

## Proposta de um método analítico para doseamento de levodopa e benserazida em comprimidos

Wellington César Alves<sup>1</sup>; Iara Lúcia Tescarollo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduado do Curso de Farmácia – Universidade São Francisco – Campinas – SP

<sup>2</sup> Orientador de TCC do Curso do Curso de Farmácia – Universidade São Francisco – Campinas – SP

*E-mail* para contato (orientador): [iaratescarollo@hotmail.com](mailto:iaratescarollo@hotmail.com)

**Resumo:** O controle de qualidade consiste em um conjunto de operações que permitem verificar se o produto está em conformidade com as especificações estabelecidas para o mesmo. Entre os principais ensaios oficiais aplicados para a determinação quantitativa de fármacos em medicamentos está a cromatografia líquida de alta eficiência. A associação das substâncias levodopa e cloridrato de benserazida é amplamente difundida no tratamento da doença de Parkinson. Os métodos para a determinação da levodopa associada à benserazida em comprimidos ou são trabalhosos, ou sofrem interferência de outros componentes utilizados na formulação dos medicamentos, principalmente em matrizes. O presente trabalho teve como objetivo propor um método analítico para doseamento de levodopa e benserazida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os ensaios foram realizados adaptando-se os procedimentos preconizados na Farmacopeia Europeia. A alteração de parâmetros como composição da fase móvel e temperatura do sistema cromatográfico permitiu quantificar os fármacos em associação.

**Palavras-chave:** levodopa; benserazida; cromatografia líquida de alta eficiência

**Summary:** Quality control consists of a set of operations that allow you to check if the product complies with the specifications. Among the official tests applied for the quantitative determination of drugs in pharmaceutical dosage forms is high performance liquid chromatography. The combined substances levodopa and benserazide hydrochloride is widespread in the treatment of Parkinson's Disease. The methods for determining the levodopa tablet associated with benserazide are cumbersome, or suffer interference from other components used in formulating the medicine, particularly in arrays. This work aimed to propose an analytical method for determination of levodopa and benserazide tablets by high performance liquid chromatography efficiency. Assays were performed adapting the

procedures recommended in the European Pharmacopoeia. The parameter changing as the mobile phase composition and temperature of the chromatographic system to quantify allowed drugs in combination.

**Keywords:** levodopa, benserazide; high performance liquid chromatography

## INTRODUÇÃO

O processo para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos medicamentos fundamenta-se no cumprimento da regulamentação sanitária, destacando-se as atividades de inspeção e fiscalização, com as quais é feita a verificação regular e sistemática coordenadas em âmbito nacional pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010).

O controle de qualidade consiste em um conjunto de operações com o objetivo de verificar se o produto está em conformidade com as especificações estabelecidas para o mesmo (GIL e MACHADO, 2007). Entre os principais ensaios oficiais aplicados em comprimidos, destacam-se a avaliação da resistência mecânica através dos testes de dureza e friabilidade; tempo de desintegração e dissolução que servem como parâmetro de biodisponibilidade e, finalmente, os ensaios de peso médio, teor e uniformidade de doses unitárias que permitem assegurar aspectos posológicos atendendo às normas de qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos (BRASIL, 2010).

Os ensaios de potência ou doseamento são aqueles que visam quantificar o teor da substância ativa em medicamentos (GIL, 2007; BRASIL, 2010). Nessa perspectiva, a crescente demanda por matérias-primas de composição química definida, com elevado grau de pureza e qualidade tem levado as indústrias a implantar as análises qualitativas e quantitativas com o intuito de garantir que as mesmas atinjam as especificações e que o produto final tenha qualidade adequada para fins de comercialização. As análises quantitativas são realizadas com o objetivo de estabelecer a concentração do princípio-ativo presente em determinadas amostras, para este tipo de ensaio são exigidos critérios de exatidão, precisão e especificidade (GIL e MATIAS, 2007).

A associação das substâncias levodopa e cloridrato de benserazida é amplamente difundida no mercado farmacêutico para o tratamento de pacientes com doença de Parkinson. A presença da substância benserazida ajuda a preservar o efeito terapêutico da levodopa, além de diminuir as suas reações indesejáveis. O produto é comercializado na forma de comprimidos de 250 mg, contendo 200 mg de levodopa (L-dopa) e 57 mg de cloridrato de benserazida, correspondente a 50 mg de benserazida e excipientes como: manitol, fosfato de

cálcio dibásico, celulose microcristalina, amido, povidona, estearato de magnésio, etilcelulose, óxido de ferro vermelho, ácido silícico, dioctilsulfosuccinato de sódio (DEF, 2009).

Os métodos para a determinação da levodopa associada à benserazida em comprimidos ou são trabalhosos, ou sofrem interferência de outros componentes utilizados na formulação dos medicamentos, principalmente em matrizes.

A utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é altamente difundida no campo farmacêutico em virtude da possibilidade de separar e reduzir interferências provocadas por outros componentes como fármacos de associação, produtos de decomposição e aditivos. Trata-se de um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dos mesmos entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária (FE) enquanto a outra se move através dela (FM). Durante passagem da FM sobre FE, componentes da mistura seletivamente retidos pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais com separação dos compostos das misturas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2005). Tendo como base a associação de levodopa e benserazida o objetivo do presente trabalho constituiu-se na proposta de um método cromatográfico que consiga realizar separação e conseqüentemente a quantificação dos princípios dos respectivos fármacos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Padrão de referência e amostras**

Para a determinação a determinação quantitativa foram empregados: Amostra de comprimidos de levodopa associada ao cloridrato de benserazida 200/50mg (Lote: Rj0720); Padrão de levodopa USP, Lote: K0J392, Potência: 99,7%; Padrão cloridrato de benserazida: EP, Lote n 1. FC: 0, 8758.

### **Reagentes e equipamentos**

Foram empregados os reagentes: Acetonitrila (ACN) Merck grau HPLC; Fosfato de Potássio Monobásico JT Baker; Decanosulfonato de sódio (PICB10) Acros. Os equipamentos usados foram: Mesa Agitadora Ultrassom, Cromatógrafo líquido HPLC Waters – Modelo Alliance; Colunas cromatográficas L7 Octadecil (250x4,6 mm), 5 µm (symmetry, x-terra);

### **Procedimento experimental**

As análises foram efetuadas segundo a Farmacopeia Europeia (2010).

### **Preparo das soluções Padrão, padrão controle e amostra**

Pesou-se 20,17 mg de levodopa padrão e dissolveu-se em ácido fosfórico 0,1M com auxílio de ultrassom em balão volumétrico de 50 mL e 11,41 mg de cloridrato de benserazida dissolvido em ácido fosfórico 0,1M com auxílio de ultrassom em balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se 1 mL de cada solução para balão volumétrico de 20 mL e completou-se com fase móvel. As soluções foram preparadas em duplicata para realização do controle do padrão. Realizou-se peso médio de 20 comprimidos, triturou-se a um pó fino e homogêneo. Pesou-se equivalente a um comprimido para Balão volumétrico de 200 mL, adicionou-se ácido fosfórico até metade do balão. Levou-se ao ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com o Diluente. Transferiu-se 1 mL para balão de 25 mL e filtrou-se em millex 0,45 µm. As amostras foram preparadas em replicatas.

### **Adequação do sistema e condições Cromatográficas**

Segundo Farmacopeia Europeia (2010) para que o método tenha eficiência cromatográfica, os parâmetros desejáveis mínimos são os seguintes: Fator K' Maior que 1,0; Numero de Pratos teóricos maior que 2000; Assimetria menor que 2,0. As condições usadas no sistema foram: Coluna: L7(octadecil) 250 x 4,6mm; Fase móvel e diluente: (Tampão fosfato pH 3,0: ACN:PICB10) ; Diluente: (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M); Fluxo: 1,2 mL/min.; Comprimento de onda: 220 nm.; Tempo de corrida: 30 minutos; Volume morto (V<sub>0</sub>): 2,077 minutos

### **Procedimento de análise**

Injetou-se 20µL das soluções padrão (6X), padrão controle (3X) e amostras (2X) e registraram-se os cromatogramas. Feita a comparação das áreas dos picos principais no cromatograma da amostra com as áreas dos picos principais no cromatograma do padrão, realizou-se a quantificação de levodopa nas amostras e no padrão controle através da fórmula:

$$\frac{AA \times MP \times 1 \times Pot \times 200 \times 25 \times PM}{AP \times 50 \times 20 \times 100 \times 200 \times 1} = \text{mg/cpdo}$$

A seguir, realizou-se a quantificação de benserazida nas amostras e no padrão controle através da fórmula:

$$\frac{AA \times MP \times 1 \times Pot \times 200 \times 25 \times PM \times FC}{AP \times 100 \times 10 \times 100 \times 50 \times 1} = \text{mg/cpdo}$$

Onde: FC (fator de correção de cloridrato de benserazida para benserazida) = 0,8758; AA = Área da amostra; MP= Massa do padrão; Pot= Potência do padrão; PM= Peso médio dos comprimidos; AP= Área do padrão

### **Interpretação dos dados**

A quantificação de levodopa e benserazida nas amostras e no padrão controle foi realizada diretamente no *software* do cromatógrafo HPLC Waters – Modelo Alliance.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os produtos farmacêuticos requerem características especiais, definidas de acordo com sua forma farmacêuticas e via de administração, desta forma, procedimentos analíticos adequados são necessários para a garantia das exigências de qualidade.

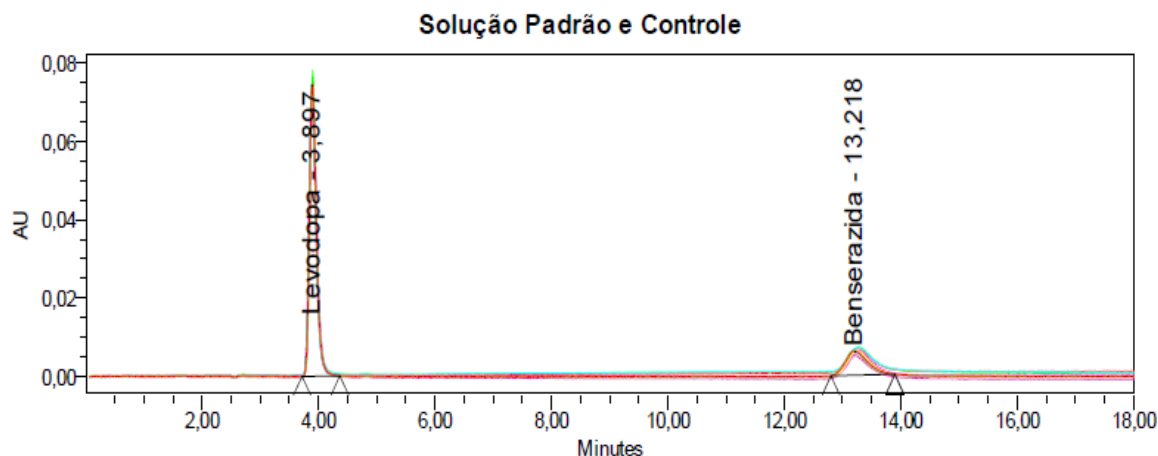
O doseamento dos fármacos é de extrema importância na avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos, visto que determina a quantidade de princípio ativo presente na formulação a ser administrada no organismo.

A determinação do teor das amostras em análise permite a avaliação concomitante da precisão dos métodos utilizados, por análises efetuadas em replicatas. Os códigos oficiais descrevem que medicamentos contendo levodopa e benserazida devem possuir no mínimo, 90,0% e, no máximo 110,0%, das quantidades declaradas dos fármacos.

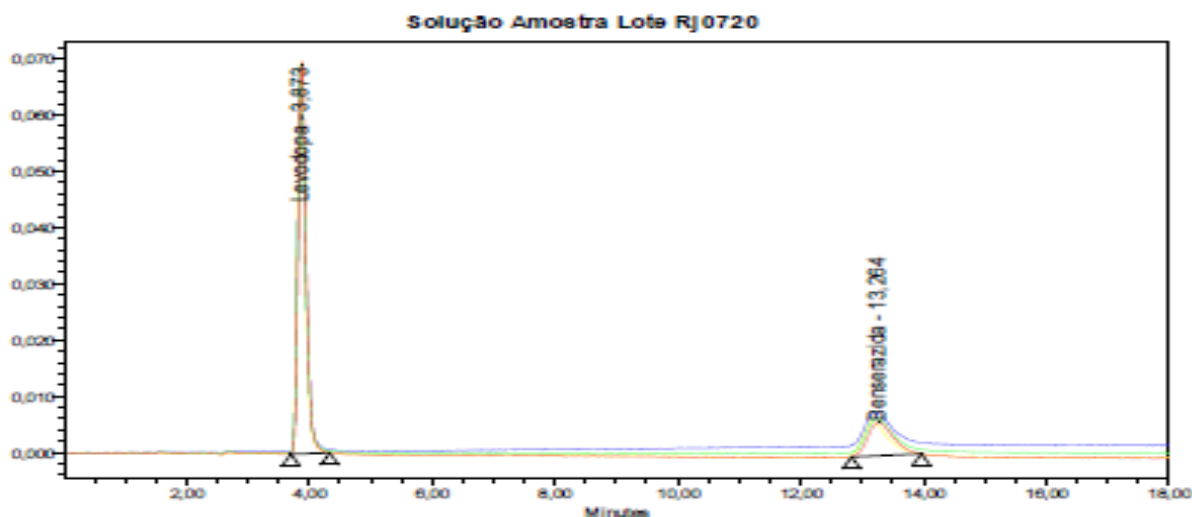
Os cromatogramas dos padrões levodopa, benserazida e amostra encontram-se nas Figuras 1 e 2. Os resultados da determinação quantitativa da levodopa e benserazida na amostra comercial de comprimidos encontram-se na Tabela 1.

O uso da CLAE tem sido objeto de grande interesse em virtude das características que esta técnica possui como oferecer resultados em curto espaço de tempo, favorecer a determinação de fármacos matrizes complexas em ampla faixa de concentração.

Na determinação de levodopa e benserazida em comprimidos a CLAE demonstrou facilidade de operação.



**Figura 3.** Cromatograma dos padrões. Obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da solução padrão e controle. Condições cromatográficas: Sistema CLAE (HPLC Waters – Modelo Alliance) e coluna L7(octadecil) 250 x 4,6mm Waters® fluxo 1,2 mL/min, temperatura 35 °C, comprimento de onda 220 nm. Fase móvel: tampão fosfato pH 3,0: ACN:PICB10 (v/v); Tempo de corrida: 30 minutos; Volume morto ( $V_0$ ): 2,077 minutos.



**Figura 5.** Cromatograma das amostras. Obtido por cromatografia líquida de alta eficiência da solução padrão e controle. Condições cromatográficas: Sistema CLAE (HPLC Waters – Modelo Alliance) e coluna L7(octadecil) 250 x 4,6mm Waters® fluxo 1,2 mL/min, temperatura 35 °C, comprimento de onda 220 nm. Fase móvel: tampão fosfato pH 3,0: ACN:PICB10 (v/v); Tempo de corrida: 30 minutos; Volume morto ( $V_0$ ): 2,077 minutos.

**Tabela 1** Resultados da determinação quantitativa da levodopa e benserazida na amostra comercial de comprimidos.

Ensaio	Levodopa		Benserazida	
	mg/ comprimido	(%)	mg/ comprimido	(%)
1	200,7	100,35	51,8	103,60
2	200,8	100,40	50,4	100,80
3	199,9	99,95	103,80	51,9
4	200,8	100,40	104,6	52,3
<b>Média (mg/comprimido)</b>	200,5		51,6	
<b>Desvio-padrão</b>	0,43		0,83	
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	0,22		1,61	

A análise realizada em comprimidos de levodopa e benserazida 200/50 mg, utilizando o método da Farmacopeia Europeia destinado apenas para a quantificação de benserazida, se mostrou eficiente também para a quantificação das substâncias em conjunto, sendo necessário algumas modificações como mudança na proporção de fase móvel de 80:20 Tampão:ACN para 83:17 Tampão:ACN. O aumento da temperatura do forno de 25°C para 35°C aumentou a eficiência dos picos. Os resultados obtidos mostraram que o método é funcional para doseamento dos dois princípios ativos, entretanto, será necessário futuramente a validação analítica para comprovação de parâmetros como robustez, linearidade e especificidade.

## CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas para a realização deste trabalho foi possível concluir que o doseamento concomitante dos fármacos levodopa e benserazida associados em comprimidos foi possível adaptando-se a metodologia preconizada pela Farmacopeia Europeia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 17 de 06 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 2010.

- GIL, E.S.; MACHADO, A.A. Ensaio de qualidade. *In: Gil, E.S. Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos*, 2. ed., São Paulo: Pharmabooks. 2007. p. 259-286.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5.ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2010. p.59-76.
- GIL, E.S.; MATIAS, R. Métodos clássicos de doseamento. *In: Gil, E.S. Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos*, 2. ed., São Paulo: Pharmabooks. 2007. p. 205-223.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*, Editora UNICAMP: Campinas, 2005.
- DEF 2009/2010. *Dicionário de Especialidades Farmacêuticas*. São Paulo: Jornal Brasileiro de Medicina, 2009.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA (EP) Convention; E Pharmacopeia versão 7.0 (2010).