

Detecção e quantificação de nitrosaminas em omeprazol, esomeprazol e pantoprazol

Fihama de Cassia Santos Silva

Mikael Kélvyn de Albuquerque Mendes e Lucas Ximenes Araújo

Profa. Dra. Laís Canniatti Brazaca

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo

fi.h.santos@usp.br

Objetivos

Avaliar a possível formação de nitrosaminas em medicamentos utilizados para tratamentos de úlceras gástricas baseados na inibição de bombas de prótons (omeprazol, esomeprazol e pantoprazol) utilizando o GC-MS (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e LC-MS (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas). Esta pesquisa é inédita, não sendo encontrados até o momento estudos da análise da presença de nitrosaminas em fármacos inibidores de bomba de prótons. Além de avaliar a segurança de tais medicamentos, este estudo permite o auxílio ao estabelecimento de métodos padronizados para a análise de nitrosaminas em fármacos, além de conscientizar a população sobre o consumo de medicamentos nas doses recomendadas.

Métodos e Procedimentos

A curva de calibração em GC-MS foi preparada a partir de um mix contendo 7 nitrosaminas (MIX EPA 521) e padrão interno (N-Nitrosomorfolina - NMor), utilizando diclorometano. Já para LC-MS foram utilizadas dietilnitrosamina (NDEA) e dimetilnitrosamina (NDMA) além do padrão interno NMor. As soluções foram preparadas em 89% H₂O, 10% MeOH e 1% ácido fórmico.

A análise por GC-MS foi adaptada e otimizada de Witkowska *et al.*¹ As injeções foram feitas no modo splitless, usando uma coluna RTX-Wax. O forno cromatográfico foi programado para 75°C por 2 minutos, seguido de aquecimento até 200°C (15°C/min) por 2 minutos e, depois, até 240°C por 3 minutos. A energia de ionização foi ajustada a 70 eV, e a fonte de íons foi mantida a 240°C durante a

análise nos modos scan e SIM (do inglês *single ion monitoring*).

Na análise de nitrosaminas por UHPLC (cromatografia líquida de ultra-alta performance), foi utilizada a ionização química a pressão atmosférica (APCI) em modo positivo, com corrente corona de 1,3 µA. A fonte de íons estava a 130 °C e a vaporização a 250 °C. O fluxo de dessolvatação de nitrogênio foi de 1000 L/h, e o de gás de colisão (argônio) foi de 0,15 mL/min. O sistema cromatográfico foi UHPLC com coluna Phenyl-Hexyl – Poroshell 120.

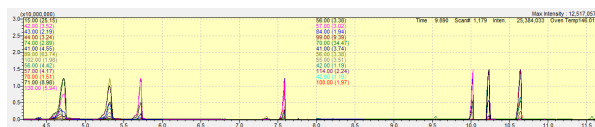
A extração DLLME (do inglês *dispersive liquid-liquid extraction*) foi adaptada de Giménez-Campillo *et al.*² e se baseia em uma tríade de solventes: água, solvente dispersor e solvente extrator. Cada fármaco foi macerado, pesado 0,500 g, solubilizado em 5 mL de água destilada (fase aquosa), agitado por 2 min e centrifugado a 6.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em um filtro de 0,45 µm, e a filtragem foi repetida duas vezes. Em seguida, foram adicionados 150 µL de clorofórmio (solvente extrator) e 250 µL de metanol (solvente dispersor). As soluções foram agitadas e centrifugadas a 7.000 rpm por 5 min, com 100 µL da fase inferior que continha clorofórmio sendo coletada e analisada em triplicata.

Resultados

Com as metodologias otimizadas, tanto em GC-MS quanto em LC-MS, foi possível visualizar separadamente todas as nitrosaminas estudadas, assim como o padrão interno.

Figura 1. Cromatograma obtido com GC-MS a partir do mix de nitrosaminas a uma concentração de 100

µg/mL. Os picos correspondem à NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NDBA, NPYR, NPIP respectivamente.



Com a construção de curvas analíticas para GC-MS, as faixas lineares ($R^2 > 0,990$) para as diferentes nitrosaminas variaram de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, com os limites de detecção variando de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $0,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de quantificação de $0,12$ à $0,67 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes não são limites muito baixos para análises de contaminantes ou produtos de degradação, que em geral apresentam-se em escalas de ng mL^{-1} . Uma possibilidade para a resolução deste problema seria a aplicação de técnicas que elevem a concentração do analito, ou a otimização dos protocolos de análise.

As curvas de calibração obtidas por UHPLC também apresentaram boa linearidade ($R^2 > 0,990$), com a faixa linear para NDMA entre 10 e 200 ng mL^{-1} , e para NDEA de $0,5$ a 10 ng mL^{-1} . Utilizando o UHPLC, os limites de detecção variaram de $0,0012 \text{ ng mL}^{-1}$ a $1,11 \text{ ng mL}^{-1}$ e de quantificação de $0,004$ a $3,70 \text{ ng mL}^{-1}$ para as nitrosaminas estudadas.

Ambas as técnicas apresentaram boa precisão ($\text{CV} < 15\%$). Em estudos de adição e recuperação utilizando DLLME, observamos valores fora do esperado ($90\text{-}120\%$), sendo que a extração será futuramente avaliada para prosseguimento do projeto.

Nas análises das amostras de fármacos, efetuou-se a corrida no modo SIM. A análise do fármaco pantoprazol indicou a presença de picos característicos de NDMA, estando estes no mesmo tempo de retenção que a NDMA possui na análise do mix de nitrosaminas. Além disso, o modo SIM detectou os cinco íons característicos da NDMA ($74^*, 42, 43, 15, 44$) nas triplicatas analisadas, incluindo o íon molecular 74^* . É importante destacar que, nas análises de adição e recuperação, o NDMA apresentou uma porcentagem de recuperação de $97,7\%$ em pantoprazol. Além disso, observa-se que a otimização dos processos de extração poderá levar à detecção de outros tipos de nitrosaminas em pantoprazol ou nos demais fármacos, e que a detecção de tal nitrosamina será confirmada realizando a análise dos fármacos em LC-MS.

Conclusões

A partir das metodologias otimizadas durante o projeto, foi possível detectar e quantificar diferentes

nitrosaminas utilizando GC-MS e LC-MS. Apesar de ambas as técnicas terem apresentado uma performance analítica adequada, o LC-MS apresentou limites de detecção e quantificação significativamente menores, se mostrando uma alternativa mais cara e complexa, porém mais adequada para a análise de traços. Experimentos preliminares indicaram a possível presença de NDMA em pantoprazol em quantidades menores do que $43,2 \text{ ng}$ a cada 240 mg de medicamento. O valor encontrado está dentro do recomendado pela ANVISA³ que é de $96,0 \text{ ng/dia}$. Tal resultado será posteriormente confirmado em LC-MS. Sendo assim, os experimentos demonstraram potencial para a futura continuidade da pesquisa. O aprimoramento da técnica de extração será realizado a seguir, podendo acarretar melhores resultados.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da FAPESP (2022/10416-9, 2023/15777-2 e 2023/10141-2).

Referências

- 1) WITKOWSKA, A. et al. Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 23, n. 20, p. 12125, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232012125>.
- 2) GIMÉNEZ-CAMPILLO, C. et al. Development of a new methodology for the determination of N-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry.
- 3) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. Guia nº 50/2021: Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Brasília-DF: Anvisa, 2023. 32 p. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/Guia_50_vers%C3%A3o+3_12+06+23.pdf/fb31d2c8-16cc-4176-9578-bf85d9dea053. Acesso em: 26 jul. 2023.