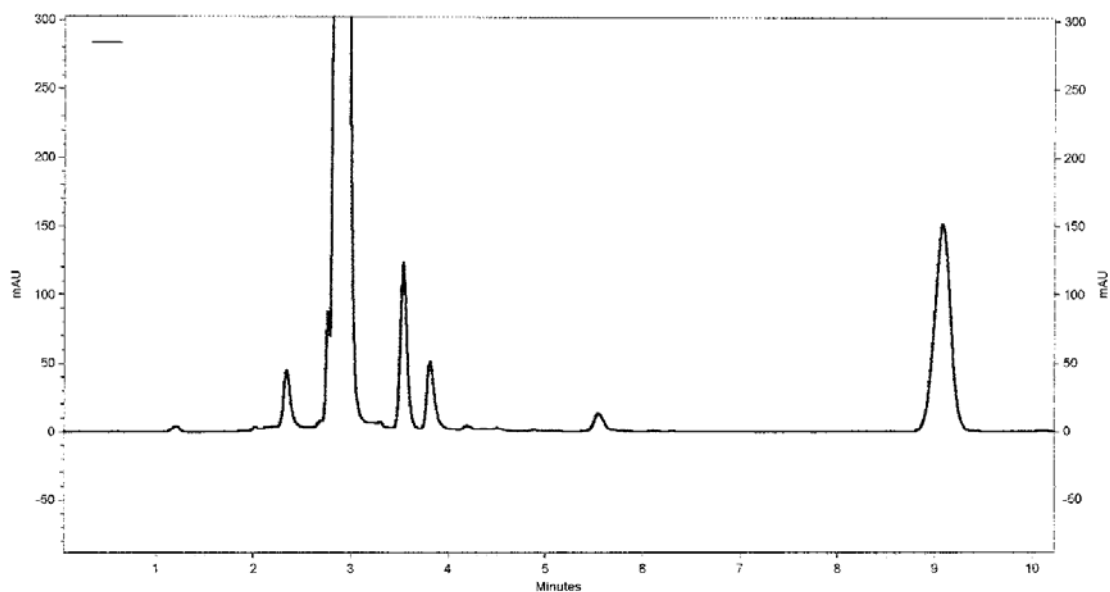


Figura 5.10 – Cromatograma ampliado de rabeprazol em peróxido de hidrogênio 30%, sem aquecimento, após 1 hora (160,0 µg/ml). Condições cromatográficas: coluna Hypersil Keystone BetaBasic C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

#### 5.2.1.3.2 Discussão

Os resultados do teste preliminar de estabilidade oxidativa demonstraram que rabeprazol degrada-se em torno de 50% em contato com peróxido de hidrogênio 3%, à temperatura ambiente por 1 hora, enquanto que sob aquecimento por 30 minutos e em peróxido 30%, é totalmente degradado no mesmo período. É possível verificar que a temperatura provoca o aumento da velocidade das reações químicas que ocorrem neste sistema.

Aproximadamente quatro produtos de degradação são formados nas três condições estudadas. EL-GINDY e colaboradores (2003) encontraram apenas 2 produtos de degradação após manter uma solução aquosa de rabeprazol, contendo peróxido de hidrogênio 33,3%, por 24 horas à temperatura ambiente. Esta diferença pode ser atribuída às diferentes condições de análise aplicadas.

Um dos prováveis grupamentos da molécula a sofrer oxidação é o sulfóxido, passando assim, à forma sulfona.

---

#### **5.2.1.4 Estabilidade frente à luz**

##### **5.2.1.4.1 Lâmpada UVC-254 nm**

Este estudo preliminar de fotoestabilidade de rabeprazol foi desenvolvido em câmara espelhada contendo lâmpada UVC -254 nm, 15W (45 cm de comprimento - PHILIPS), com temperatura não superior a 25 °C.

As amostras eram compostas por comprimidos intactos, comprimidos triturados e soluções aquosas e metanólicas do fármaco, sendo as últimas armazenadas em cubetas descartáveis de 10 mm (BRAND) fechadas com auxílio de Parafilm<sup>®</sup>.

Os tempos de análise foram os seguintes:

- soluções aquosa e metanólica (800,0 µg/ml): 1 hora
- comprimidos intactos: 22, 35, 50 dias
- comprimidos triturados: 3, 10, 35 e 50 dias

A análise cromatográfica foi realizada em coluna semipreparativa C<sub>18</sub>, possuindo, então, um caráter qualitativo e não quantitativo. As amostras de comprimidos intactos e triturados, expostas à luz UVC 254 nm, foram dissolvidas em acetonitrila e filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm antes da análise.

##### **5.2.1.4.1.1 Resultados**

Os cromatogramas referentes às amostras em solução aquosa (800,0 µg/ml), e metanólica (800,0 µg/ml), obtidas a partir de comprimidos de rabeprazol, expostas à radiação UVC, estão representados nas Figuras 5.11 e 5.12, respectivamente.

---

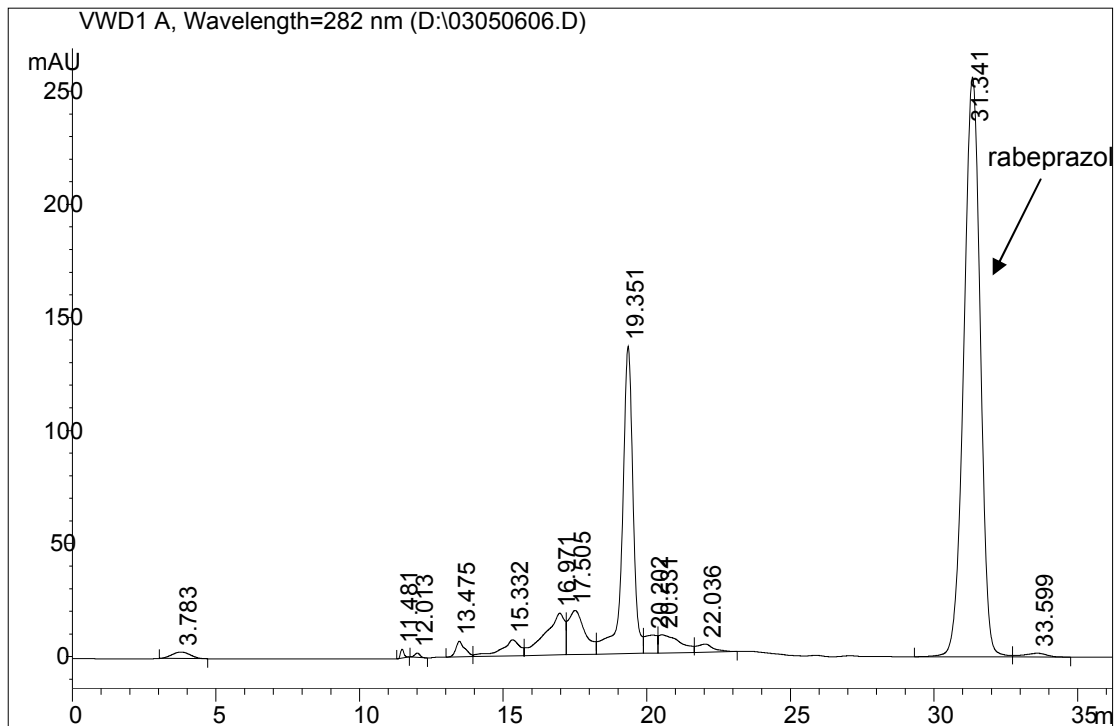


Figura 5.11 – Cromatograma de solução aquosa de rabeprazol sódico (800 µg/ml), exposta à luz UVC 254 nm (15W) por 1 hora. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

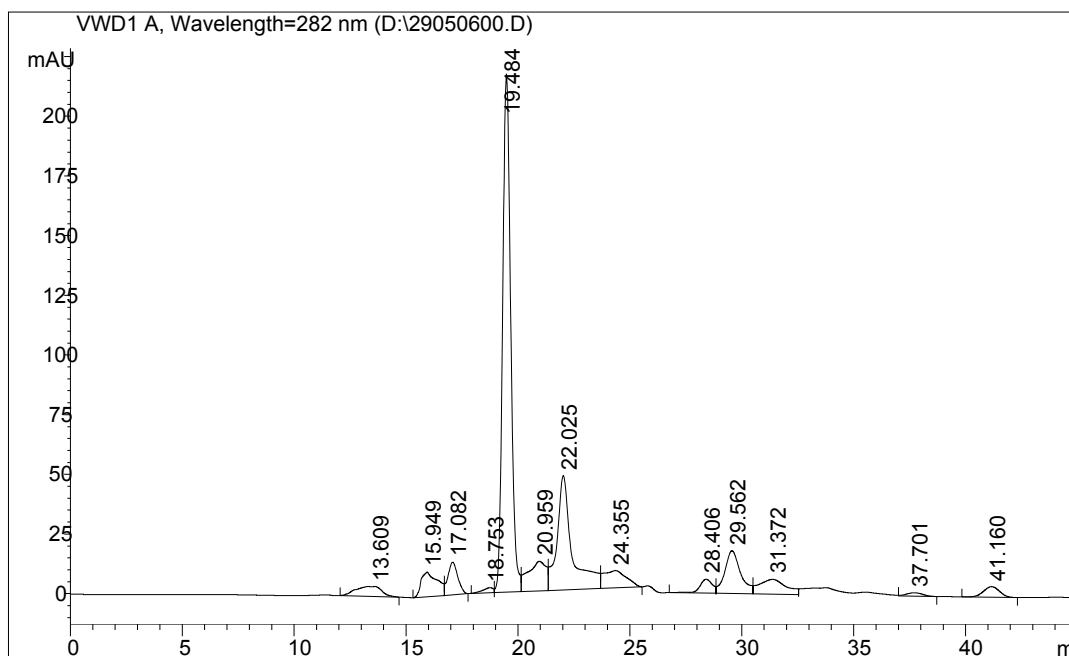


Figura 5.12 – Cromatograma de solução metanólica de rabeprazol sódico (800 µg/ml), exposta à luz UVC 254 nm (15W) por 1 hora. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

---

Após a exposição à radiação, as soluções tornam-se amareladas.

A análise dos comprimidos triturados demonstrou que a fotodegradação do fármaco na forma sólida é mais lenta, sendo possível observar produtos de degradação somente após 10 dias de exposição (Figura 5.13). Para os comprimidos intactos, não foi observada degradação significativa após 50 dias de exposição à lâmpada UVC (Figura 5.14).

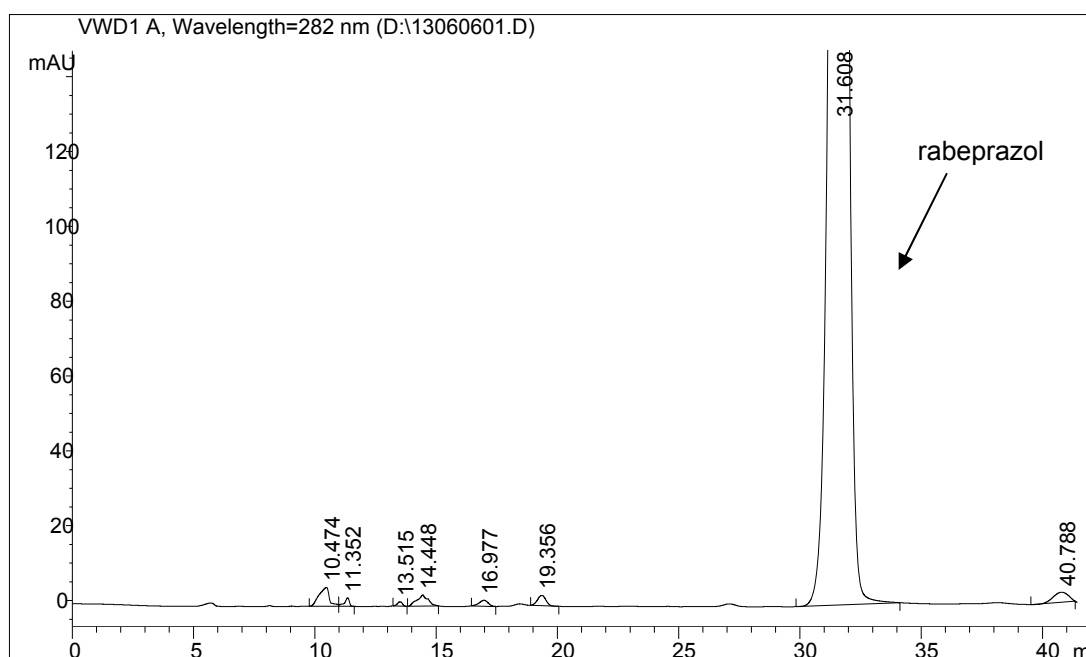


Figura 5.13 – Cromatograma ampliado de comprimido triturado de rabeprazol em acetonitrila (800 µg/ml), exposto à lâmpada UVC – 254 nm por 10 dias. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

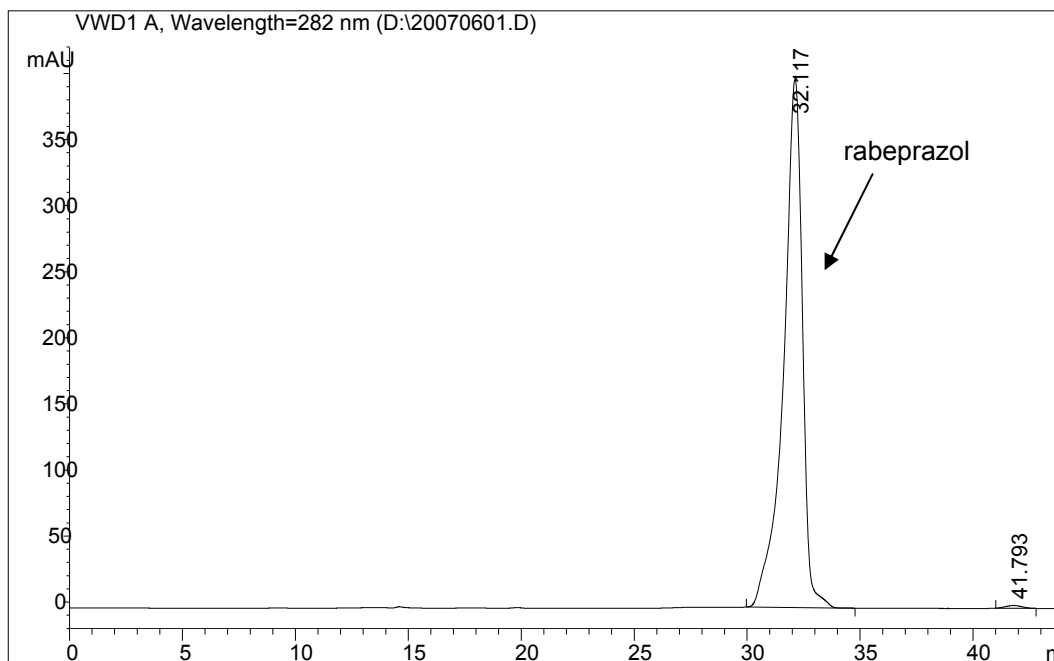


Figura 5.14 – Cromatograma de comprimido intacto de rabeprazol em acetonitrila (800 µg/ml), exposto à lâmpada UVC – 254 nm por 50 dias. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

#### 5.2.1.4.1.2 Discussão

A análise dos cromatogramas obtidos a partir das soluções aquosa e metanólica de rabeprazol demonstra a labilidade do fármaco à radiação sob estas condições. Vários produtos de degradação são formados em pequena quantidade e somente um é majoritário, com tempo de retenção em torno de 19 minutos, denominado DP19, o qual é formado em maior quantidade que em meio ácido.

De acordo com TONNESEN (2001), formas farmacêuticas como comprimidos devem ser trituradas a fim de gerar uma camada fina, com maior área de exposição. A degradação do fármaco frente à luz, na forma de comprimido triturado, gerou os mesmos produtos de degradação formados nas soluções, porém de forma mais lenta. Provavelmente, os excipientes da formulação exerçam algum tipo de proteção que impede a passagem da radiação. Este fato fica comprovado quando os comprimidos intactos são analisados. Mesmo após 50 dias de exposição à lâmpada não há observação de produtos de degradação no cromatograma. Neste tipo de

---

formulação, as reações acontecem na superfície, não afetando o interior da preparação (TONNESEN, 2001). A exposição por um período mais prolongado seria necessária, a fim de se obter dados mais conclusivos. Cabe salientar que o material de acondicionamento, no qual os comprimidos são comercializados, é um blíster aluminizado que impede a passagem da luz, o que sugere a preocupação do laboratório produtor em proteger a formulação.

#### **5.2.1.4.2 Lâmpada metal haleto (HPA 400 W)**

Esta fonte de radiação é uma das indicadas pelo ICH (1996b), e apresenta grande semelhança à luz solar, com emissão uniforme entre 350-550 nm (MOORE, 1996).

As amostras expostas à lâmpada foram soluções metanólicas e aquosas (800 µg/ml) de rabeprazol sódico, armazenadas em cubetas de quartzo de 10 mm, fechadas.

Tendo em vista o aquecimento da câmara, gerado pela lâmpada, um sistema de refrigeração foi utilizado, mantendo a temperatura em torno de 50 °C.

O tempo de exposição foi de 10 minutos, para a solução metanólica, e de 45 minutos para a solução aquosa.

##### **5.2.1.4.2.1 Resultados**

Os cromatogramas referentes às amostras em solução metanólica e aquosa (800 µg/ml), expostas à lâmpada metal haleto, estão representados nas Figuras 5.15 e 5.16, respectivamente.

---



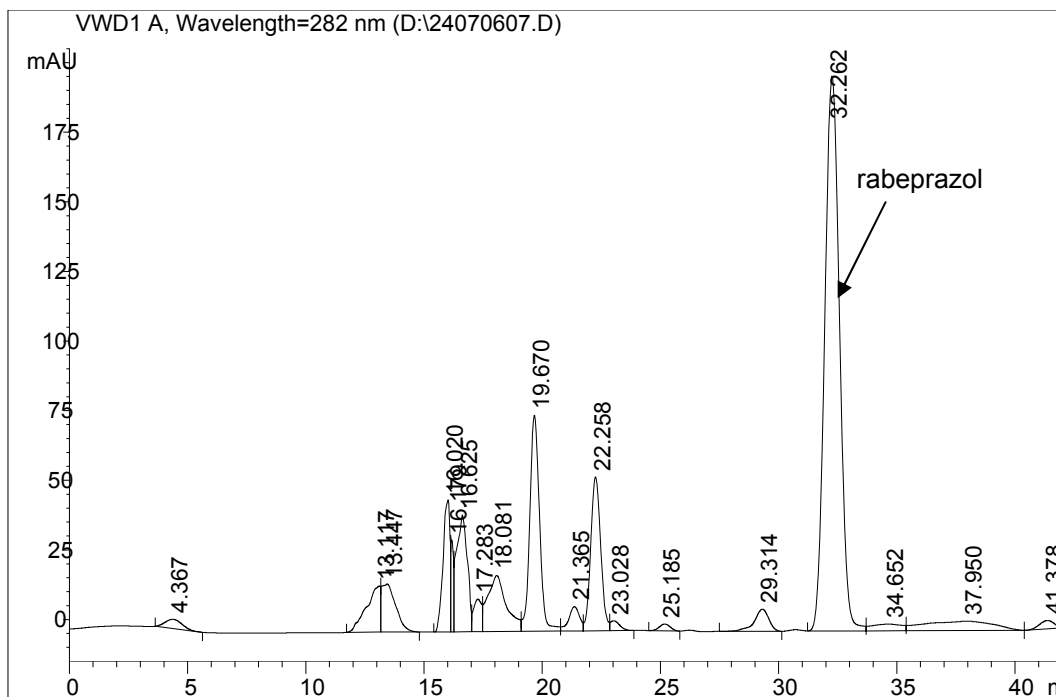


Figura 5.15 – Cromatograma de solução metanólica de rabeprazol sódico, exposta à lâmpada metal-haleto (400 W) por 10 minutos. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 μm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

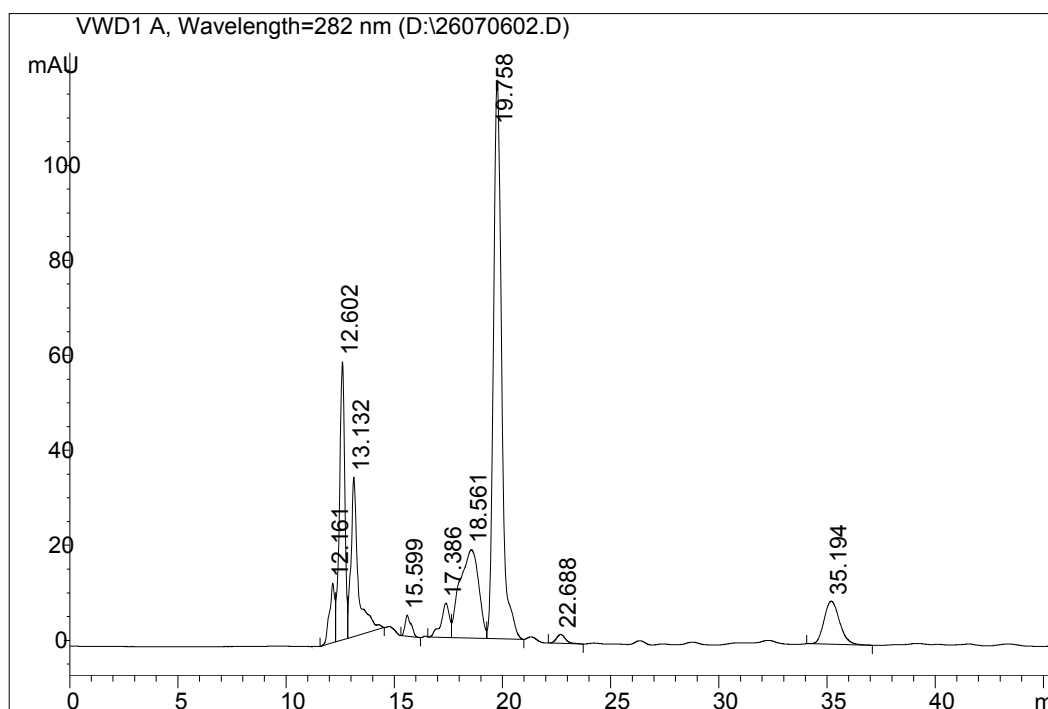


Figura 5.16 – Cromatograma de solução aquosa de rabeprazol sódico (800 μg/ml), exposta à lâmpada metal-haleto (400 W) por 45 minutos. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 μm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

---

#### 5.2.1.4.2.2 Discussão

A lâmpada metal-haleto é uma fonte luminosa bastante indicada para utilização em estudos de estabilidade, tendo em vista a semelhança da radiação gerada com a radiação solar. Entretanto, apresenta como desvantagens o alto custo, o curto período de utilização e o aquecimento das amostras provocado pela radiação, o qual pode influenciar os resultados (MOORE, 1996).

Os resultados obtidos indicaram que rabeprazol se degrada de forma muito intensa quando exposto a esta radiação em solução. Em apenas 10 minutos, observaram-se produtos de degradação na solução metanólica. A exposição por um período maior não foi possível, pois havia a evaporação do metanol. A água não sofreu este processo, o que possibilitou a exposição da solução aquosa por mais tempo.

A elevada temperatura (aproximadamente 50 °C), gerada pela fonte no interior da câmara, pode ter contribuído para a rápida degradação do fármaco frente à radiação. Apesar dos estudos preliminares de estabilidade térmica terem demonstrado que os comprimidos de rabeprazol permanecem estáveis por aproximadamente 20 dias à 50 °C, não foram realizados estudos sobre a estabilidade do fármaco em solução nestas condições.

A exposição dos comprimidos intactos e triturados a essa fonte de radiação seria importante, pois forneceria informações a respeito da estabilidade da formulação frente à radiação solar, uma vez que esta fonte simula tal condição.

É importante destacar que os produtos majoritários formados para as soluções expostas à lâmpada metal-haleto e à lâmpada UVC- 254 nm são os mesmos, principalmente o DP19.

Após os testes preliminares de estabilidade, onde foram avaliados a temperatura, o meio ácido, a presença de agente oxidante e a luz, optou-se por continuar o estudo trabalhando com a luz, tendo em vista a rápida degradação e a formação de um produto majoritário, passível de isolamento. A lâmpada UVC – 254 nm foi selecionada, pois apresenta um menor custo e não provoca o aquecimento das amostras. Além disso, seu tempo de vida útil é maior.

---

---

## **5.2.2 Cinética de degradação fotoquímica de rabeprazol**

Visando obter dados sobre a velocidade de degradação fotoquímica de rabeprazol, estudos acelerados de estabilidade foram realizados.

### **5.2.2.1 Condições de estudo**

A amostra foi preparada a partir da trituração de dois comprimidos (20 mg cada), os quais foram dissolvidos em metanol, em balão volumétrico de 50 ml. A solução resultante foi filtrada em membrana de nylon de 0,45 µm e alíquotas de 2 ml foram transferidas para cubetas descartáveis (Brand, 10 mm de caminho ótico) fechadas com auxílio de Parafilm<sup>®</sup>. As cubetas foram dispostas no interior da câmara, a uma distância de 10 cm da lâmpada UVC- 254 nm (15 W – Philips). A temperatura no interior da câmara manteve-se inferior a 25 °C. Os períodos de exposição foram: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos (n = 3).

Como controle, uma cubeta contendo 2 ml de solução metanólica de rabeprazol foi envolvida em papel alumínio e exposta à lâmpada por 50 minutos.

O acompanhamento da degradação do fármaco foi realizado por CLAE, conforme as condições descritas na Tabela 4.3 (Capítulo I). Após cada período de exposição, transferia-se 1 ml de cada cubeta para balões volumétricos de 20 ml e completava-se o volume com acetonitrila, obtendo-se a concentração final de 40 µg/ml. As análises foram feitas em triplicata.

Através dos resultados de concentração de rabeprazol, obtidos em cada tempo de exposição, construiu-se gráficos de concentração x tempo, log de concentração x tempo e 1/concentração x tempo, a partir dos quais pode-se estimar a ordem de reação para o fármaco, nas condições empregadas.

### **5.2.2.2 Resultados**

A Tabela 5.1 apresenta os resultados das concentrações de rabeprazol nas soluções metanólicas expostas à lâmpada UVC- 254 nm (15 W), em função do tempo, por CLAE.

---

Tabela 5.1 – Valores de concentração de rabeprazol em soluções metanólicas expostas à lâmpada UVC- 254 nm (15 W) por CLAE.

Tempo (minutos)	Concentração (µg/ml)*	DPR
0	40,00	1,70
5	32,15	1,35
10	25,39	1,01
15	19,40	3,86
20	14,42	2,70
25	10,02	4,00
30	4,68	0,90

\* cada valor é média de três determinações  
DPR = desvio padrão relativo

A partir dos dados experimentais de concentração, determinou-se a ordem de reação seguida pela amostra, utilizando-se como base a correlação existente entre as duas variáveis (concentração e tempo) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Valores dos coeficientes de correlação, considerando diferentes ordens de reação, obtidos a partir de soluções metanólicas de rabeprazol expostas à lâmpada UVC- 254 nm (15 W).

Tempo (min)	Reação de ordem zero Concentração de rabeprazol (µg/ml)	Reação de primeira ordem log da concentração	Reação de segunda ordem 1/Concentração
0	40,00	1,6021	0,0250
5	32,15	1,5072	0,0311
10	25,39	1,4047	0,0394
15	19,40	1,2878	0,0515
20	14,42	1,1591	0,0693
25	10,02	1,0007	0,0998
30	4,68	0,6708	0,2134
r*	0,9950	0,9731	0,8578

\* coeficiente de correlação

---

A partir da avaliação dos coeficientes de correlação obtidos para cada combinação de valores, é possível verificar qual descreve uma reta, o que indicará a ordem de reação (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

Nas condições estudadas, observou-se que a cinética de reação que melhor descreve a redução da concentração de rabeprazol em função do tempo é a ordem zero. A Figura 5.17 representa o perfil de concentração de rabeprazol em função do tempo e a equação da reta correspondente.

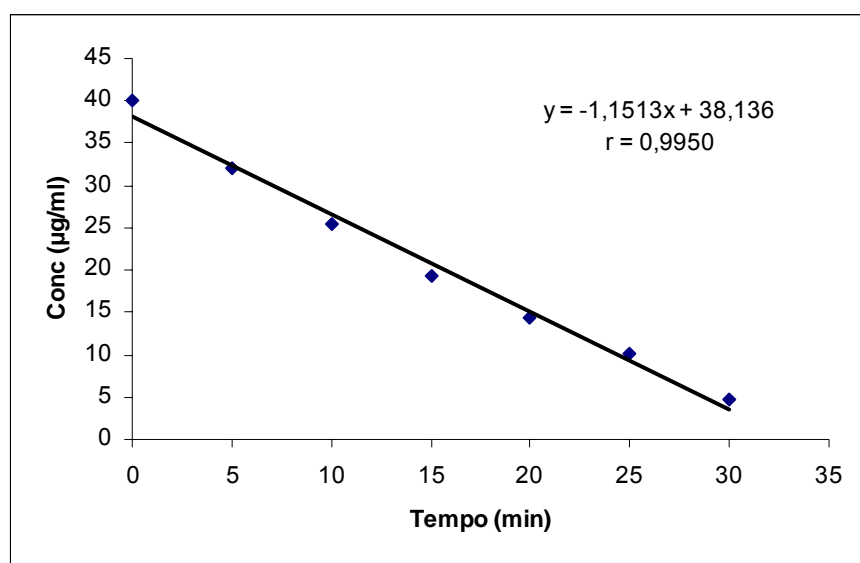


Figura 5.17 – Representação gráfica da fotodegradação de rabeprazol em solução metanólica, em função do tempo, expostas à lâmpada UVC- 254 nm (15 W).

Após a determinação da ordem de reação, pode-se calcular os valores das velocidades de degradação (K) para cada tempo (t), a partir da equação  $K = (C_0 - C)/t$ , onde  $C_0$  corresponde à concentração inicial de rabeprazol e C à concentração de rabeprazol no tempo “t”. O valor de K médio foi, então, obtido a partir da média aritmética dos valores de K para cada tempo. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.3.

A análise da amostra mantida em cubeta descartável, envolvida por papel alumínio, demonstrou que não houve degradação do fármaco.

---

---

Tabela 5.3 – Valores de velocidade de degradação (K) de rabeprazol, obtidos segundo cinética de ordem zero, em solução metanólica.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Conc. de rabeprazol (µg/ml)</b>	<b>Valores de K (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>K médio</b>
0	40,00	-	
5	32,15	1,572	
10	25,39	1,461	
15	19,40	1,373	1,343
20	14,42	1,278	
25	10,02	1,199	
30	4,68	1,177	

### 5.2.2.3 Discussão

O método por CLAE, validado para determinação de rabeprazol na forma farmacêutica, demonstrou ser adequado para estudos de estabilidade, pois não há interferência dos picos referentes aos produtos de degradação na análise.

Testes preliminares de estabilidade haviam demonstrado que a luz é um fator importante para a degradação de rabeprazol, mas não havia dados sobre a velocidade das reações. Assim, foi realizado o estudo da cinética de fotodegradação do fármaco, em condições de estresse, a fim de auxiliar os estudos de isolamento posteriores.

Os resultados apontaram uma degradação superior a 88% em 30 minutos de exposição, o que não foi observado na análise da amostra protegida da luz, que manteve sua concentração inalterada. Este fato comprova que a redução da concentração de rabeprazol, observada durante o estudo, foi decorrente apenas da exposição à radiação UVC.

A análise dos coeficientes de correlação obtidos para cada reta traçada, indicou que o processo de fotodegradação de rabeprazol pode ser descrito por uma

---

---

cinética de ordem zero, nas condições utilizadas no estudo. Assim, de acordo com o conceito de reação de ordem zero, a degradação de rabeprazol sob efeito de radiação UVC-254 nm, independe de sua concentração na solução metanólica.

O trabalho de EL-GINDY e colaboradores (2003) descreve um estudo de cinética de reação para rabeprazol em solução aquosa quando exposto à lâmpada de tungstênio (40 W), em presença de peróxido de hidrogênio 33,3% e em tampão Britton-Robinson pH 7,0, sob temperaturas entre 30 e 60 °C. Para todas as condições, foi constatado que a degradação de rabeprazol ocorre segundo uma cinética de pseudo-primeira ordem. Os tempos de exposição a cada fator de degradação não são citados. As diferenças observadas podem ser atribuídas às diferentes condições de estudo.

### **5.2.3 Isolamento de produtos de degradação**

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no *Departamento de Química Orgánica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires* (Argentina), durante o estágio de doutorado, sob orientação da Professora Doutora Norma Sbarbati Nudelman.

Considerando que o fármaco se degrada rapidamente, quando em solução, frente à luz UVC- 254 nm e que os produtos formados são semelhantes àqueles gerados pela exposição dos comprimidos triturados, às mesmas condições de degradação, e pela exposição à lâmpada metal haleto, optou-se por isolar os produtos oriundos da fotodegradação de rabeprazol. Além disso, não foi possível obter um perfil de degradação reprodutível para o meio ácido, enquanto que um produto majoritário era formado na luz.

Sendo assim, iniciou-se o estudo acelerado de estabilidade fotoquímica, onde foram testados diferentes métodos de separação: cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia em coluna.

As amostras de rabeprazol em solução metanólica eram submetidas à lâmpada UVC-254 nm (15 W), em cubetas de plástico descartáveis, fechadas, por 1 hora, a uma distância de 10 cm da lâmpada.

---

---

### **5.2.3.1 Cromatografia em camada delgada preparativa**

Foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (MERCK), preparadas no laboratório, com espessura de 0,75 mm e, como sistema eluente, clorofórmio-metanol (85:15, v/v). As soluções metanólicas, submetidas à radiação na concentração de 800 µg/ml, foram concentradas em evaporador rotatório e aplicadas nas placas. Estas foram transferidas para cubas, previamente saturadas com sistema eluente, e o cromatograma foi desenvolvido. As manchas foram visualizadas com luz ultravioleta (254 nm), marcadas e raspadas. O material impregnado na sílica foi extraído com três porções de 10 ml de metanol e filtrado a vácuo, através de filtro de vidro sinterizado.

### **5.2.3.2 Cromatografia em coluna**

Para o desenvolvimento desta técnica, foi utilizada uma coluna de vidro de aproximadamente 22 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, empacotada com gel de sílica (0,063-0,200 mm - MERCK) disperso em diclorometano.

A amostra, soluções metanólicas de rabeprazol (1,6 mg/ml), submetidas à radiação por 1 hora, foram misturadas com uma pequena quantidade de sílica para coluna e secas em evaporador rotatório. O pó resultante foi transferido para o topo da coluna e coberto com uma porção de algodão (GALAGOVSKY, 2002).

Para eluição, utilizou-se diclorometano-metanol, em diferentes proporções, no volume de 30 ml. Para cada proporção, foram coletadas três frações de 10 ml.

O conteúdo de cada fração foi concentrado em evaporador rotatório e analisado por CCD, utilizando como fase móvel diclorometano – metanol (90:10, v/v). As frações contendo produtos de degradação eram analisadas por CLAE, em coluna semipreparativa C<sub>18</sub>, para verificação do tempo de retenção dos produtos e da pureza.

---



As frações de interesse que estivessem impuras eram purificadas por CCD preparativa em placas de gel de sílica, utilizando como eluente diclorometano-metanol (90:10, v/v).

Além das técnicas de isolamento, foi realizada a análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13, em espectrômetro de 200 MHz (Bruker), do resíduo obtido por secagem, em evaporador rotatório, da solução metanólica de rabeprazol (800 µg/ml) exposta à radiação UVC por 1 hora. O solvente utilizado para a dissolução do resíduo foi clorofórmio deuterado. A partir deste experimento, obteve-se o produto denominado DPclorofórmico.

Uma representação esquemática do isolamento dos produtos de fotodegradação de rabeprazol pode ser observada na Figura 5.18.

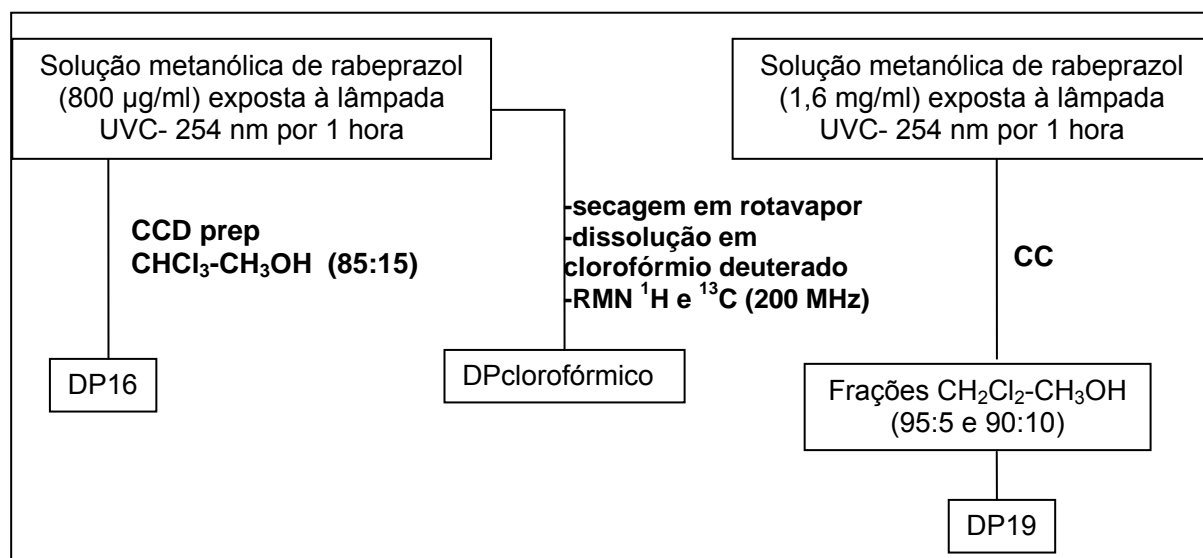


Figura 5.18 – Representação esquemática do isolamento dos produtos de fotodegradação de rabeprazol sódico. CCD prep: cromatografia em camada delgada preparativa; CC: cromatografia em coluna.

### 5.2.3.3 Resultados

Através da técnica de CCD preparativa, verificou-se a presença de várias manchas bastante unidas, e uma, de Rf menor, isolada. A análise por CLAE, com coluna semipreparativa, do extrato proveniente desta mancha demonstrou tratar-se de um produto impuro com tempo de retenção de 16 minutos, denominado DP16 (Figura 5.19). O pico em 13 minutos se refere ao metanol (solvente).

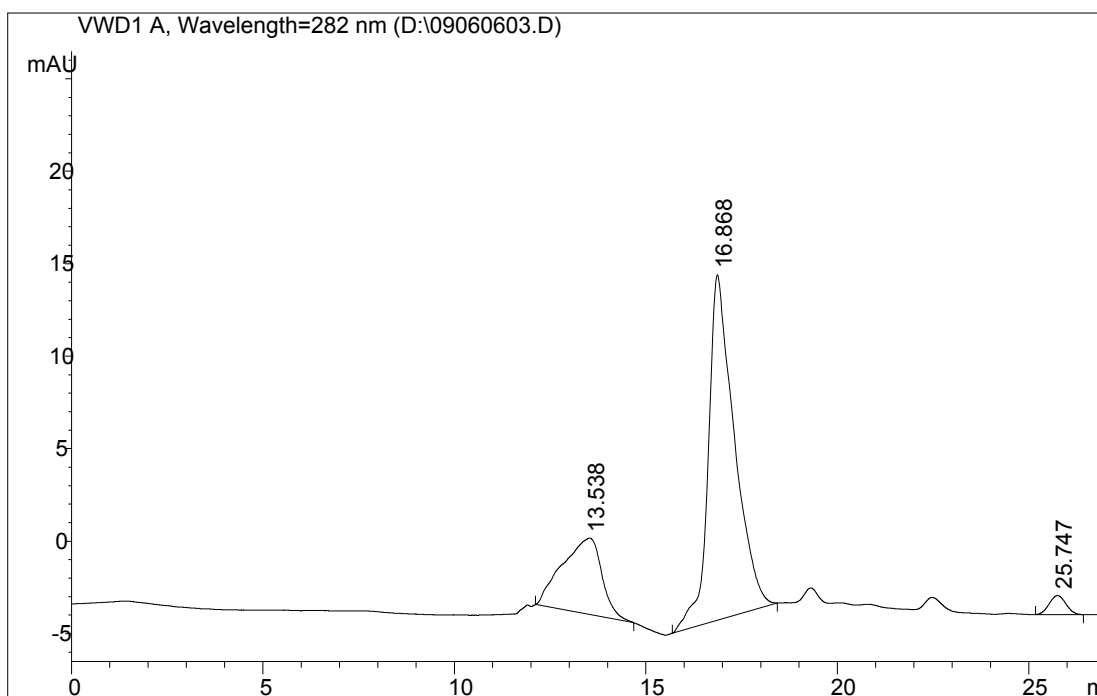


Figura 5.19 – Cromatograma do produto de degradação isolado por CCD preparativa a partir de solução metanólica de rabeprazol, exposta à lâmpada UVC- 254 nm por 1 hora. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

Após realização de diversas placas, foi possível obter 20 mg do produto DP16 puro. O mesmo apresentou-se como pó branco e foi mantido em dessecador até ser enviado para análise por RMN, para elucidação da estrutura.

A cromatografia em coluna possibilitou separar diversos produtos de degradação, sendo que logo nas primeiras frações (proporções 95:5 e 90:10) foi possível obter o produto majoritário, denominado DP19, juntamente com outros dois produtos (Figura 5.20).

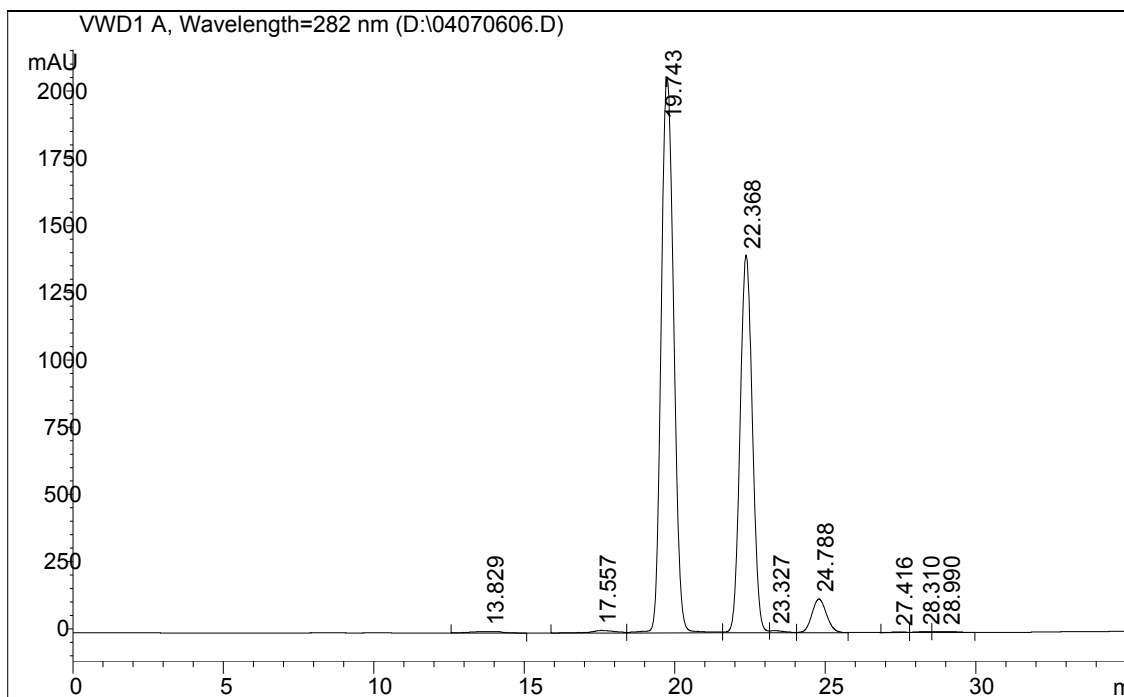


Figura 5.20 – Cromatograma da fração 3 da coluna, eluída com diclorometano-metanol, proporção 90:10, v/v. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5  $\mu$ m); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

A purificação em CCD preparativa foi realizada e o rendimento do produto DP19 foi de 8 mg (Figura 5.21).

Após a realização de outras três colunas, foram obtidos 20 mg do produto DP19, que foram mantidos em dessecador até a análise por RMN, para elucidação da estrutura.

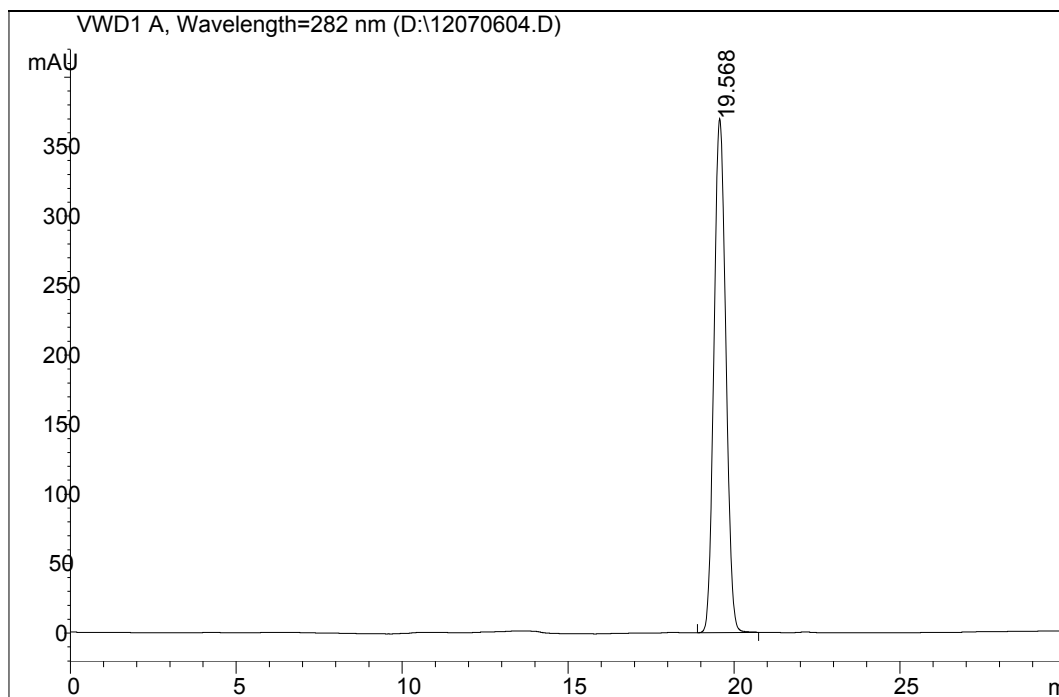


Figura 5.21 – Cromatograma do produto de degradação DP19, após purificação em CCD preparativa. Condições cromatográficas: coluna Hypurity semipreparativa C18 (250 × 10 mm, 5 μm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

Os espectros de RMN de hidrogênio e de carbono, referentes ao resíduo da solução de rabeprazol, exposta à radiação, dissolvido em clorofórmio deuterado, apresentou muito ruído e alguns sinais significativos, indicativos de uma estrutura condizente a de um produto de degradação (DPclorofórmico). Estes espectros serão apresentados e discutidos no item referente à identificação dos produtos de degradação.

#### 5.2.3.4 Discussão

A etapa de isolamento pode ser considerada a mais complexa dentro de um estudo de estabilidade, pois diversos fatores devem ser avaliados para se obter a melhor técnica e condição de separação.

Diferentes métodos foram testados a fim de isolar os produtos da fotodegradação de rabeprazol. As primeiras tentativas objetivaram separar os produtos por cromatografia em camada delgada preparativa e, para tanto, foram testados diversos sistemas eluentes. O sistema utilizando clorofórmio-metanol

---

(85:15, v/v) mostrou ser o mais adequado para o isolamento de um produto minoritário (DP16). As demais manchas ficaram muito próximas, impedindo a separação sem contaminação.

A partir de então, empregou-se a cromatografia em coluna, a qual possibilitaria o isolamento de maior quantidade de produto. Foram testados como sistemas eluentes clorofórmio-metanol e diclorometano-metanol. O primeiro demonstrou não ser reproduzível, provavelmente pela formação de artefatos durante o experimento. Por outro lado, o segundo sistema foi de grande êxito no isolamento do produto majoritário (DP19), o qual era eluído nas primeiras frações coletadas.

O isolamento do produto de degradação com tempo de retenção de 22 minutos (Figura 5.20), bastante concentrado nas frações contendo DP19, não foi possível devido à sua contaminação com um produto fluorescente, que não permitiu purificação nas condições testadas.

O objetivo da realização do espectro de ressonância magnética nuclear do resíduo proveniente da solução metanólica, exposta à radiação, foi, inicialmente, a identificação do produto de degradação majoritário, uma vez que estando em grande quantidade, seus sinais se sobressairiam em um espectrômetro de menor sensibilidade. Entretanto, foi possível observar que a utilização de clorofórmio como solvente possibilitou a dissolução de um outro produto, diferente do considerado majoritário (DP19), conforme descrito no item a seguir.

#### **5.2.4 Identificação dos produtos de degradação**

Os espectros de RMN de hidrogênio, de carbono, e os espectros de correlação COSY, HSQC e HMBC, dos produtos de degradação DP16 e DP19 foram obtidos em espectrômetro Bruker TopSpin de 500 MHz, utilizando metanol deuterado (Aldrich) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os espectros do produto DPclorofórmico foram realizados em espectrômetro Bruker de 200 MHz, utilizando clorofórmio deuterado (Aldrich) como solvente. As análises foram realizadas na UMYMFOR (Argentina), descrito anteriormente no item 4.2.1.2.

Para o produto DP16 foram utilizados 20 mg na realização do espectro e para DP19, 10 mg.

---

## 5.2.4.1 Resultados e Discussão

### 5.2.4.1.1 DP16

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto de degradação DP16 estão representados nas Figuras 5.22 e 5.23, respectivamente.

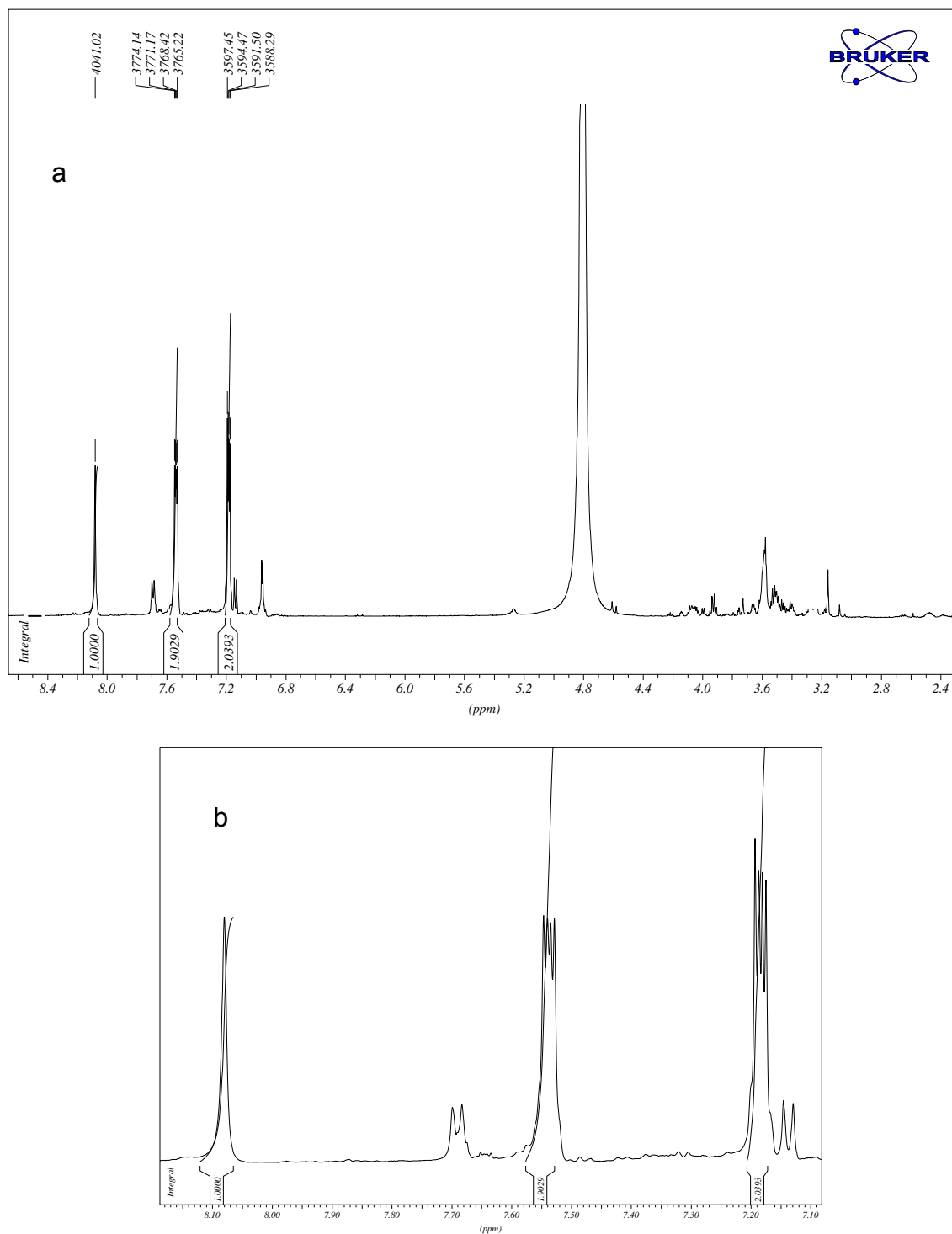


Figura 5.22 – Espectro de RMN de hidrogênio do produto de degradação DP16, em metanol deuterado (500MHz) (a), ampliação da região aromática (b).

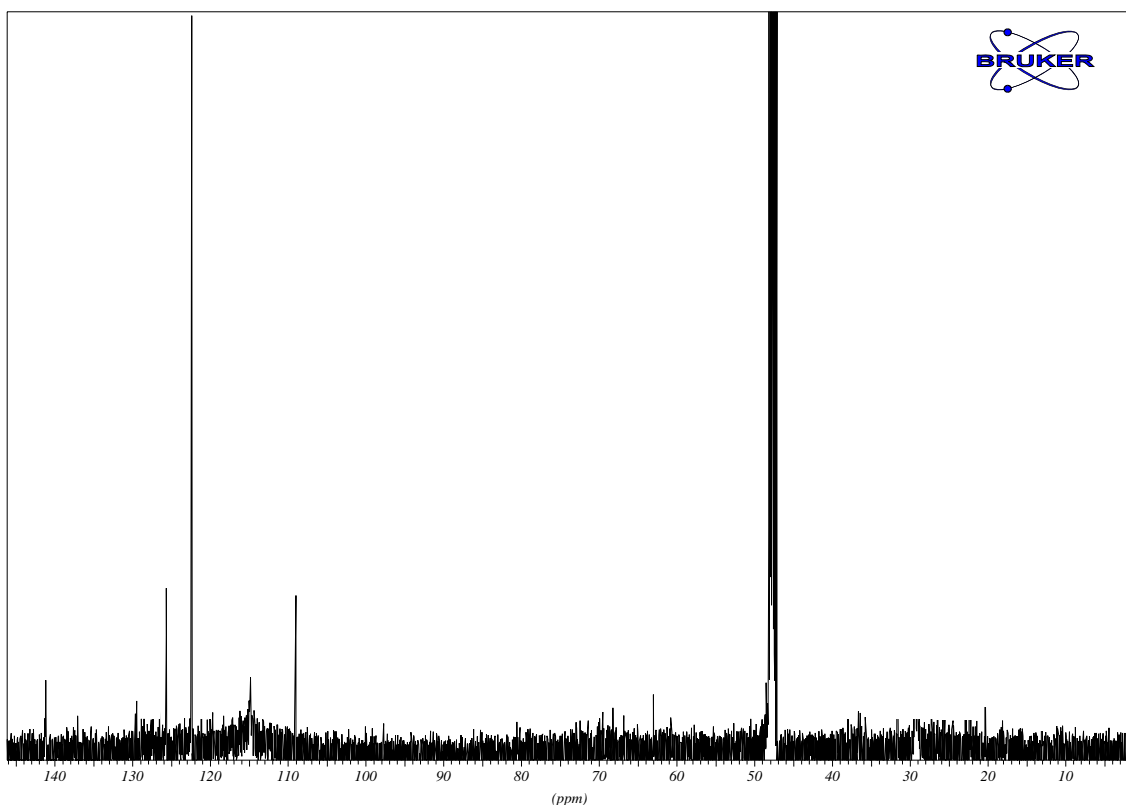


Figura 5.23 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C do produto de degradação DP16 em metanol deuterado (500MHz).

A análise dos espectros obtidos para DP16 possibilitou verificar que houve grande alteração quando comparados com os espectros de rabeprazol. É possível observar a eliminação dos sinais referentes à região alifática e a mudança na região aromática, com ausência dos sinais referentes ao anel piridínico. Os sinais pequenos, observados principalmente no espectro de hidrogênio, pertencem a impurezas.

Os espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC, que indicam as correlações existentes entre os hidrogênios e entre hidrogênios e carbonos estão representados nas Figuras 5.24, 5.25 e 5.26, respectivamente.

---

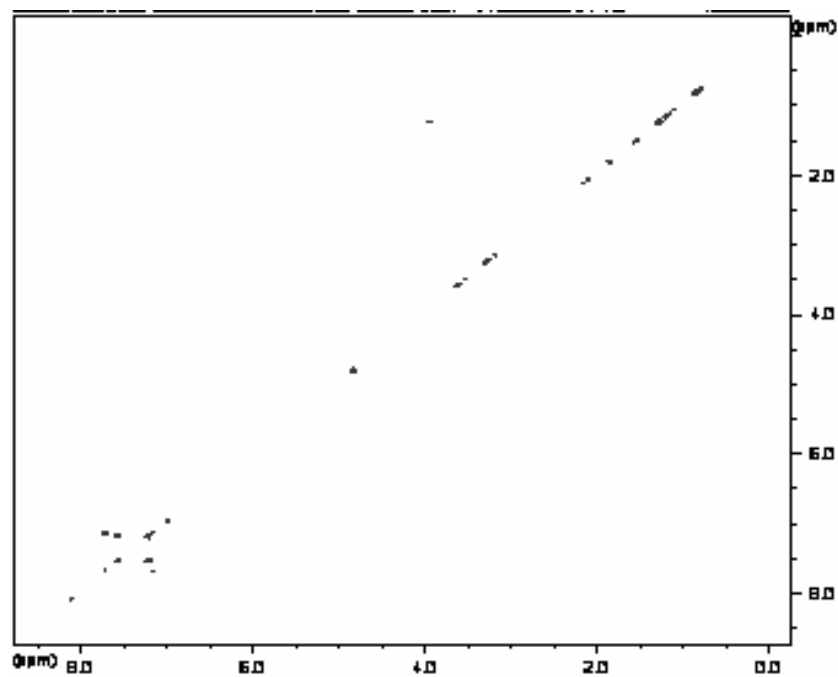


Figura 5.24 – Espectro COSY do produto de degradação DP16, em metanol deuterado (500 MHz).

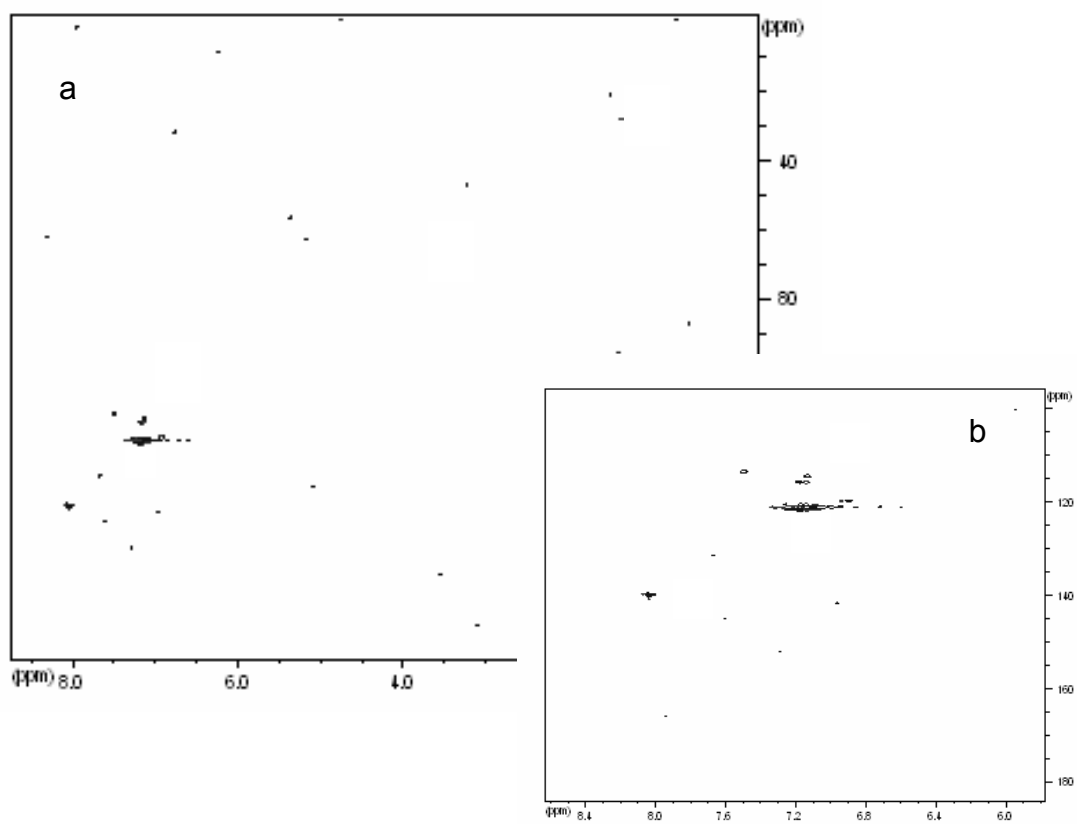


Figura 5.25 – Espectro HSQC do produto de degradação DP16, em metanol deuterado (500 MHz) (a), ampliação da região aromática (b).



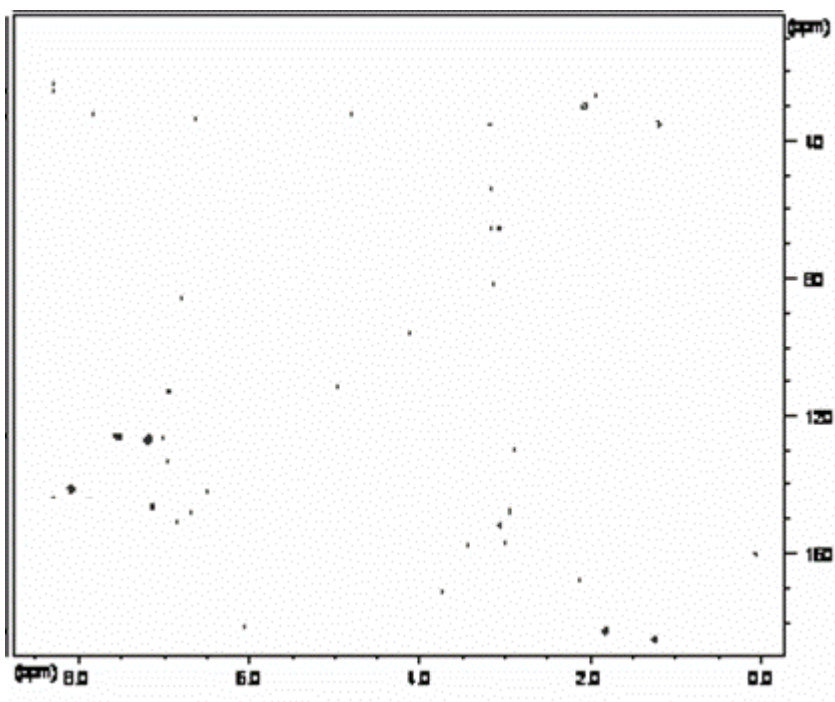


Figura 5.26 – Espectro HMBC do produto de degradação DP16 em metanol deuterado (500 MHz).

A Tabela 5.4 descreve os dados obtidos a partir dos espectros do produto de degradação DP16 e as atribuições realizadas.

Tabela 5.4 – Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC,  $^1\text{H}$ , COSY e HMBC, em metanol deuterado, do produto de degradação DP16.

$^{13}\text{C}$ (ppm)/ atribuição	HSQC (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)	COSY (ppm)	HMBC (ppm)
47-48	4,9	metanol deuterado (solvente)		
107,92 / C4;7	7,55	m (2H) $J = 2,97/2,75/3,20$ Hz	H7,17	C126,28
121,00 / C5;6	7,17	m (2H) $J = 2,98/2,97/3,21$ Hz	H7,55	C126,28
126,28 / C8;9	-	-	-	-
140,11 / C2	8,08	s (1H)	-	-

m = multipleteo; s = singleto

---

Após a análise do conjunto de espectros obtidos para o DP16, verificou-se que há a ruptura da molécula de rabeprazol na região do grupamento sulfóxido, originando o anel benzimidazólico. A estrutura proposta está representada na Figura 5.27.

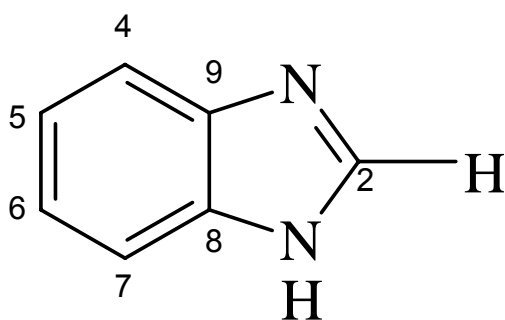


Figura 5.27 – Estrutura proposta para o produto de degradação isolado DP16: benzimidazol (1H-benzimidazol).

A observação dos espectros de hidrogênio e carbono do benzimidazol (DMSO-d), disponível em uma base de dados, (SDBS, 2006) auxiliou na atribuição da estrutura.

#### 5.2.4.1.2 DP19

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto de degradação DP19 estão representados nas Figuras 5.28 e 5.29, respectivamente.

---

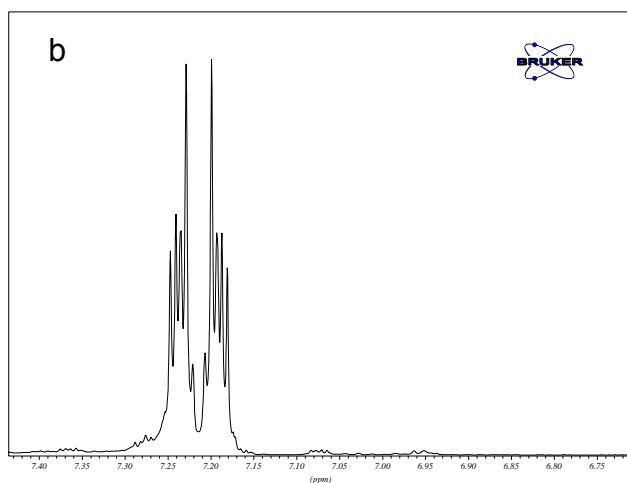
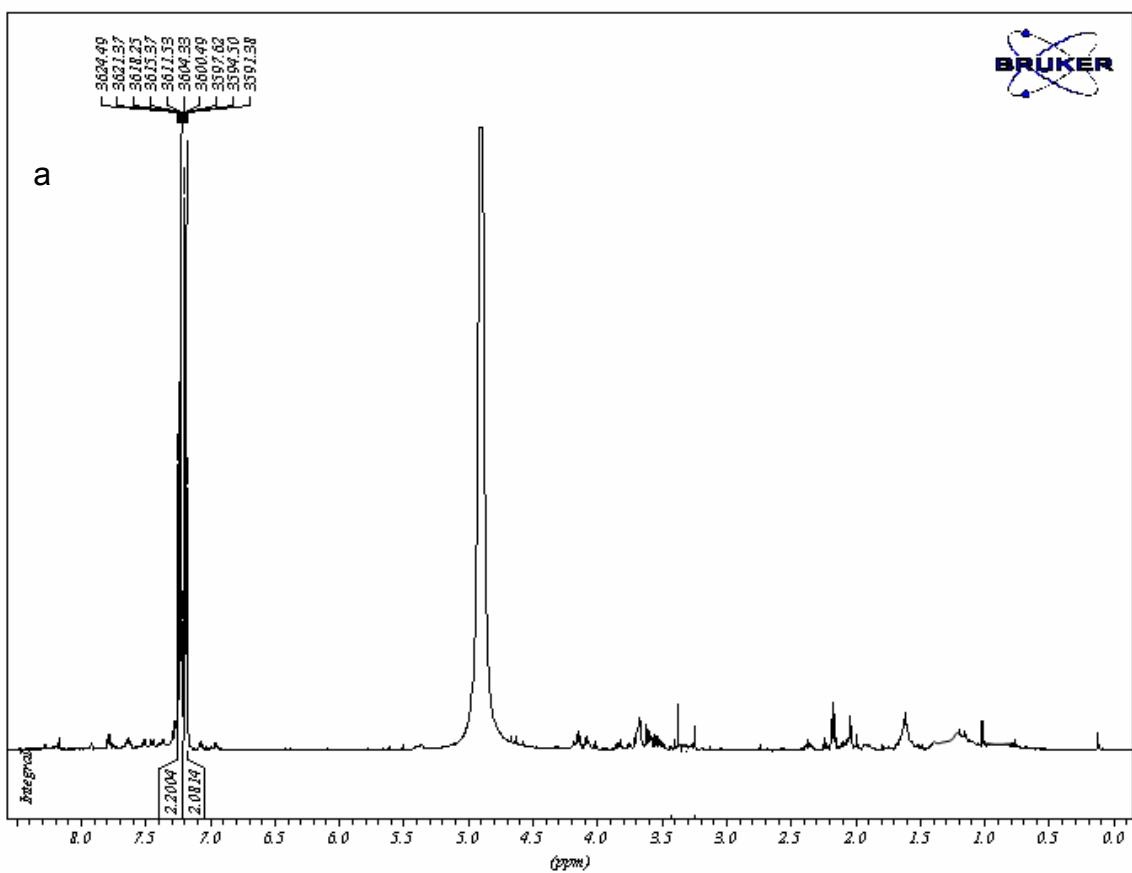


Figura 5.28 – Espectro de RMN de hidrogênio do produto de degradação DP19 em metanol deuterado (500 MHz) (a), ampliação da região aromática (b).

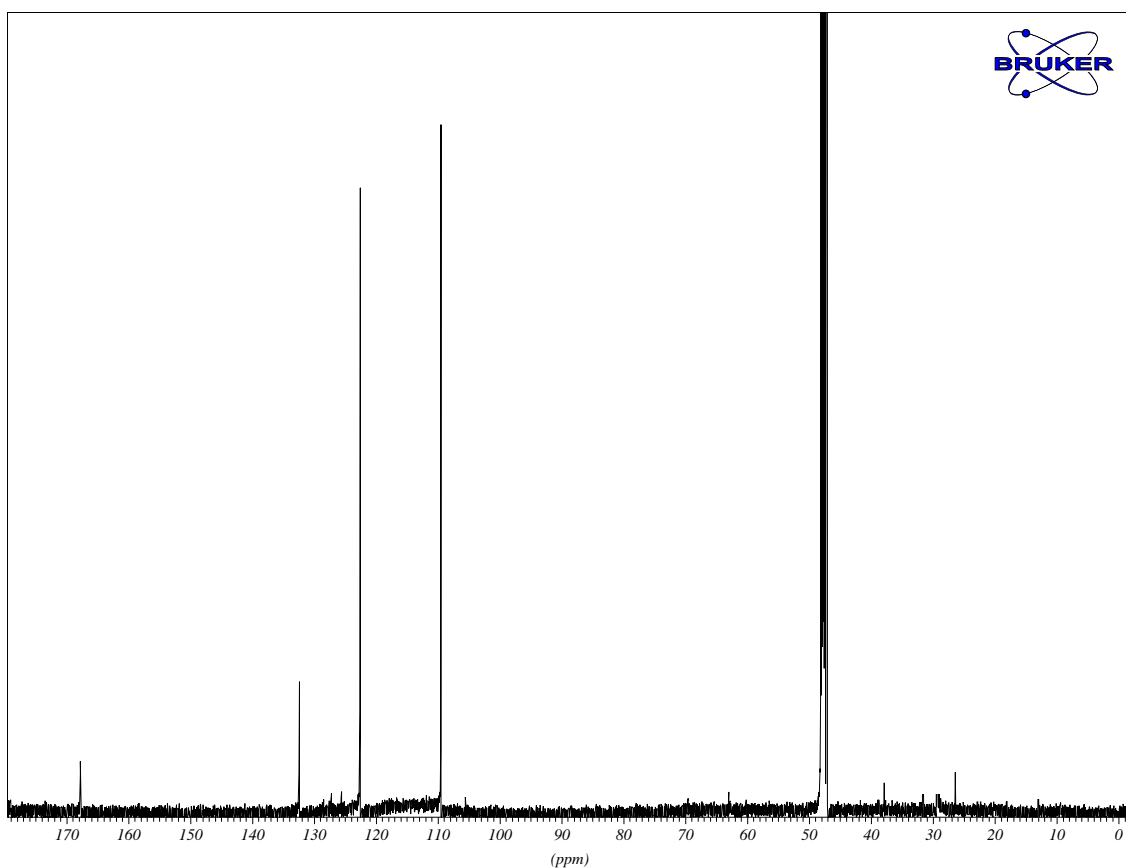


Figura 5.29 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).

Da mesma forma que para DP16, observa-se a grande modificação dos espectros de DP19 quando comparados com os obtidos para rabeprazol. Há o desaparecimento dos sinais na região alifática e a mudança nos sinais da região aromática, indicando ausência do anel piridínico. Também são observados sinais relativos a impurezas.

Os espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC estão representados nas Figuras 5.30, 5.31 e 5.32, respectivamente.

---

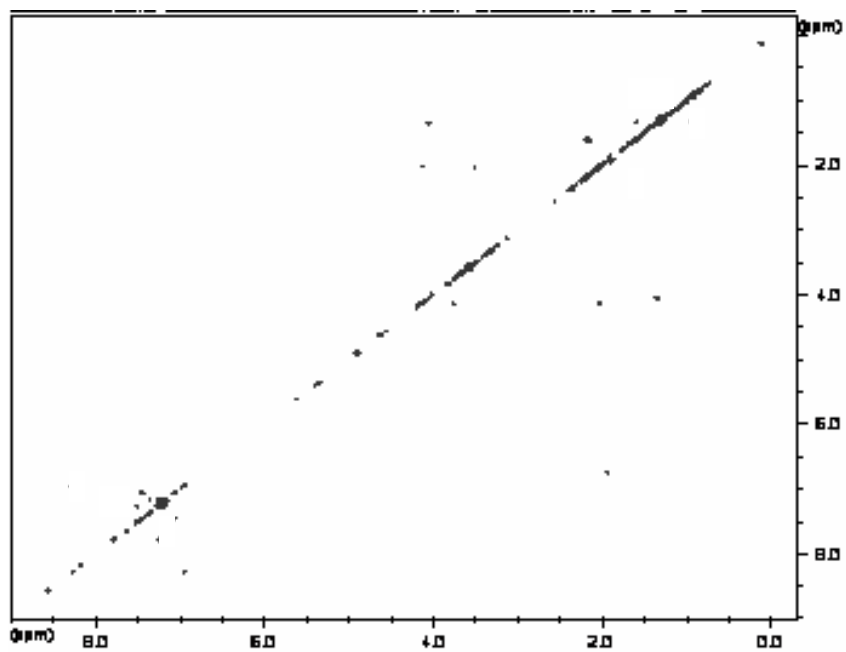


Figura 5.30 – Espectro COSY do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).

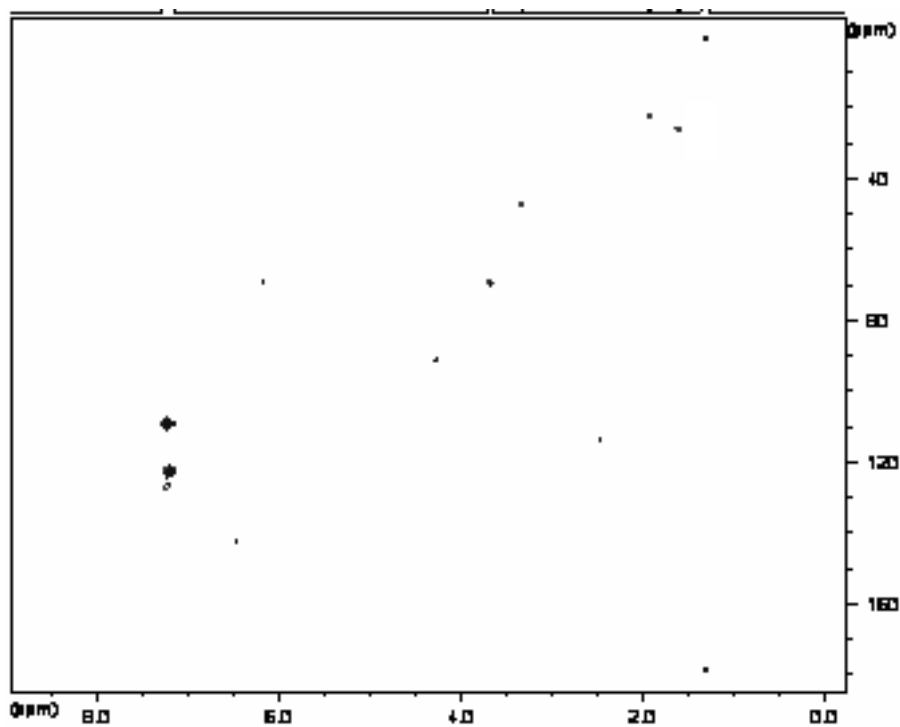


Figura 5.31 – Espectro HSQC do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).

---

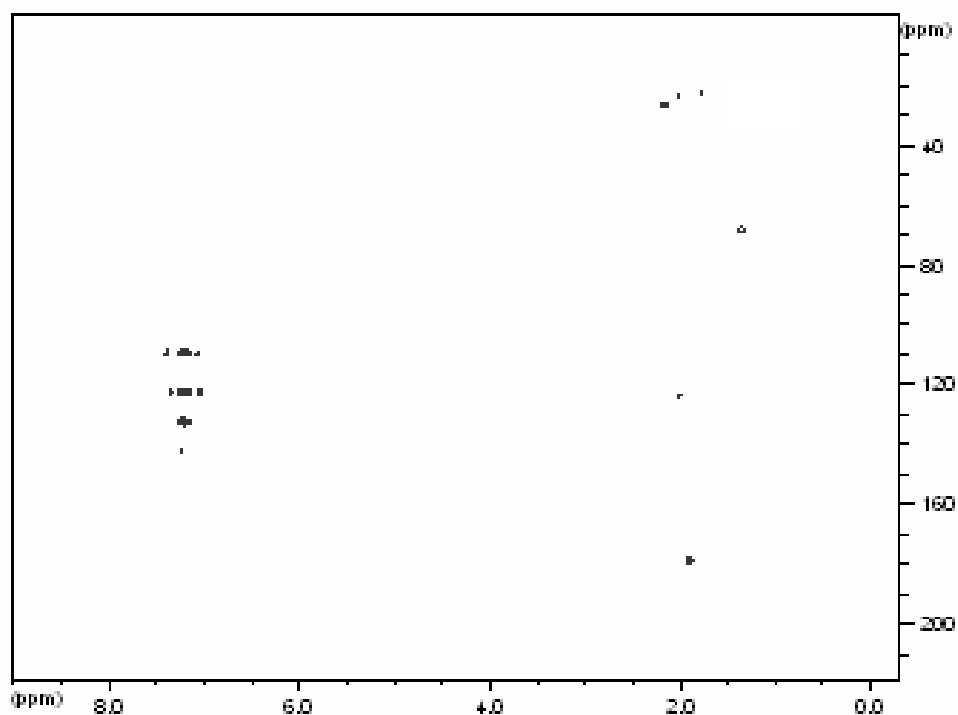


Figura 5.32 – Espectro HMBC do produto de degradação DP19 em metanol (500 MHz).

A Tabela 5.5 descreve os dados obtidos a partir dos espectros do produto de degradação isolado DP19 e as atribuições realizadas. É possível observar que o carbono com deslocamento químico de 167,78 ppm não correlaciona com nenhum hidrogênio no espectro HSQC, indicando tratar-se de um carbono quaternário, diferente do observado para DP16.

---

Tabela 5.5 – Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC,  $^1\text{H}$ , COSY e HMBC, em metanol deuterado, do produto de degradação DP19.

$^{13}\text{C}$ (ppm)/ atribuição	HSQC (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm)	COSY (ppm)	HMBC (ppm)
47-48	4,9	metanol deuterado (solvente)		
109,51 / C4;7	7,24	m (2H) $J = 3,84/2,88/3,12/3,12$ Hz	H7,19	C122,56
122,56 / C5;6	7,19	m (2H) $J = 3,12/3,12/2,87/3,84$ Hz	H7,24	C109,51/C132,43
132,43 / C8;9	-	-	-	-
167,78 / C2	-	-	-	-

m = multipleteo

Após a análise do conjunto de espectros obtidos para o DP19, verificou-se que para a formação deste produto de degradação há a ruptura da molécula de rabeprazol na região do grupamento sulfóxido, seguida da oxidação do carbono 2, originando a benzimidazolona. A estrutura proposta está representada na Figura 5.33.

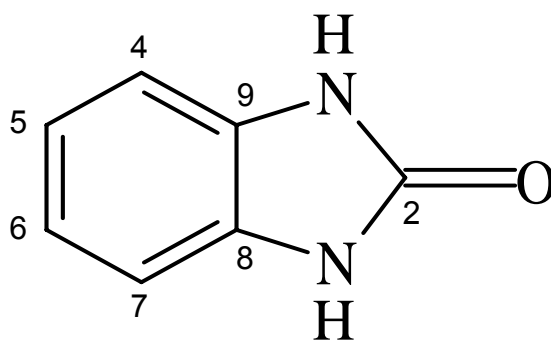


Figura 5.33 – Estrutura proposta para o produto de degradação isolado DP19: 1,3-diidro-benzimidazol-2-ona.

#### 5.2.4.1.3 DPclorofórmico

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto de degradação DPclorofórmico estão representados nas Figuras 5.34 e 5.35, respectivamente.

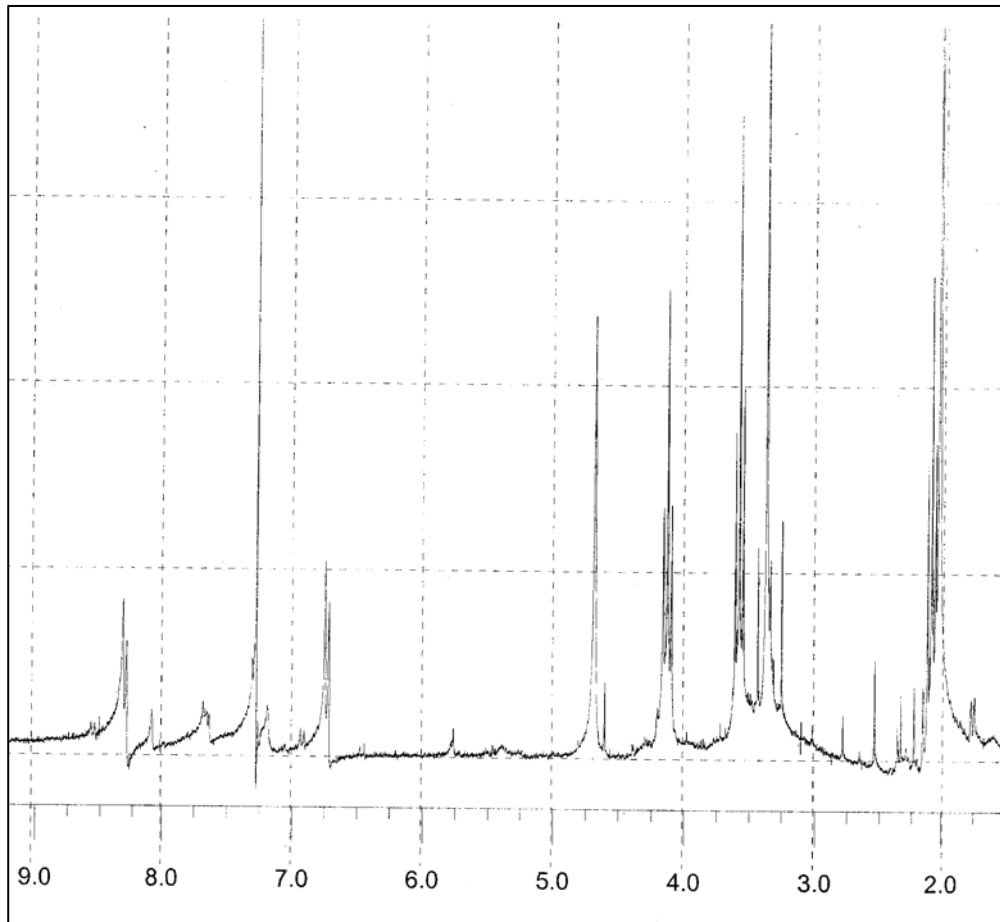


Figura 5.34 – Espectro RMN de hidrogênio do produto de degradação DPclorofórmico, em clorofórmio deuterado (200 MHz).



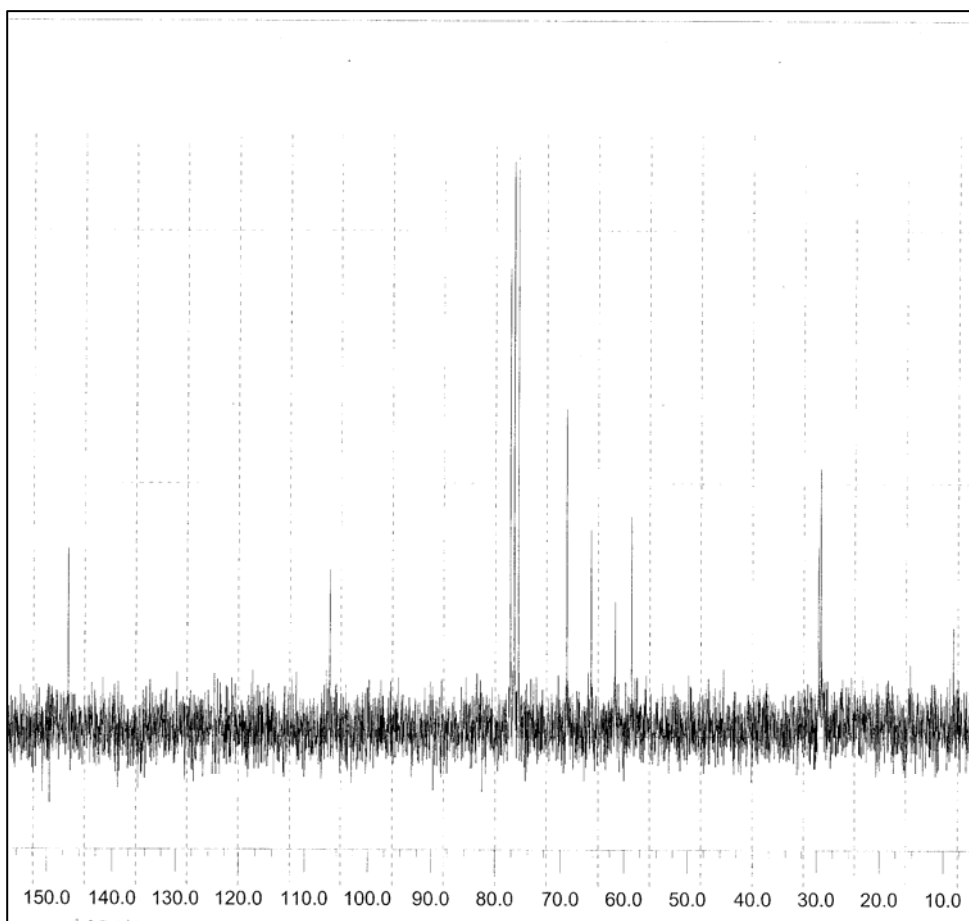


Figura 5.35 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do produto de degradação DPclorofórmico, em clorofórmio deuterado (200 MHz).

Os espectros bidimensionais não foram obtidos. Os valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e multiplicidade, observados no espectro de RMN de hidrogênio, bem como os sinais verificados no espectro de  $^{13}\text{C}$  e as atribuições, estão listados na Tabela 5.6.

---

Tabela 5.6 – Dados obtidos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto de degradação DPclorofórmico, em clorofórmio deuterado e espectrômetro Bruker de 200 MHz.

RMN – $^1\text{H}$		RMN – $^{13}\text{C}$	
Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade e n° hidrogênios	Deslocamento químico (ppm)	Atribuição (Figura 5.36)
2,0	s (3H)	9,5	C7'
2,15	m (2H)	29,0	C10'
3,3	s (3H)	58,0	C13'
3,6	t (2H)	66,0	C11'
4,2	t (2H)	68,5	C9'
4,7	s (2H)	63,0	C1
6,75	d (1H)	106,0	C5'
7,26	solvente	77,0	solvente
8,3	d (1H)	146,0	C6'

s = singleto; d= dubleto; t = tripleto; m = multipleto

Os carbonos quaternários C2', C3' e C4' não foram atribuídos, pois seus sinais são pequenos, misturando-se à região do ruído.

A observação dos espectros indica que a modificação na estrutura ocorreu na região aromática, quando comparados com os espectros de rabeprazol, uma vez que os sinais na região alifática foram preservados. É possível verificar que os sinais correspondentes ao anel piridínico (6,75 e 8,3 ppm) permaneceram, enquanto que os do anel benzimidazólico não estão mais presentes. Apesar da quantidade de sinais referentes a impurezas, foi possível fazer a elucidação da estrutura.

Os dados demonstram que o produto DPclorofórmico origina-se da mesma maneira que os demais produtos isolados: a partir da ruptura da molécula de rabeprazol na região do grupamento sulfóxido. Porém, neste caso, trata-se da outra porção da molécula.

A estrutura proposta para o produto de degradação DPclorofórmico encontra-se na Figura 5.36.

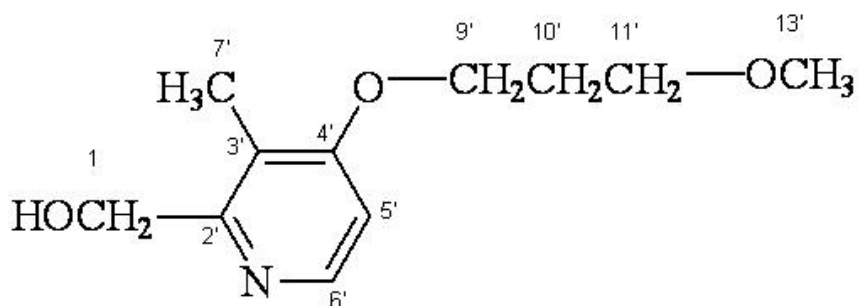


Figura 5.36 – Estrutura proposta para o produto de degradação DPclorofórmico: [4-(3-metoxi-propoxi)-3-metil-piridina-2-il]metanol.

Com a finalidade de confirmar as estruturas, uma amostra de benzimidazol comercial (Fluka) foi dissolvida em metanol e analisada, juntamente com os produtos de degradação isolados DP16 e DP19, através de CCD e CLAE. Além disso, uma alíquota da solução de benzimidazol foi exposta à radiação UVC por 90 minutos, enquanto outra foi tratada com peróxido de hidrogênio 30% e aquecida durante 30 minutos, visando observar se havia a formação de DP19 a partir da oxidação de DP16.

A CCD foi desenvolvida utilizando clorofórmio-metanol (85:15, v/v) como eluente e a solução de benzimidazol na concentração de 2,0 mg/ml. O perfil cromatográfico obtido está representado na Figura 5.37.

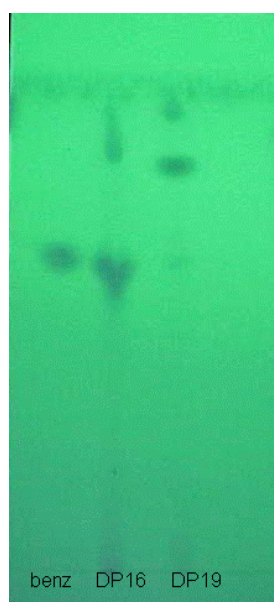


Figura 5.37 – Perfil cromatográfico das amostras benzimidazol (benz), DP16 e DP19, após revelação com luz ultravioleta.

---

Observa-se que as manchas referentes ao benzimidazol e ao DP16 apresentam um perfil de migração semelhante, enquanto DP19 migra mais. Estes dados sugerem que DP16 apresenta a mesma identidade do benzimidazol.

A análise por CLAE revelou valores de tempo de retenção próximos, conforme visualizado na Figura 5.38.

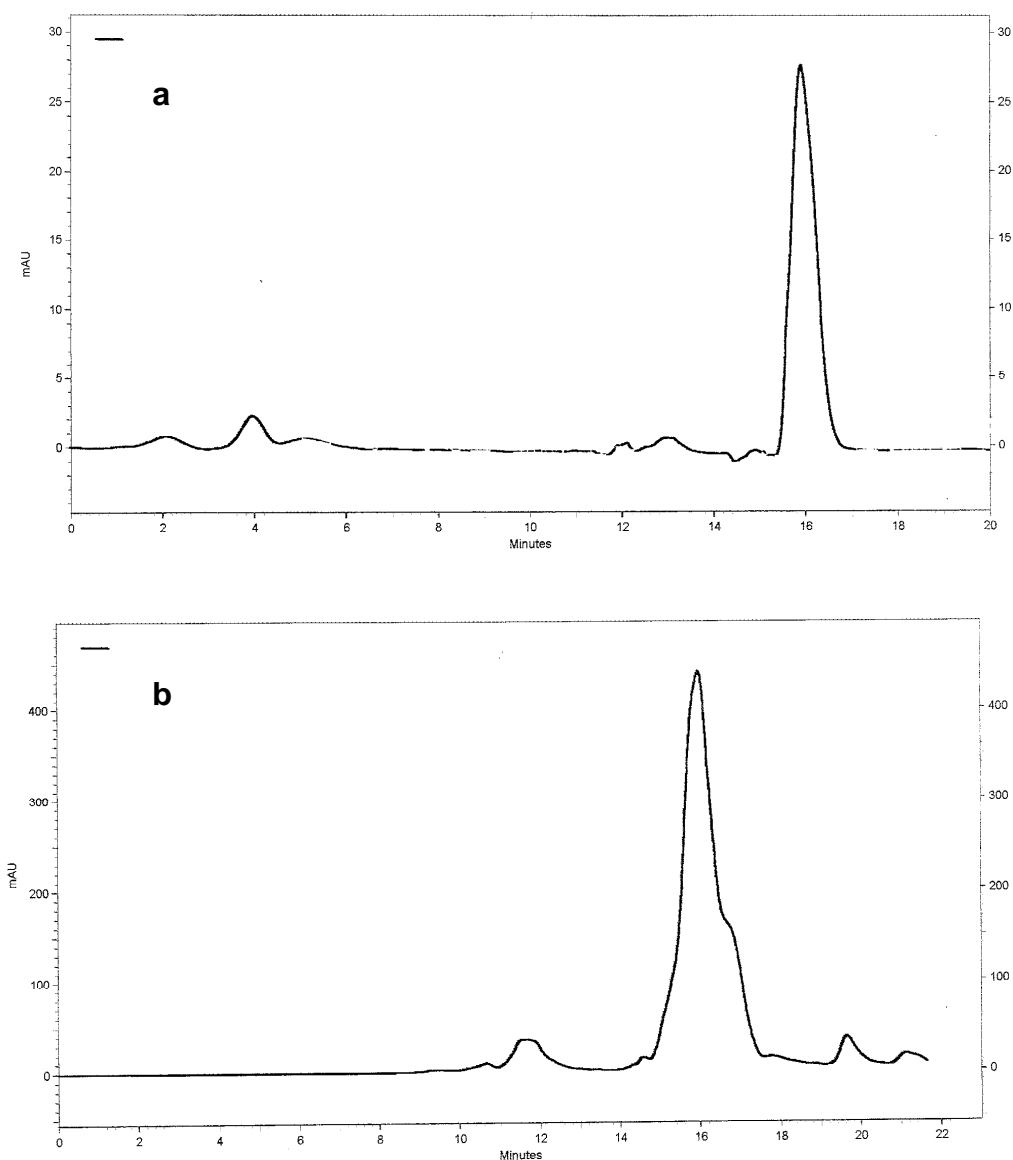


Figura 5.38 – Cromatogramas de benzimidazol (a) e DP16 (b), em metanol. Condições cromatográficas: coluna semipreparativa Hypurity C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

Estes resultados indicam que as amostras apresentam a mesma identidade.

---

---

O cromatograma da solução de benzimidazol, exposta à radiação UVC por 90 minutos, demonstrou o aparecimento de outro pico, com tempo de retenção de 18,3 minutos (Figura 5.39). Apesar do tempo de retenção ter sofrido uma pequena alteração, pode-se sugerir que há a formação do produto DP19 a partir da exposição da solução de benzimidazol à radiação UVC. A mudança no tempo de retenção pode ser atribuída à mudança de equipamento.

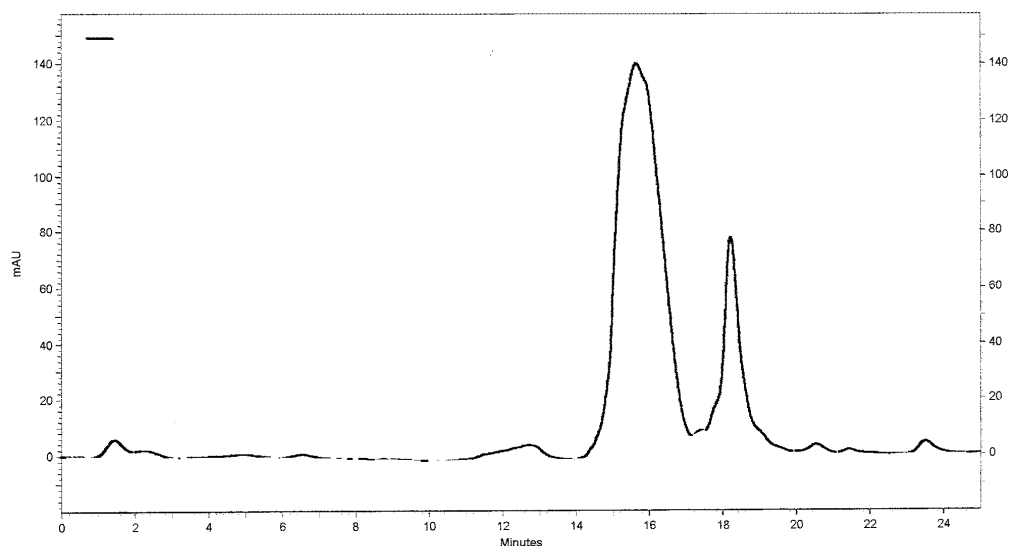


Figura 5.39 – Cromatograma de benzimidazol (800 µg/ml) exposto à radiação UVC por 90 minutos, em metanol. Condições cromatográficas: coluna semipreparativa Hypurity C18 (250 × 10 mm, 5 µm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

O cromatograma da solução de benzimidazol em contato com o peróxido de hidrogênio 30%, após 30 minutos de aquecimento (Figura 5.40) indicou que não há a formação de DP19, uma vez que não há o aparecimento de outro pico além dos referentes ao benzimidazol ( $t_r = 16$  min) e ao estabilizante presente no peróxido de hidrogênio ( $t_r = 12,5$  min).

---

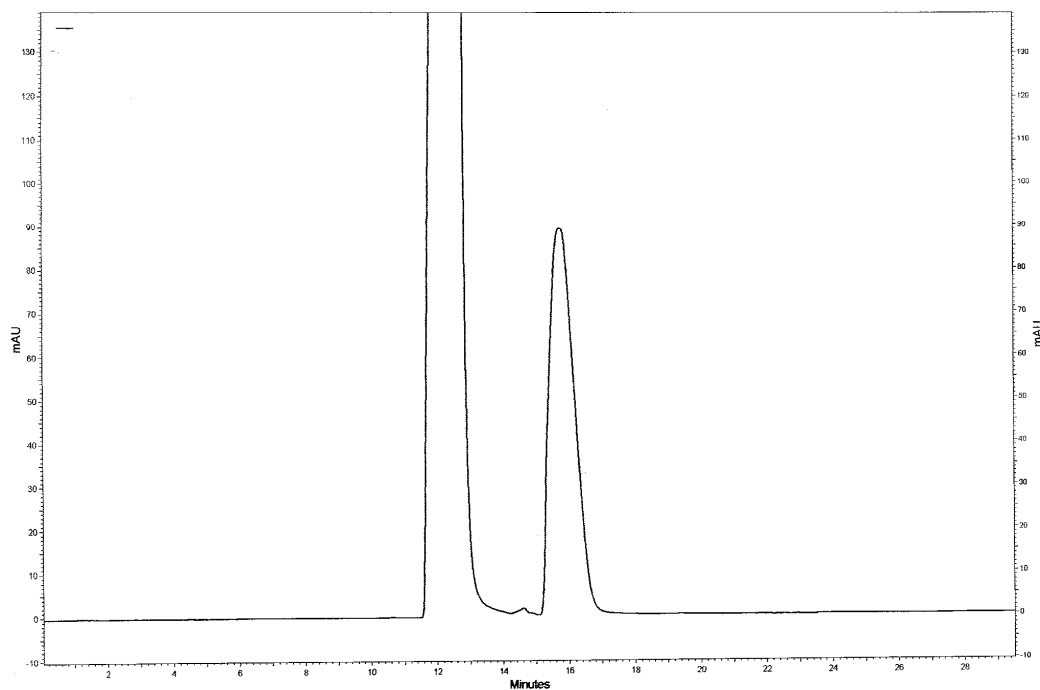


Figura 5.40 – Cromatograma de benzimidazol em peróxido de hidrogênio 30%, após 30 minutos de aquecimento. Condições cromatográficas: coluna semipreparativa Hypurity C18 (250 × 10 mm, 5 μm); fase móvel acetonitrila: água (35:65, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV a 282 nm; temperatura de análise 30 °C.

Provavelmente, seja necessária uma energia maior, como a fornecida pela luz, para que ocorra a oxidação da molécula, nas condições avaliadas.

Os produtos de degradação isolados e identificados neste trabalho foram descritos por DELLAGRECA e colaboradores (2006) como produtos formados pelos fármacos omeprazol e lansoprazol quando dispersos em água e expostos à radiação solar simulada por 43 e 72 horas, respectivamente, entre outros. Conforme os autores, o produto benzimidazolona também era formado em solução pH 4,0 protegida da luz, o que reforça a idéia de que seja o mesmo produto formado em meio ácido, observado neste trabalho. Além disso, os autores relatam que a exposição do benzimidazol e da benzimidazolona à radiação não ocasionou a formação de outros produtos, ao contrário do observado neste trabalho, quando a exposição do benzimidazol à luz UVC gerou um outro produto, cuja identidade foi sugerida como sendo a benzimidazolona. A diferença de resultados pode ser atribuída às diferentes condições de estudo.

---

### **5.3 DISCUSSÃO DO CAPÍTULO II**

---

---

---



---

O estudo da estabilidade de rabeprazol sódico foi um dos objetivos deste trabalho, tendo em vista a pequena quantidade de informações a respeito deste assunto disponíveis na literatura. Inicialmente, foram realizados os testes preliminares a fim de conhecer quais fatores eram importantes para a degradação do fármaco. Em seguida, realizou-se o estudo da cinética de degradação na luz e foram avaliados diferentes métodos para o isolamento de produtos da fotodegradação formados. Para a elucidação das estruturas dos produtos, foi empregada a técnica de ressonância magnética nuclear.

Dados da literatura afirmavam que o rabeprazol era instável em meio ácido (JANSSEN-CILAG, 1999; SHIN *et al.*, 2004; HORN e HOWDEN, 2005). Seu mecanismo de ação aponta para este fato. Entretanto, as informações a respeito dos produtos de degradação formados não são precisas. A proposta inicial deste trabalho foi estudar os produtos de degradação formados em meio ácido. Porém, o isolamento destes produtos tornou-se uma tarefa complexa em virtude da variação no número e quantidade de produtos gerados em dias diferentes, impedindo que se obtivesse quantidade suficiente para a elucidação.

Os testes referentes à degradação por ação da temperatura foram planejados em virtude de observações que sugeriram uma grande instabilidade de rabeprazol, na forma de SQR, mesmo à temperatura ambiente, o que torna necessário sua manutenção sob refrigeração. De fato, os processos de degradação são reações químicas que consomem energia e que podem acelerar-se por aumento da temperatura (NUDELMAN, 1975). A análise dos testes preliminares indicou que o fármaco é relativamente estável quando contido nos comprimidos. Provavelmente, os excipientes oferecem proteção à substância ativa.

A degradação de rabeprazol por ação de agente oxidante, peróxido de hidrogênio, originou produtos de degradação nas duas concentrações do agente testadas (3 e 30%), principalmente sob aquecimento. Como citado anteriormente, o calor pode acelerar reações que são lentas à temperatura ambiente. Estes dados demonstraram que o fármaco é suscetível a sofrer oxidação.

Duas fontes de radiação foram testadas durante os estudos preliminares: lâmpada UVC- 254 nm e lâmpada metal haleto. Observou-se que a molécula de

---

---

rabeprazol, em solução, degrada-se facilmente quando exposta às duas fontes, originando os mesmos produtos de degradação. As amostras de comprimidos triturados também apresentaram degradação após 10 dias de exposição, formando os mesmos produtos, enquanto que os comprimidos intactos mantiveram-se estáveis por 50 dias. O estudo da cinética de fotodegradação indicou que a concentração da solução metanólica de rabeprazol decaiu, aproximadamente, 90% em 30 minutos de exposição à lâmpada UVC. Há a formação de um produto majoritário, com tempo de retenção de 19 minutos em coluna semipreparativa, que demonstrou ser reprodutível.

A comparação dos cromatogramas obtidos a partir da amostra de rabeprazol em meio ácido (HCl 0,1 M) e da amostra exposta à radiação UVC revela que há a possibilidade dos produtos com tempo de retenção de 19 minutos serem iguais. Devido às variações observadas na degradação em meio ácido, esta mesma inferência não pode ser feita para o produto DP16.

O único trabalho sobre a estabilidade de rabeprazol presente na literatura (EL-GINDY *et al.*, 2003), serviu como base para as discussões dentro do estudo de cada fator. Foi possível observar diferenças significativas entre os resultados obtidos e os descritos pelo autor. Algumas destas podem ser atribuídas às diferentes condições de análise empregadas.

Para o início do procedimento de isolamento dos produtos de fotodegradação, diferentes técnicas cromatográficas foram testadas visando obter produtos puros e em quantidade adequada para a elucidação. A cromatografia em camada delgada preparativa e a cromatografia em coluna, nas condições empregadas, mostraram-se mais satisfatórias, possibilitando alcançar tais objetivos.

A técnica de ressonância magnética nuclear foi aplicada para a elucidação dos compostos isolados e também para a identificação de um produto contido no meio de degradação, sem prévio isolamento. Esta técnica é muito importante e útil para o estudo de aspectos estruturais de moléculas orgânicas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Os espectros bidimensionais também são muito úteis, pois fornecem informações sobre correlações que auxiliam no entendimento das estruturas, tornando possível realizar as atribuições.

---

---

Os espectros obtidos foram interpretados, possibilitando a identificação de três produtos da fotodegradação de rabeprazol.

O produto isolado a partir da cromatografia em camada delgada preparativa, denominado DP16, foi identificado como o anel benzimidazólico. A confirmação da estrutura foi possível através da utilização de uma amostra comercial da substância, a qual foi analisada por CCD e CLAE, apresentando os mesmos valores de R<sub>f</sub> e tempo de retenção do produto isolado. Além disso, foram observados os espectros disponíveis em uma base de dados (SDBS, 2006).

A cromatografia em coluna possibilitou isolar o produto denominado DP19, cuja identidade foi dada como a benzimidazolona, gerada, provavelmente, pela oxidação do benzimidazol durante exposição à radiação.

O terceiro produto elucidado, denominado DPclorofórmico, foi atribuído como o [4-(3-metoxi-propoxi)-3-metil-piridina-2-il]metanol, porção complementar da estrutura de rabeprazol. A identificação foi realizada através dos espectros de RMN de 200 MHz do resíduo seco do meio de degradação. Apesar de tratar-se de uma mistura, foi possível realizar a comparação com os espectros de rabeprazol, sendo observados sinais semelhantes em determinadas regiões.

DELLAGRECA e colaboradores (2006) descreveram em seu estudo sobre a degradação de omeprazol e lansoprazol em soluções aquosas, frente à radiação solar simulada, o benzimidazol, a benzimidazolona e um derivado piridínico semelhante a DPclorofórmico, produtos de degradação isolados e elucidados neste trabalho. A semelhança dos produtos observados, em diferentes condições de estudo, pode ser atribuída às estruturas análogas apresentadas pelos inibidores da bomba de prótons, o que propicia, de forma geral, o mesmo comportamento reacional. Os dados demonstrados pelos autores também permitiram inferir que o produto majoritário formado na luz (benzimidazolona) possui a mesma identidade de um dos produtos formado no meio ácido (t<sub>r</sub> = 19 minutos), conforme discutido anteriormente.

---

---

---

---

---

## **5.4 CONCLUSÕES**

---

---

---

---

- 
- O estudo preliminar da estabilidade térmica de rabeprazol mostra que os comprimidos são estáveis por 20 dias à temperatura de 50 °C, mas sensíveis à temperatura de 80 °C.
  - O estudo preliminar de estabilidade de rabeprazol em meio ácido clorídrico demonstrou que o fármaco é muito sensível a este fator, degradando-se completamente em 1 hora de contato com ácido clorídrico 0,1 M;
  - O estudo preliminar de estabilidade oxidativa de rabeprazol indica que o fármaco sofre degradação em contato com peróxido de hidrogênio, principalmente em presença de aquecimento;
  - O estudo preliminar de estabilidade frente às lâmpadas UVC- 254nm e Metal haleto indica que o rabeprazol é bastante sensível à radiação, quando em solução metanólica e aquosa, e menos sensível na forma de pó;
  - Os resultados obtidos na avaliação da cinética de fotodegradação indicam tratar-se de uma reação de ordem zero; a velocidade de degradação de rabeprazol em solução metanólica foi de 1,343 minutos<sup>-1</sup>;
  - O produto de degradação, isolado por cromatografia em camada delgada preparativa, foi identificado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e comparação com a substância comercial como benzimidazol (1H-benzimidazol);
  - O produto de degradação isolado por cromatografia em coluna foi identificado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear como a benzimidazolona (1,3-diidro-benzimidazol-2-ona). Testes complementares sugerem que este é formado pela oxidação do benzimidazol através da radiação UVC;
  - A análise por ressonância magnética nuclear de 200 MHz do resíduo seco da solução metanólica de rabeprazol, exposta à luz UVC, permitiu a identificação do produto de degradação [4-(3-metoxi-propoxi)-3-metil-piridina-2-il]metanol.
-

---

---



---

---

**6. REFERÊNCIAS**

---

---

---

---

---

ALTRIA, K. D. **Cappillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications. Methods in Molecular Biology**. New Jersey: Human Press, 1996, 349 p.

AMIDON, G. L., LENNERNAS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N.; ALLEN, L. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. 397 p.

AOAC – ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington, v. 1, p. 27, 1990.

AVEDAÑO, C. Introduccion al analisis farmacéutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introduccion a la Química Farmacéutica**. Madrid: Interamericana McGraw Hill, 1993. p. 843-857.

BARTH, J.; HAHNE, W. Review article: rabeprazole-based therapy in *Helicobacter pylori* eradication. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, suppl. 1, p. 31-33, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.

BYTZER, P.; O’MORAIN, C. Treatment of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 10, suppl. 1, p. 40-46, 2005.

CARAS, S.; PEURA, D. Úlcera péptica e *Helicobacter pylori*. In: McNALLY, P. **Segredos em Hepato/Gastroenterologia. Respostas necessárias ao dia-a-dia, em rounds, na clínica, em exames orais e escritos**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999. p. 102-110.

CARSWELL, C. I.; GOA, K. L. Rabeprazole – an update of its use in acid-related disorders. **Drugs**, v. 61, n. 15, p. 2327-2356, 2001.

CASTRO, D.; MORENO, M. A.; TORRADO, S., LASTRES, J. Comparison of derivative spectrophotometric and liquid chromatographic methods for the determination of omeprazole in aqueous solutions during stability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 291-298, 1999.

---

---

COELHO, L. C.; LEÓN-BARÚA, R.; QUIGLEY, E. Latin-american consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 10, p. 2688-2691, 2000.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: \_\_\_\_\_. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. 279 p.

DELLAGRECA, M., IESCE, M. R., PREVITERA, L., RUBINO, M., TEMUSSI, F., BRIGANTE, M. Degradation of lansoprazole and omeprazole in aquatic environment. **Chemosphere**, v. 63, n. 7, p. 1087-1093, 2006.

DOGRUKOL-Ak, D.; TUNALIER, Z.; TUNÇEL, M. TLC densitometric determination of omeprazole in pharmaceutical preparations. **Pharmazie**, v. 53, n. 4, p. 272-273, 1998.

EDWARDS, S. J.; LIND, T.; LUNDELL, L. Systematic review of proton pump inhibitors for the acute treatment of reflux oesophagitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, p. 1729-1736, 2001.

EL-GINDY, A; EL-YAZBY, F.; MAHER, M. M. Spectrophotometric and chromatographic determination of rabeprazole in presence of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 229-242, 2003.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FARINHA, A.; BICA, A.; MARTINS, J.; PAIS, J. Dissolution of Omeprazole from delayed-release solid oral dosage forms. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 7, p. 785-790, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FDA U. S. Food and Drug Administration. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (1997). Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>>. Acesso em: 20.03.2005.

FROST, S. M. Introduction to the validation of a dissolution apparatus. **Dissolution Technologies**, fev. p. 19-21, 2004.

FURLANETTO, S.; MAESTRELLI, F.; ORLANDINI, S.; PINZAUTI, S.; MURA, P. Optimization of dissolution test precision for a ketoprofen oral extended-release product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 159-165, 2003.

GALAGOVSKY, L. **Química Orgánica. Fundamentos teórico-prácticos para el laboratorio**. 2. ed. Buenos Aires: Eudeba, 2002. 248 p.

---

---

GARCIA, C. V.; PAIM, C. S.; STEPPE, M. New liquid chromatographic method for determination of rabeprazole sodium in coated tablets. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 4, p. 842-846, 2004.

GARCIA, C. V.; SIPPEL, J.; SFAIR, L. L.; GARCIA, S. S.; JABLONSKI, A.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Validation of capillary electrophoresis method for determination of rabeprazole sodium in pharmaceutical dosage form. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1081-1085, 2005.

GARCIA, C. V.; SIPPEL, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Development and validation of derivative spectrophotometric method for determination of rabeprazole sodium in pharmaceutical formulation. **Analytical Letters**, v. 39, n. 2, p. 341-348, 2006a.

GARCIA, C. V.; PAIM, C. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Development of dissolution test for rabeprazole sodium in coated tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.833-837, 2006b.

GUYTON, A C.; HALL, J. E. In: \_\_\_\_\_ **Tratado de Fisiologia Médica**. 15. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 763-768 p.

HACKMANN, E. R.; BENETON, S. A; SANTORO, M. I. R.; Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 41, n. 1, p. 7-13, 1991.

HORN, J. The proton pump inhibitors: similarities and differences. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 266-280, 2000.

HORN, J. Review article: relationship between the metabolism and efficacy of proton pump inhibitors – focus on rabeprazole. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, suppl. 6, p. 11-19, 2004.

HORN, J. R.; HOWDEN, C. Review article: similarities and differences among delayed-release proton-pump inhibitor formulations. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, suppl. 3, p. 20-24, 2005.

HUANG, J.; XU, Y.; GAO, S.; RUI, L.; GUO, Q. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the quantification of rabeprazole in human plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2321-2324, 2005.

HUBER, R.; KOHL, B.; SACHS, G.; SENN-BILFINGER, J.; SIMON, A.; STURM, E. Review article: the continuing development of proton pump inhibitors with particular reference to pantoprazole. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 9, p. 363-378, 1995.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Stability testing: photostability testing of new drug substances and products**, 1996.

---

---

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2R1: **Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology**, 2005.

IMS Global. International Medical Service. **World Markets**. Disponível em <http://www.ims-global.com>. Acesso em 27.09.2006.

JANSSEN-CILAG, **Pariet – Rabeprazol**, São Paulo, set. 1999.

JI, S.; KIM, H. S.; KIM, J.; JEE, M.; PARK, K.; UH, Y.; LEE, D.; SONG, J. S.; BAIK, S.; KWON, S. Comparison of the efficacy of rabeprazole 10 mg and omeprazole 20 mg for the healing rapidity of peptic ulcer diseases. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, p. 1381-1387, 2006.

KANG, J. Y.; ELDERS, A.; MAJEED, A.; MAXWELL, J. D.; BARDHANS, K. Recent trends in hospital admissions and mortality rates for peptic ulcer in Scotland 1982-2002. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, p. 65-79, 2006.

KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; NOVOVIC, D.; MARINKOVIC, V.; AGBABA, D. First-order UV-derivative spectrophotometry in the analysis of omeprazole and pantoprazole sodium salt and corresponding impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1019-1027, 2003.

KARPINSKA, J. Derivative spectrophotometry- recent applications and directions of developments. **Talanta**, v. 64, n. 4, p. 801-822, 2004.

KAWAKAMI, Y.; AKAHANE, T.; YAMAGUCHI, M.; OANA, K.; TAKAHASHI, Y.; OKIMURA, Y.; OKABE, T.; GOTOH, A; KATSUYAMA, T. In vitro activities of rabeprazole, a novel proton pump inhibitor, and its thioether derivative alone and in combination with other antimicrobials against recent clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobials Agents & Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 458-461, 2000.

KIBBE, A H. (Ed.) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000. 665 p.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

KOROLKOVAS, A **Dicionário Terapêutico Guanabara 2005/2006**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006,

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127 p.

---

---

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MANO, N.; ODA, Y.; TAKAKUWA, S.; CHIKU, S.; NAKATA, H.; ASAKAWA, N. Plasma direct injection high performance liquid chromatographic method for simultaneous determining E3810 enantiomers and their metabolites by using flavoprotein-conjugated column. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 9, p. 903-907, 1996.

MATHEW, M.; DAS GUPTA, V.; BAILEY, R. Stability of omeprazole solutions at various pH values as determined by high-performance liquid chromatography. **Drug Development Industrial Pharmacy**, v. 21, n. 8, p. 965-971, 1995.

MEHTA, A C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.

MIURA, M.; TADA, H.; SATOH, S.; HABUCHI, T.; SUZUKI, T. Determination of rabeprazole enantiomers and their metabolites by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 565-570, 2006.

MOFFAT, A. C. (Ed). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. p. 1521-1522.

MOORE, D. E. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions. In: TONNESEN, H.H. (Ed). **Photostability of Drugs and Drug Formulations**. London: Taylor and Francis, 1996. 63-82 p.

MORAES-FILHO, J. P. P.; CECCONELLO, J.; GAMA-RODRIGUES, J.; CASTRO, L.; HENRY, M. A; MENEGHELLI, U.; QUIGLEY, E. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification and management. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 2, p. 241-248, 2002.

NAKAI, H.; SHIMAMURA, Y.; KANAZAMA, T.; YASUDA, S.; KAYANO, M. Determination of a new H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase inhibitor (E3810) and its four metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical applications**, v. 660, p. 211-220, 1994.

NOZAL, M. J.; TORÍBIO, L.; BERNAL, J.; ALONSO, C.; JIMENEZ, J. Chiral separation of omeprazole and several related benzimidazoles using supercritical fluid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 1023-1029, 2004.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

---

---

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 1-24, 2004.

ÖRNSKOV, E.; LINUSSON, A.; FOLESTAD, S. Determination of dissociation constants of labile drug compounds by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 379-391, 2003.

ÖZALTÍN, N. Determination of lansoprazole in pharmaceutical dosage forms by two different spectroscopic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 599-606, 1999.

PANDYA, K. K.; MODY, V.; SATIA, M. C.; MODI, R.; CHAKRAVARTHY, B. High-performance thin-layer chromatographic method for the detection and determination of lansoprazole in human plasma and its use in pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 693, p. 199-204, 1997.

PARFITT, K. (Ed.) **Martindale – The Complete Drug Reference**. 32. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999.

PEDREGAL, C.; AVEDAÑO, C. Fármacos que alteran el transporte a través de las membranas celulares. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la Química Farmacéutica**. Madrid: Interamericana McGraw Hill, 1993. p. 360-362.

PINGILI, R.; JAMBULA, M.; GANTA, M.; GHANTA, M.; SAJJA, E.; SUNDARAM, S.; BOLUGDU, V. Identification and synthesis of potential impurities of rabeprazole sodium. **Pharmazie**, v. 60, n. 11, p. 814-818, 2005.

PRETSCH, E; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure Determination of Organic Compounds**. Berlin: Springer, 2000. p. 420.

QAISI, A.; TUTUNJI, M.; TUTUNJI, L. Acid decomposition of omeprazole in the absence of thiol: a differential pulse polarographic study at the static mercury drop electrode (SMDE). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 2, p. 384-391, 2006.

RADI, A. Adsorptive stripping square-wave voltammetric study of the degradation of lansoprazole in aqueous solutions. **Microchemical Journal**, v. 73, p. 349-354, 2002.

RADI, A.; EL-GHANY, N.; WAHDAN, T. Voltametric behaviour of rabeprazole at a glassy carbon electrode and its determination in tablet dosage form. **Il Farmaco**, v. 59, n. 7, p. 515-518, 2004.

RAMAKRISHNA, N. V.; VISHWOTTAM, K. N.; WISHU, S.; KOTESHWARA, M.; KUMAR, S. High-performance liquid chromatography method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 816, n. 1-2, p. 209-214, 2005.

RAO, R. N.; RAJU, A.; NAGARAJU, D. Enantiospecific resolution of rabeprazole by liquid chromatography on amylose-derived chiral stationary phase using photo diode array and polarimetric detectors in series. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 805-810, 2006.

---



---

REDDY, G. M., BHASKAR, B. V., REDDY, P., SUDHAKAR, P., BABU, J. M., VYAS, K., REDDY, P. R., MUKKANTI, K. Identification and characterization of potential impurities of rabeprazole sodium. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1262-1269, 2007.

RICHARDSON, P.; HAWKEY, C.; STACK, W. Proton pump inhibitors – pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders. **Drugs**, v. 56, n. 3, p. 307-335, 1998.

RIEL, M.; KYLE, D. E.; BHATTACHARJEE, A K.; MILHOUS, W. Efficacy of proton pump inhibitor drugs against *Plasmodium falciparum in vitro* and their probable pharmacophores. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2627-2632, 2002.

ROBINSON, M. New-generation proton pump inhibitors: overcoming the limitations of early-generation agents. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, suppl. 1, p. 543-547, 2001.

ROBINSON, M. Review article: the pharmacodynamics and pharmacokinetics of proton pump inhibitors – overview and clinical implications. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, suppl. 6, p. 1-10, 2004.

RODRIGUEZ, T. M.; EISIG, J. N.; MORAES-FILHO, J. P. P. Como diagnosticar e tratar a doença do refluxo gastroesofágico. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 56, p. 67-75, 1999.

SANTORO, M. I. R.; PRADO, M. S.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. Eletroforese Capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, p. 97-110, 2000.

SDBS – Spectral Database for Organic Compounds. **Benzimidazole**. Disponível em: [www.aist.go.jp/RIODB/SDBS.htm](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS.htm). Acesso em 15/12/2006.

SHARARA, A.; CHAAR, H.; AOUN, E.; ABDUL-BAKI, H.; ARAJ, G.; KANJ, S. Efficacy and safety of rabeprazole, amoxicillin and gatifloxacin after treatment failure of initial *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter**, v. 11, p. 231-236, 2006.

SHIN, J. M.; CHO, Y.; SACHS, G. Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATPase by proton pump inhibitors. **Journal of American Chemical Society**, v. 126, p. 7800-7811, 2004.

SHIN, J. M.; HOMERIN, M.; DOMAGALA, F.; FICHEUX, H.; SACHS, G. Characterization of the inhibitory activity of tenatoprazole on the gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 837-849, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectroscopia no infravermelho. In: \_\_\_\_\_ . **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

---

---

SINGH, S. S.; JAIN, M.; SHAH, H.; GUPTA, S.; THAKKER, P.; SHAH, R.; LOHRAY, B. Direct injection, column switching-liquid chromatographic technique for the estimation of rabeprazole in bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 247-254, 2004.

SOUZA, F. M. B. **Métodos físico-químicos e microbiológico para o controle de qualidade e estudo da estabilidade da pefloxacina**. 1995. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

STACK, W.; KNIFFON, A.; THIRLWELL, D.; COCKAYNE, A.; JEKINS, D.; HAWKEY, C. J.; ATHERTON, J. Safety and efficacy of rabeprazole in combination with four antibiotic regimens for the eradication of *Helicobacter pylori* in patients with chronic gastritis with or without peptic ulceration. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 10, p. 1909-1913, 1998.

STEDMAN, C. A.; BARCLAY, M. L. Review article: comparison of the pharmacokinetics, acid suppression and efficacy of the proton pump inhibitors. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, p. 963-978, 2000.

SWARTZ, M.; KRULL, I. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TAKAKUWA, S.; CHIKU, S.; NAKATA, H.; YUZUIHA, T.; MANO, N.; ASAKAWA, N. Enantioselective high-performance liquid chromatographic assay for determination of the enantiomers of a new anti-ulcer agent, E3810, in beagle dog and rat plasma. **Journal of Chromatography B, Biomedical Applications**, v. 673, issue 1, p. 113-122, 1995.

TALSKY, G. **Derivative Spectrophotometry. Low and higher order**. New York: VCH, 1994. 228 p.

**THE INDEX MERCK**. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, New Jersey, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 2001, p.1450.

TIVESTEN, A; FOLESTAD, S.; SCHÖNBACHER, V.; SVENSSON, K. Nonaqueous capillary electrophoresis for the analysis of labile pharmaceutical compounds. **Chromatographia**, suppl. I, v. 49, p. S7-S11, 1999.

TOLMAN, K. G. Gastrointestinal and liver drugs. In: GENARO, A. (Ed). **Remington. The Science and Practice of Pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1219-1242.

TONNESEN, H.H. Introduction: photostability testing of drugs and drug formulations – why and how? In: \_\_\_\_\_ (Ed). **Photostability of Drugs and Drug Formulations**. London: Taylor and Francis, 1996. 1-7 p.

TONNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

---

---

TORÍBIO, L.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIMÉNEZ, A. Comparative study of the enantioselective separation of several antiulcer drugs by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1091, n. 1-2, p. 118-123, 2005.

TSUCHIYA, M.; IMAMURA, L.; PARK, J.; KOBASHI, K. *Helicobacter pylori* urease inhibition by rabeprazole, a proton pump inhibitor. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 8, p. 1053-1056, 1995.

TSUTSUI, N.; TANEIKE, I.; OHARA, T.; GOSHI, S.; KOJIO, S.; IWAKURA, N.; MATSUMARU, H.; WAKISAKA-SAITO, N.; ZHANG, H.; YAMAMOTO, T. A novel action of the proton pump inhibitor rabeprazole and its thioether derivative against the motility of *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 44, n. 11, p. 3069-3073, 2000.

UNO, T.; YASUI-FURUKORI, N.; SHIMIZU, M.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Determination of rabeprazole and its active metabolite, rabeprazole thioether in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 824, issue 1-2, p. 238-243, 2005.

USP – The United States Pharmacopeia. **Pharmacopeial Forum**, v. 30, n. 1, p. 351-363, 2004.

**USP 29.** The United States Pharmacopeia. 29<sup>th</sup>. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

**USP/DI.** The United States Pharmacopoeia/ Dispensing Information. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. 21. ed. Englewood, 2001, v. 1: Drug Information for the health care professional, 2001, p. 2547-2549.

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A. R. (Ed). **Remington. The Science and Practice of Pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 980-985.

VASCONCELLOS, D. In: \_\_\_\_\_ **Gastroenterologia Prática**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 1998. p. 80-94.

WALSH, J. H. Rabeprazole: profile of a new proton pump inhibitor – introduction. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.13, suppl. 5, p. 3-4, 1999.

WANNMACHER, L. Antiulcerosos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 522-529.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and Pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 1999. 337 p.

---

---

WILLIAMS, M. P.; POUNDER, R. Review article: the pharmacology of rabeprazole. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, suppl. 3, p. 3-10, 1999.

YOSHIDA, T.; KITO, M.; TSUJII, M.; NAGASAWA, T. Microbial synthesis of a proton pump inhibitor by enantioselective oxidation of a sulfide into its corresponding sulfoxide by *Cunninghamella echinulata* MK40. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1217-1222, 2001.

ZHANG, Y.; CHEN, X.; GU, Q.; ZHONG, D. Quantification of rabeprazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, n. 2, p. 171-175, 2004.

---

---

---

**7. ANEXO**

---

---

---

---

## 7.1 Pareceres da Banca Examinadora

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico

Doutoranda: CASSIA VIRGINIA GARCIA

### **PARECER**

O trabalho apresentado pela doutoranda descreve o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o fármaco rabeprazol, contemplando, também, estudos de estabilidade incluindo a preparação e identificação dos produtos de degradação envolvidos, bem como o teste de dissolução. Os experimentos foram muito bem planejados e executados; a descrição dos metodologias e a discussão dos resultados tornam o trabalho um referencial importante de exalente qualidade científica e de grande contribuição para o Centro de Qualidade.

Pelo exposto considero a tese aprovada e sou favorável à atribuição do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas a Cássia Virginia Garcia.



Porto Alegre, 26 de março de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico

Doutoranda: CASSIA VIRGINIA GARCIA

**PARECER**

A TESE "VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DA ESTABILIDADE DE RABEPRAZOL SÓDICO" CONSTITUI UMA EXCELENTE CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS. APRESENTA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ADEQUADO ÀS DIFERENTES ANÁLISES EFETUADAS. OUTRO ASPECTO A SER RESSALTADO É O CUMPRIMENTO À PROPOSIÇÃO INICIAL, A QUAL FOI COMPLETAMENTE ALCANÇADA.

FINALMENTE, O TRABALHO APRESENTADO POSSUI EXCELENTE QUALIDADE NO DESENVOLVIMENTO E NA APRESENTAÇÃO DA DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS. COERENTEMENTE AO EXPOSTO, A CANDIDATA É APTA AO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

*Cláudia Salgado*

Porto Alegre, 26 DE MARÇO DE 2007.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.**

Título: **Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico**

Doutoranda: **CÁSSIA VIRGÍNIA GARCIA**

**P A R E C E R**

O presente trabalho está bem estruturado e redigido.

A importância do tema está evidenciada pela quantidade e qualidade dos artigos já publicados.

O desenho experimental foi corretamente delineado e executado.

Está escrito de forma que facilita sua leitura, considerando a grande quantidade de resultados que produziu.

As discussões foram bem desenvolvidas e as referências são atuais e adequadas.

O estudo de estabilidade envolveu várias técnicas analíticas e produziu resultados que foram corretamente interpretados, demonstrando conhecimento por parte da doutoranda.

Assim sendo, somos de parecer favorável pela aprovação do presente trabalho e concessão do grau acadêmico de doutor à Cássia Virgínia Garcia.

Porto Alegre, 26 de março 2007.



Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico

Doutoranda: CASSIA VIRGINIA GARCIA

**PARECER**  
A presente tese encontra-se muito bem organizada e desenvolvida, representando uma contribuição importante para a área de controle de qualidade. O tema é relevante e atual e a bibliografia apresentada é atual e permite a contextualização do tema. Os objetivos foram bem delineados e os métodos experimentais foram adequados para a obtenção dos resultados. Eles, permitiram a publicação, até o momento, de quatro artigos em periódicos internacionais de área, o que corrobora o relevância e atualidade do proposto. Considerando o exposto, parece provável a concessão do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas a Cassia Virginia Garcia.

Porto Alegre, 26 março, 2007.

---

## BIOGRAFIA

Cássia Virginia Garcia

### Formação Acadêmica

- 1997-2001 – Graduação em Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre/RS
- 2002-2005 – Conclusão da Ênfase em Farmacêutico Industrial  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre/RS
- 2002- Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- 2004-2007 Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (*upgrade*)  
Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- 03/2006-07/2006 – Doutorado Sanduíche  
Universidad de Buenos Aires/Argentina

### Produção Científica

#### Trabalhos apresentados em eventos

GARCIA, C. V.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. *Determinação da cinética de fotodegradação de rabeprazol sódico por cromatografia líquida de alta eficiência*. In: II SIMCRO, 2006, São Pedro/SP.

SFAIR, L. L.; GARCIA, C. V.; SIPPEL, J.; JABLONSKI, A.; STEPPE, M. *Análise de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos através da técnica de eletroforese capilar*. In: XVII Salão de Iniciação Científica – UFRGS, 2005, Porto Alegre/RS.

SIPPEL, J.; GARCIA, C. V.; STEPPE, M. *Aplicação do método de espectroscopia ultravioleta derivada na determinação de rabeprazol em comprimidos revestidos*. In: XVI Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2004, Porto Alegre/RS.

GARCIA, C. V.; SIPPEL, J.; SFAIR, L. L.; STEPPE, M.; JABLONSKI, A.; SCHAPOVAL, E. E. S. *Validação do método de eletroforese capilar para o doseamento de rabeprazol sódico em comprimidos revestidos*. In: X COLACRO, 2004, Campos do Jordão/SP.

---

---

GARCIA, C. V.; STEPPE, M. *Development of a high performance liquid chromatographic method for determination of rabeprazole sodium in coated tablets*. In: VII PHARMATECH, IV ENECQ, 2003, João Pessoa/PB.

SCOPEL, M.; ABOY, A. L.; ZUANAZZI, J. A.; GARCIA, C. V.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M.; HENRIQUES, A. T. *Determination of quality control parameters for Sambucus nigra L. raw material using HPLC-PDA detection and UV spectrophotometry: a preliminary stability study*. In: VII PHARMATECH, IV ENECQ, 2003, João Pessoa/PB.

MIORANZZA, S.; GARCIA, C. V.; WEISSHEIMER, V.; OPPE, T. P.; SCHAPOVAL, E. E. S. *Acetato de dexametasona: validação de método por CLAE para análise da forma farmacêutica creme*. In: XIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2001, Porto Alegre/RS.

GARCIA, C. V.; OPPE, T. P. *Validação de método analítico por CLAE para doseamento de acetato de dexametasona na forma farmacêutica creme*. In: X Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, VIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos e II Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul, 2001, Florianópolis/SC.

GARCIA, C. V.; DIAS, S. L. P.; MATTOS, M. L.; PERALBA, M. C. R. *Análise do herbicida glifosate em águas de irrigação de arroz*. In: XI Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 1999, Porto Alegre/RS.

### **Artigos completos publicados em periódicos**

GARCIA, C. V.; SIPPEL, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Development and validation of derivative spectrophotometric method for determination of rabeprazole sodium in pharmaceutical formulation. *Analytical Letters*, v. 39, n. 2, p.341-348. 2006.

GARCIA, C. V.; PAIM, C. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Development of dissolution test for rabeprazole sodium in coated tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, p.833-837. 2006.

GARCIA, C. V.; SIPPEL, J.; SFAIR, L. L.; GARCIA, S. S.; JABLONSKI, A.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Validation of capillary electrophoresis method for determination of rabeprazole sodium in pharmaceutical dosage form. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 4, p. 1081-1085. 2005.

GARCIA, C. V.; PAIM, C. S.; STEPPE, M. New liquid chromatographic method for determination of rabeprazole sodium in coated tablets. *Journal of AOAC International*, v. 87, n. 4, p. 842-846. 2004.

GARCIA C. V.; BREIER, A R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; OPPE, T. P.. Determination of dexamethasone acetate in cream by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 31, p. 597-600. 2003.

---

---

BREIER, A R.; GARCIA, C. V.; OPPE, T. P.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.  
Microbiological assay for azithromycin in pharmaceutical dosage forms. *Journal of  
Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 29, p. 957-961. 2003.

---