

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA ESTUDOS DE ESTABILIDADE  
PARA FLUCONAZOL CÁPSULAS

JOSILENE CHAVES RUELA CORRÊA

ORIENTADOR: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

COORIENTADOR: Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA ESTUDOS DE ESTABILIDADE  
PARA FLUCONAZOL CÁPSULAS

JOSILENE CHAVES RUELA CORRÊA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa  
e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como  
parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre  
em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

COORIENTADOR: Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares

ARARAQUARA - SP

2011

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

C824d      Corrês, Josilene Chaves Ruela  
Desenvolvimento de métodos analíticos para estudos de estabilidade para  
fluconazol cápsulas / Josilene Chaves Ruela Corrês. – Araraquara, 2011  
136 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de  
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Cristina Duarte Vianna Soares

1. Fluconazol. 2. Estudos de estabilidade. Validação. 4. Dissolução. I.  
Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Soares, Cristina Duarte Vianna,  
co-orient.. III.Título.

**CAPES: 40300005**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho ao DEUS e pai de nosso Senhor Jesus Cristo,  
que era, que é e que há de vir.  
"Temos, porém, esse tesouro em vasos de barro para que a excelência  
do poder seja de Deus e não de nós." 2Co 4:7.

## **Agradecimentos**

Ao meu marido,  
Amor da minha vida. Sem você nada disso seria possível!

Aos meus pais,  
Que nada tendo me deram tudo.

Aos meus irmãos  
Em nossa união há bênçãos e vida para sempre.

Às minhas orientadora e coorientadora, professora Dra. Hérica Regina Nunes  
Salgado e professora Dra. Cristina Duarte Vianna Soares,

"Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para  
alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência,  
e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência;  
outras, para edificarem os outros, e isso é caridade." S. Tomás de Aquino

Aos amigos de laboratório

Que ao compartilhar tudo tornaram essa caminhada mais fácil

Às estagiárias, Nathália Vanzella e Camila Reichman

Foi muito bom trabalhar com vocês!

Aos docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Profa. Dra. Virgínia Scarpa, Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, Prof. Dr. Eliseu Antônio Rossi, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Prof. Dr. Raul César Evangelista e aos docentes do Instituto de Química - UNESP, Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi e Prof. Dr. Wagner Vilegas por abrirem as portas de seus laboratórios de forma tão solícita.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”

Fernando Pessoa

## RESUMO

O antifúngico fluconazol é um fármaco sintético, desenvolvido na década de 1980, e o primeiro a integrar a classe dos triazóis. Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos analíticos seletivos e indicativos de estabilidade para fluconazol na forma de cápsulas, incluindo métodos físico-químicos e microbiológicos, realizar estudos de dissolução e de estabilidade. Os métodos de análise quantitativos empregados e validados foram: (i) espectrofotometria derivada de primeira ordem no UV a 268 nm, na faixa de concentração de 150–350 µg/mL, o teor médio nas cápsulas encontrado foi de 96,42 %; (ii) CLAE, coluna de C18 e fase móvel composta por metanol:água (60:40, V/V), o teor médio obtido foi de 97,35 %; (iii) determinação da potência microbiológica, pelo método de difusão em ágar cilindros em placa, utilizando cepas de *Candida albicans*, em que a atividade média do fluconazol em cápsulas foi 88,96%. Todos esses métodos foram validados e apresentaram ótima seletividade, precisão e exatidão. O método por CLAE é capaz de separar o fármaco de seu produto de degradação. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando HCl 0,1 M como meio de dissolução e cesto a 75 rpm. O perfil de dissolução obtido é discriminativo e apresenta ótima precisão e exatidão. O estudo de estresse do fluconazol frente à degradação ácida, alcalina, oxidativa, térmica, fotolítica e em câmara climática (40 °C/75%) mostrou a oxidação como fator importante, sendo a única condição a apresentar produto de degradação. O decaimento do teor do fármaco em amostras sob estudo de estabilidade conduzido em estufa, câmara climática e luz-UVC, foi determinado por CLAE e por ensaio microbiológico. Os resultados foram muito discrepantes, em que o teor da substância ativa se manteve acima de 90%, mas sua atividade apresentou decaimento significativo apresentando, aproximadamente, 30% de atividade. O fluconazol é um fármaco instável e mudanças em sua molécula levam ao aumento de absorção de radiação UV, assim, seu estudo de estabilidade deve ser realizado aplicando um conjunto de técnicas físico-químicas e microbiológicas para garantir resultados confiáveis.

**Palavras-chave:** fluconazol, estudos de estabilidade, validação de métodos analíticos, dissolução, doseamento microbiológico.

## ABSTRACT

The antifungal agent fluconazole is a synthetic drug, developed in the 1980s, and first joined the class of triazoles. This study aimed to develop selective analytical methods and stability indicated method for fluconazole in capsules, including physical-chemical, microbiological, dissolution and stability studies. The methods of quantitative analysis employed and validated were: (i) first order derivative spectrophotometry in the UV at 268 nm in the concentration range of 150 - 350µg/mL. The average level found in the capsules was 96.42% (ii ) HPLC, C18 column and mobile phase consisting of methanol: water (60:40, V / V), the mean level obtained was 97.35%, (iii) determining the potency microbiological diffusion method in agar cylinders plate, using strains of *Candida albicans* ATCC 90028, where the average activity of fluconazole capsules was 88.96%. All these methods were validated and showed good selectivity, precision and accuracy. The HPLC method is able to separate the drug from its degradation product. The dissolution test was developed and validated using 900 mL of 0.1 M HCl as dissolution medium and basket at 75 rpm. The dissolution profile obtained is discriminatory and it has highly precise and accurate. The stress study of fluconazole against the degradation acid, alkaline, oxidative, thermal, photolytic and climate chamber (40 ° C/75%) showed the oxidation as an important factor, being the only condition to show a degradation product. The decrease of the drug in samples submitted to preliminary stability (conducted in stove, climate chamber and UVC-light) was determined by HPLC and microbiological assay. The results were very inconsistent in which the concentration of the drug remained above 90% but its activity had significant decrease showing approximately 30% activity. Fluconazole is an unstable drug and changes in its molecule lead to increased absorption of UV radiation, thus its stability study should be performed by applying a set of physical-chemical and microbiological tests to ensure reliable results.

**Keywords:** fluconazole, stability studies, validation of analytical methods, dissolution, microbiological assay.

## SUMÁRIO

1	<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b>	18
2	<b>CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA</b>	21
2.1	Propriedades farmacológicas	21
2.2	Propriedades físico-Químicas	23
2.3	Métodos de análise	25
3	<b>CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	32
3.1	Introdução	32
3.2	Parte experimental	37
3.2.1	<b>Análise Qualitativa</b>	40
3.2.1.1	Determinação de peso médio das cápsulas de fluconazol	40
3.2.2	<b>Análise Quantitativa</b>	42
3.2.2.1	Titulação	42
3.2.2.2	Espectrofotometria na região do UV	43
3.2.2.3	Espectrofotometria derivada na região do UV	45
3.2.2.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	60
3.2.2.5	Dissolução	77
3.2.2.6	Doseamento microbiológico	100
4	<b>CAPÍTULO IV – ESTUDO DE ESTABILIDADE</b>	108
4.1	Introdução	108
4.2	Estudo sob condições de estresse	113
4.3	Estudo de estabilidade preliminar	118
4.4	Degradação	124
5	<b>CONCLUSÃO</b>	126
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	127



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do fluconazol (CAS 86386-73-4).....	23
Figura 2	Representação esquemática das derivadas.....	46
Figura 3	Derivada de primeira ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.....	48
Figura 4	Derivada de segunda ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.....	48
Figura 5	Derivada de terceira ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.....	49
Figura 6	Derivada de quarta ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.....	49
Figura 7	Curvas de derivada de primeira ordem do espectro ultravioleta obtido com soluções de concentrações crescentes de fluconazol durante o teste de linearidade sobrepostas.....	50
Figura 8	Plotagem dos resultados do teste preliminar de linearidade, concentração de fluconazol em mg/mL x absorvância.....	52
Figura 9	Plotagem dos resultados do ensaio de linearidade. Concentração de fluconazol em mg/mL x absorvância.....	55
Figura 10	Sobreposição dos cromatogramas de fluconazol SQR (A), fluconazol padrão de trabalho (B), fluconazol cápsulas (C) e seu placebo (D). Soluções de fluconazol a 100% da concentração (600 µg/mL) eluído a partir da coluna Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40), vazão de 1 mL/min e leitura a 261 nm.....	64
Figura 11	Cromatograma UV bidimensional do fluconazol padrão de trabalho preparado em água (500 µg/ mL), utilizando CLAE com detector de arranjos de diodos, coluna Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40) e vazão de 1 mL/min.....	66
Figura 12	Cromatograma UV bidimensional do fluconazol padrão de trabalho preparado H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% v/v (500 µg/ mL) após 6 horas de aquecimento a 90° C sob refluxo, utilizando CLAE com dector de arranjos de	

	diodos, coluna Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40) e vazão de 1 mL/min.....	66
Figura 13	Espectro de absorção do fluconazol padrão de trabalho, indicando os máximos e mínimos comprimentos de absorvância, referente ao isograma do fármaco apresentado na Figura 22.).....	67
Figura 14	Espectro de absorção do possível produto de degradação do fluconazol (PD) obtido após estresse oxidativo, indicando os máximos e mínimos comprimentos de absorvância, referente ao isograma do fármaco apresentado na Figura 24.....	67
Figura 15	Sobreposição de cromatogramas obtido para o fluconazol padrão de trabalho preparado H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% v/v (500 µg/mL) após 6 horas de aquecimento a 90° C sob refluxo em 261 nm e 244 nm.....	68
Figura 16	Curva analítica de fluconazol obtida no estudo de linearidade por CLAE (coluna capeada Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40) e vazão de 1 mL/min) (n = 54)....	69
Figura 17	Sobreposição dos cromatogramas obtidos para as amostras de dissolução do produto fluconazol cápsulas, seu placebo e cápsula, através do método por CLAE já desenvolvido para o doseamento do produto.....	80
Figura 18	Sobreposição dos espectros obtidos para as amostras de dissolução do padrão de trabalho de fluconazol, fluconazol cápsulas, seu placebo e cápsula através da primeira ordem de espectrofotometria derivada a 268 nm.....	81
Figura 19	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pás a 75 rpm por 60 min e a 150 rpm durante 5 min finais, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	83
Figura 20	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando cesto a 100 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	83
Figura 21	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 50 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e HCl 0,1 M como meio de	

	dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	84
Figura 22	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 75 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	84
Figura 23	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 50 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, empregando <i>sinker</i> e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	85
Figura 24	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 75 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, empregando <i>sinker</i> e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	86
Figura 25	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando cesto a 100 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	87
Figura 26	Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando cesto a 75 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, empregando HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.....	87
Figura 27	Curva analítica de fluconazol obtida no ensaio de linearidade para a quantificação da dissolução por espectrofotometria derivada em primeira ordem (n = 15).....	91
Figura 28	Curva analítica de fluconazol obtida no ensaio de linearidade para a quantificação da dissolução por CLAE (n = 15).....	91
Figura 29	Delineamento utilizado para aplicação das amostras. P1=25 µg/mL, P2 = 50 µg/mL, P3 = 100 µg/mL; A1 = 25 µg/mL, A2 = 50 µg/mL, A3 = 100 µg/mL.....	101
Figura 30	Curva analítica de fluconazol padrão de trabalho obtida no doseamento microbiológico em difusão em ágar, cilindros em placa.....	103
Figura 31	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em água a	

	temperatura ambiente e seu branco.....	114
Figura 32	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% e 10% v/v a temperatura ambiente e seu branco.....	114
Figura 33	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em HCl 0,1 M a temperatura ambiente e seu branco.....	114
Figura 34	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em NaOH 0,1 M a temperatura ambiente e seu branco.....	115
Figura 35	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse aquoso sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas.....	115
Figura 36	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho ) em condição de estresse oxidativo sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas. O cromatograma apresenta um possível produto de degradação (PD).....	116
Figura 37	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse ácido sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas.....	116
Figura 38	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse básico sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas.....	116
Figura 39	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse sob luz UVC após 24 horas de exposição.....	117
Figura 40	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de	

	fluconazol submetido à estabilidade preliminar sob calor seco para as amostras retiradas após diferentes períodos.....	119
Figura 41	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol submetido à estabilidade preliminar sob calor úmido para as amostras retiradas após diferentes períodos.....	120
Figura 42	Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol submetido à estabilidade preliminar sob luz UVC para as amostras retiradas após 21 e 66 dias.....	122

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de fluconazol utilizando CLAE.....	27
Tabela 1	Resultados para o teste de peso médio das cápsulas de fluconazol..	41
Tabela 2	Resultados para determinação de teor de fluconazol pelo método titulométrico em meio não aquoso.....	42
Tabela 3	Resultados para o teor de fluconazol cápsulas e seu placebo por espectrofotometria na região do UV.....	43
Tabela 4	Resultados dos testes realizados durante o desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria livre da interferência do placebo.....	45
Tabela 5	Dados da análise de variância (ANOVA) do teste preliminar de linearidade .....	52
Tabela 6	Dados da análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade.....	56
Tabela 7	Resultados para o teste de exatidão nos diferentes níveis de concentração de fluconazol em soluções de placebo enriquecido.....	57
Tabela 8	Resultados para o teste de precisão nos diferentes níveis de concentração de fluconazol.....	58
Tabela 9	Doseamento de fluconazol 150 mg cápsulas manipulado em diferentes farmácias magistrais (A a D) e fluconazol 150 mg cápsulas industrializado, produto genérico (E).....	59
Tabela 10	Parâmetros de desempenho do método cromatográfico desenvolvido para fluconazol.....	62
Tabela 11	Teor de fluconazol das soluções padrão de trabalho (500 µg/mL) submetidas a diferentes condições de estresse e surgimento de novos picos.....	65
Tabela 12	Dados da análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade.....	70
Tabela 13	Resultados para o teste de Precisão para diferentes níveis de concentração de solução padrão de fluconazol, em diferentes dias...	71

Tabela 14	Resultados obtidos no ensaio de exatidão para os níveis de concentração de fluconazol ensaiados.....	72
Tabela 15	Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez através do teste de Youden & Steiner.....	73
Tabela 16	Parâmetros analíticos e suas variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para a quantificação do fluconazol .....	74
Tabela 17	Resultados para os ensaios de padronização da matéria-prima fluconazol.....	75
Tabela 18	Resultados para os testes de doseamento e uniformidade de dose unitária para fluconazol 150 mg cápsulas manipulado em diferentes farmácias magistrais (A a D) e fluconazol 150 mg cápsulas industrializado, produto genérico (E).....	76
Tabela 19	Resultados do teste de dissolução do produto fluconazol cápsulas e os valores de interferência do placebo e cápsula ensaiados por UV (método preconizado pela Farmacopeia Brasileira).....	79
Tabela 20	Resultados do teste de dissolução do produto fluconazol cápsulas e os valores de interferência do placebo e cápsula sobre os resultados ensaiados por espectrofotometria derivada.....	80
Tabela 21	Análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade por espectrofotometria derivada na determinação de fluconazol.....	92
Tabela 22	Análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade por CLAE na determinação de fluconazol.....	92
Tabela 23	Resultados dos ensaios de precisão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada.....	93
Tabela 24	Resultados dos ensaios de precisão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE.....	94
Tabela 25	Resultados dos ensaios de exatidão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada.....	95
Tabela 26	Resultados dos ensaios de exatidão para a quantificação da	

	dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE.....	95
Tabela 27	Resultados dos ensaios de precisão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada.....	96
Tabela 28	Resultados dos ensaios de precisão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE.....	97
Tabela 29	Resultados dos ensaios de exatidão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada.....	97
Tabela 30	Resultados dos ensaios de exatidão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE.....	98
Tabela 31	Resultados do teste de uniformidade de doses unitárias de cápsulas de fluconazol. Valor unitário de cada cápsula em mg/unidade e porcentagem, média e desvio padrão relativo (DPR).....	99
Tabela 32	Parâmetros usados no desenvolvimento e validação do ensaio microbiológico por difusão em ágar para o fluconazol cápsulas.....	100
Tabela 33	Valores médios obtidos para o doseamento microbiológico por difusão em ágar cilindros em placa de fluconazol padrão de trabalho, para obtenção da curva analítica.....	103
Tabela 34	Análise de variância dos dados obtidos no doseamento de fluconazol pelo ensaio microbiológico difusão em ágar, cilindros em placa.....	104
Tabela 35	Valores experimentais obtidos no doseamento microbiológico de fluconazol no teste de recuperação.....	104
Tabela 36	Valores experimentais obtidos para o doseamento microbiológico de fluconazol pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar cilindros em placa.....	105
Tabela 37	Valores experimentais obtidos para o doseamento das amostras submetidas a estudo de estabilidade preliminar pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	105
Tabela 38	Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à estufa (60 °C), analisadas por CLAE.....	119
Tabela 39	Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à	



	câmara climática (40 °C/ 75% UR), analisadas por CLAE.....	121
Tabela 40	Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à câmara de fotodegradação (luz UVC (254 nm) 20 W) analisadas por CLAE.....	122
Tabela 41	Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à câmara de fotodegradação (luz UVC (254 nm) 20 W) para o estudo de cinética de degradação, analisadas por CLAE.....	124
Tabela 42	Valores obtidos de absorvância para as amostras de fluconazol submetidas a estresse lidas em 261 nm comparativamente ao padrão de trabalho, empregando a mesma quantidade de massa do fármaco.....	125

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BP: *British Pharmacopeia*, Farmacopéia Brtânica

CCD: cromatografia em camada delgada

CG: cromatografia gasosa

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

PD: produto de degradação

DPR: desvio padrão relativo

F. Bras.: Farmacopeia Brasileira

FDA: Food and Drug Administration

ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for  
Registration of Pharmaceuticals for Human Use

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

USP: *United States Pharmacopeia*, Farmacopeia Americana

UV: ultravioleta

### **1. INTRODUÇÃO**

O fluconazol é um antifúngico aprovado atualmente para ser comercializado em vários países, inclusive no Brasil, onde é comercializado nas formas farmacêuticas cápsulas e solução injetável, sendo o medicamento inovador Zoltec<sup>®</sup>, produzido pelo laboratório Pfizer Ltda (Brasil, 2011). Encontra-se disponível em forma de cápsulas, nas dosagens de 50, 100 e 150 mg. O fluconazol possui farmacocinética com biodisponibilidade oral de aproximadamente 100% (Bennett, 2003).

Este antifúngico é um fármaco sintético, desenvolvido na década de 1980, e o primeiro a integrar a classe dos triazóis. É metabolizado mais lentamente e tem menos efeito sobre a síntese de esteroides humanos em relação aos imidazólicos. Por essa razão são os triazóis os principais fármacos antifúngicos em pesquisa e desenvolvimento.

O fluconazol apresenta atividade contra espécies de *Candida* sp., sendo indicado em casos de candidíase orofaríngea, esofágica, vaginal e sistêmica. É também utilizado em casos de meningite criptocócica, sendo o fármaco de escolha no tratamento de meningite por coccidioides; tem atividade contra histoplasmose, blastomicose, esporotricose e dermatófitos (Park *et al.*, 2007; Bennett, 2003).

Na literatura, são encontrados muitos trabalhos relacionados à sua atividade farmacológica e métodos analíticos para sua determinação. A maioria dos trabalhos envolve a determinação do fármaco em fluidos biológicos. Há poucas publicações relacionadas a estudos de estabilidade e métodos analíticos indicativos de estabilidade. Sob a forma de matéria-prima, ou em formas farmacêuticas, o fluconazol pode ser determinado por métodos como titulação, espectrofotometria, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por métodos microbiológicos.

O controle de qualidade do produto através da determinação do teor de princípio ativo, estudo das características físicas e químicas do fármaco, estudos de estabilidade e de dissolução entre outros ensaios, é de fundamental

importância para garantir a qualidade do produto final, e, conseqüentemente, confirmar a qualidade do medicamento utilizado pelo paciente. Apesar da comprovada eficácia e segurança no seu tratamento, até então, apenas a Farmacopeia Brasileira IV e V edições (2005, 2010) possui método de análise padronizado para o fluconazol na forma de produto acabado. O método apresentado não é seletivo e sofre grandes interferências. Este fato justifica pesquisas nessa área para desenvolvimento e validação de métodos analíticos de fluconazol em cápsulas e estudos de estabilidade.

Neste trabalho, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas utilizando titulometria, espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), espectrofotometria derivada, CLAE e ensaios microbiológicos. Os métodos analíticos desenvolvidos foram validados. Estudos de estresse e de estabilidade foram desenvolvidos de forma preliminar utilizando câmara climática, com temperatura e umidade controlada, estufa, com temperatura controlada e câmara com luz ultravioleta, com o objetivo de verificar o comportamento de degradação do fluconazol frente a estes parâmetros. Também foram realizados ensaios de perfil de dissolução do fluconazol com avaliação da utilização de *sinker*, do inglês 'afundador', para cápsulas de fluconazol.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo Geral**

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos seletivos para a análise do produto fluconazol cápsulas e desenvolvimento de método indicativo de sua estabilidade.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região UV com derivação para determinação quantitativa de fluconazol em cápsulas.

Desenvolver e validar método por CLAE para análise quantitativa de fluconazol em cápsulas.

Desenvolver e validar método analítico de dissolução para cápsulas de fluconazol e avaliar a utilização de *sinker*.

Avaliar a estabilidade do fluconazol frente à degradação ácida, básica, oxidativa, térmica e fotolítica através da aplicação de condições extremas de estresse em solução.

Realizar estudos de estabilidade preliminar da forma farmacêutica em estado sólido, em estufa, câmara climática e na luz UVC.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Propriedades Farmacológicas**

#### ***Farmacodinâmica***

As infecções fúngicas invasivas permanecem como importante causa de morbidade e mortalidade, em especial na população de pacientes gravemente enfermos e em imunocomprometidos. O tratamento dessas infecções é ainda bastante limitado por problemas de segurança dos medicamentos, resistência microbiana e baixa eficácia (Carrilo-Muñoz *et al.*, 2006). A grande maioria das infecções fúngicas é decorrente de leveduras do gênero *Candida* sp. e têm sido consideradas entre os principais agentes causadores de infecção sistêmica de origem hospitalar, representando o principal fungo causador de infecção em corrente sanguínea. Apresentam uma taxa de mortalidade geral em torno de 50% a 60%, com aumento do tempo de internação para mais de 30 dias (Moretti, 2007). O arsenal terapêutico dos medicamentos antifúngicos é ainda bastante restrito, principalmente no caso de infecções profundas ou sistêmicas, e existe a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Nos últimos anos, a anfotericina B e os azóis - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol - têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia (Carrilo-Muñoz *et al.*, 2006; Bergold & Georgiadis, 2004).

Nas concentrações atingidas durante o uso sistêmico, o fluconazol tem como principal mecanismo de ação sobre os fungos a inibição do esteroide 14- $\alpha$ -desmetilase, um sistema de enzimas microssômicas dependentes do citocromo P450. Por conseguinte, compromete a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilesteróis. Esses metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto de cadeias acíclicas de fosfolípidios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e as enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo, assim, o crescimento de fungos. O dano

causado à membrana celular confere ação fungicida ou fungistática dependendo do agente envolvido (Park *et al.*, 2007; Telles Filho, 2007; Bennett, 2003).

### ***Farmacocinética e interação medicamentosa***

O fluconazol é ligeiramente solúvel em água o que permite ser administrado por via oral ou intravenosa. Apresenta excelente biodisponibilidade, é altamente absorvido pelo trato gastrointestinal e se difunde facilmente pelos líquidos corporais, inclusive escarro, saliva, leite materno e no líquido cefalorraquidiano. Sua biodisponibilidade não é alterada pela presença de alimentos ou pela acidez gástrica (Marciniec *et al.*, 2007; Bennett, 2003). Apresenta meia-vida de eliminação entre 25 e 30 horas; a excreção renal é responsável por mais de 90% da eliminação (Martinez, 2006; Bennett, 2003).

O fluconazol pode interferir no metabolismo de alguns fármacos principalmente através da inibição do citocromo P450, das isoenzimas CYP3A4 e CYP2C9. Foram relatados aumento e decaimento de esteroides contraceptivos em pacientes usando fluconazol, sendo afetada a eficácia de contraceptivos orais (Bennett, 2003).

### ***Toxicologia***

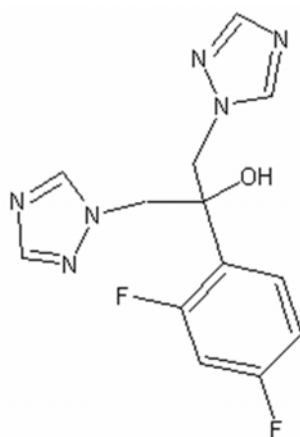
As principais reações adversas relacionadas ao uso do fluconazol são náuseas, vômitos, cefaleia, erupções cutâneas, dor abdominal, diarreia e alopecia em pacientes submetidos a tratamento prolongado com dose de 400 mg/dia. Raros casos de mortes devido à insuficiência hepática ou síndrome de Stevens-Johnson foram relatados (Bennett, 2003).

O fluconazol é teratogênico em roedores e tem sido associado a deformidades esqueléticas e cardíacas em três recém-nascidos de mulheres que utilizaram doses elevadas durante a gravidez. Assim, deve ser evitado durante a gravidez e amamentação (Bennett, 2003; Dash & Elmquist, 2001).

## 2.2. Propriedades Físico-Químicas

O fluconazol (Figura 1), quimicamente denominado  $\alpha$ -(2,4-difluorfenil)- $\alpha$ -(1*H*-1,2,4-triazol-1-metil)-1*H*-1,2,4-triazol-1-etanol, é um pó branco ou quase branco, ligeiramente solúvel em água, solúvel em etanol e em acetona, facilmente solúvel em metanol, muito pouco solúvel em tolueno. Sua forma molecular é  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$  (C = 50,98%; H = 3,95%; F = 12,41%; N = 27,44%; O = 5,22%), com peso molecular 306,27 g/mol e ponto de fusão 223–224°C. É uma base fraca e sua constante de ionização (pka) medida em NaOH 1,1 M é 1,76 + 0,10, com protonação predominante no nitrogênio 4 (O'neil, *et al.*, 2006; Dash & Elmquist, 2001).

Deve ser estocado em frasco hermeticamente fechado e à temperatura inferior a 30°C (O'neil, *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Estrutura química do fluconazol (CAS 86386-73-4).

Seu desenvolvimento foi resultado de um programa de pesquisa dirigido ao projeto de um agente antifúngico de amplo espectro de ação, ativo pela via oral e intravenosa, para tratamento de infecções superficiais e sistêmicas. A procura por antifúngicos com farmacocinética aceitável e metabolicamente estáveis levou ao desenvolvimento da série de compostos *bis*-triazólicos (Pereira, 2007).



A presença de dois anéis triazólicos em sua estrutura é responsável pela menor lipofilicidade. Apresenta Log P octanol igual a 0,5 e solubilidade em água de 8 mg/mL a 37° C, condições suficientes para ser formulado para uso intravenoso. A presença de um anel fenil halogenado aumenta a atividade do fármaco contra fungos. Também, apresenta alta estabilidade metabólica que foi conseguida pela combinação de três elementos estruturais: a resistência dos anéis triazólicos ao ataque oxidativo; o bloqueio da hidroxilação aromática pela presença dos dois átomos de flúor e o impedimento estérico da hidroxila, um sítio de possível conjugação (Pereira, 2007; Dash & Elmquist, 2001).

O fluconazol apresenta boa estabilidade em solução aquosa. Foi reportada a estabilidade de formulações injetáveis por 1 a 2 anos quando armazenadas em frascos de vidro ou plástico a temperatura de 5 a 30°C (Dash & Elmquist, 2001).

Não foram encontrados na literatura científica estudos de estabilidade do fluconazol matéria-prima ou em formas farmacêuticas sólidas.

Outra característica importante para fármacos é a existência de polimorfismo. O fluconazol teve polimorfismo relatado em 1995 por Gu e Jiang (Gu & Jiang, 1995), que mostraram duas formas cristalinas diferentes para o fármaco. Outra forma polimórfica também já é conhecida (Dash & Elmquist, 2001). Em estudo termoanalítico sobre as transformações polimórficas do fluconazol, Desai e colaboradores (Desai & Dharwadkar, 2009, e DESAI *et al.*, 2003) mostraram que ciclos de aquecimento e resfriamento levam a mudanças entre as formas polimórficas do fluconazol. Mostraram ainda que a forma polimórfica I dissolve mais lentamente se comparada à forma II, independentemente da forma como o polimorfo I tenha sido obtido.

### 2.3. Métodos de Análise

A monografia oficial do fluconazol matéria-prima, descrita na *United States Pharmacopeia 32* (USP 32, 2009), preconiza a identificação do fármaco através da equivalência do espectro infravermelho ou do espectro de absorção de radiação ultravioleta com os espectros padrão. Para o doseamento é preconizado ensaio de titulação em meio não aquoso utilizando ácido perclórico como titulante. Não há monografia para o produto acabado.

A Farmacopeia Brasileira IV edição (F. Bras. IV ed., 2005) em sua quarta edição, no sexto fascículo, traz as monografias para o fluconazol matéria-prima e produto acabado na forma de cápsulas. Para o doseamento da matéria-prima, é preconizada titulação em meio não aquoso. O produto acabado deve ser analisado por espectrofotometria na região do ultravioleta com leitura no comprimento de onda 261 nm. Até a IV edição da Farmacopeia Brasileira (2005), o teste de dissolução para o fluconazol na forma de cápsulas não era preconizado.

A V edição da Farmacopeia Brasileira, dezembro de 2010, atualizou a monografia do fluconazol cápsulas preconizando os métodos anteriormente descritos na consulta pública 10/2009 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Os métodos propostos na consulta pública para o fluconazol cápsulas são espectrofotometria derivada na região do UV, 261 nm, empregando HCl 0,1 M como meio diluente; e CLAE, empregando fase móvel composta por água e acetonitrila na proporção 78:22 e coluna C<sub>18</sub> de 150 mm de comprimento, ambos para o doseamento do fármaco e teste de dissolução empregando cesto a 100 rpm, HCl 0,1 M como meio de dissolução e coleta em 30 minutos.

Coelho e colaboradores (Coelho *et al.*, 2004) desenvolveram método para o teste de dissolução do fluconazol cápsulas no qual utilizou aparato 2 (pás), 900 mL de meio composto por solução de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0 mantido a 37,0 ± 0,5 °C e 100 rpm de velocidade para agitação do meio. *Sinkers* não foram utilizados. Porta e colaboradores (Porta *et al.*, 2002) utilizaram para o teste de dissolução o aparato 1 (cesto), HCl 0,1 M, mantido a 37,0 °C, como meio de dissolução e velocidade de agitação igual a 100 rpm.

A *Food and Drug Administration* (FDA, 2010) recomenda para fluconazol comprimidos e suspensão, formas comercializadas nos Estados Unidos da América, a utilização de água deionizada como meio de dissolução, aparato 2 e velocidade de 50 rpm. Para a forma de comprimidos, é recomendada a utilização de 900 ou 500 mL de meio de dissolução dependendo da dosagem e na realização de perfil de dissolução as amostragens devem ocorrer após dez, 20, 30, 45 e 60 minutos de teste.

Existem descritos na literatura vários métodos analíticos para determinação do fluconazol em preparações farmacêuticas, matéria-prima ou em material biológico utilizando CLAE, como mostra o Quadro 1.

Porta e colaboradores (Porta *et al.*, 2002) desenvolveram um método que utiliza espectrofotometria na região do ultravioleta para a determinação do fluconazol em testes de dissolução e doseamento empregando ácido clorídrico 0,1 M como solvente. A lei de Lambert-Beer foi observada na faixa de concentração entre 8,0 µg/mL e 560,1 µg/mL. O espectro de absorção, com melhor resolução para o fluconazol, foi obtido na concentração de 200 µg/mL. A máxima absorção foi observada em 261 nm e em 267 nm. As leituras foram realizadas no comprimento de onda 261 nm. O método apresenta exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e linearidade adequados e não sofreu interferência dos excipientes das formulações testadas.

Coelho e colaboradores (Coelho *et al.*, 2004) propuseram um método semelhante ao desenvolvido por Porta e colaboradores (Porta *et al.*, 2002). O método foi empregado na determinação do fluconazol matéria-prima e produto acabado e utilizou solução de hidróxido de sódio 0,1 M como solvente. O método, também, não sofre interferência dos excipientes das formulações testadas e mostrou-se preciso e com boa repetibilidade.

Devido à relativa pouca solubilidade em água e à possível protonação dos nitrogênios do anel triazólico, os mesmos pesquisadores (Coelho *et al.*, 2004) propuseram ainda dois métodos para o doseamento do fluconazol matéria-prima por titulação em meio não-aquoso utilizando ácido perclórico 0,1 M como titulante e cloreto de metilrosanilínio e *p*-naftolbenzeína como indicadores. Os dois métodos não diferem entre si em mais que 1%.

**Quadro 1.** Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de fluconazol utilizando CLAE

Referência	Amostra	Parâmetros utilizados			Detector	Origem
		Coluna	Fase Móvel / Vazão / Gradiente			
Hurtado <i>et al.</i> (2008)	solução injetável	Phenomenex® Synergi Fusion RP-80 C18 (150 x 4,6 mm, 4 µm)	Água : MeOH, (55:45, v/v) / isocrático	UV, 260 nm	UFMS, Santa Maria, Brasil	
Barathi <i>et al.</i> (2008)	plasma humano	HyPurity® C18(50 x 4,6 mm; 5,0µm)	ACN : amônia 0,2% (v/v), (80:20, v/v) / 0,5 mL/min / isocrático	Massas	Hyderabad, Índia	
Zhang <i>et al.</i> (2008)	sangue humano	Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN : água (36:64, v/v) / 0,8 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	University of Pittsburgh School of Pharmacy, Pittsburgh, EUA	
Youdim <i>et al.</i> (2008)	fluidos humanos	Phenomenex® Synergi Fusion High pressure (20 x 2 mm, 2,5µm)	Solução A: água : ACN, com 0,1% de ácido fórmico (95:5 v/v). Solução B: ACN, com 0,1% de ácido fórmico / 1 mL/min / gradiente	Massas	Pfizer Global Research and Development, Sandwich, Kent, Reino Unido	
Marciniec <i>et al.</i> (2007)	matéria-prima	Purosphere STAR® C18 (55 x 4 mm, 3 µm)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O–metanol–acetonitrila (82:7:7,1:10,2, v/v/v) / 1,5 mL/min / isocrático	UV, 254 nm	Poznan University of Medical Sciences, Polônia	
Ayub <i>et al.</i> (2007)	fluidos humanos	C 18 (250-x 4 mm, 5 µm), 30°C	MeOH : ST fosfato, 0,025 mol/L, pH 7,0, (45:55) / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 260 nm	Laboratório Globo Ltda, MG, Brasil	
Carrasco-Portugal & Flores-Murrieta (2007)	plasma humano	C18 (150 x 3,9 mm, 5 µm)	Acetato de sódio 0,01 mol/L, pH 5,0 (acertado com NaOH) : MeOH : ACN (75:20:5 v/v/v) / 1,2 mL/min / isocrático	UV, 260 nm	Secretaria da Saúde, México	
Conrado <i>et al.</i> (2007)	Plasma de ratos	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN : água (80:20, v/v), com 0,4 mM de hidróxido de amônio, e 0,2 mM de ácido acético, pH: 8,0 / 1.0 ml/min / isocrático	Massas	UFRGS, Porto Alegre, Brasil	
Holler & Valenta (2007)	<i>Candida albicans</i>	Nucleosil 100 – 5, C18 (240 x 4 mm)	ST fosfato, 0,012 M, pH 7,4 : MeOH, (55:45 v/v), com adição de 1mM de ácido octanossulfônico / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 260 nm	Faculty of Life Sciences, Viena, Áustria	

## CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

Referência	Amostra	Parâmetros utilizados			Origem
		Coluna	Fase Móvel / Vazão / Gradiente	Detector	
Kim <i>et al.</i> (2007)	plasma humano	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), 30°C	ACN : ST fosfato de sódio, 10mM (30:70, v/v), pH 5,7 / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	Seoul, Coreia
Wattananat & Akarawut (2006)	plasma humano	C18 (150 x 4,6 mm), 35°C	ST acetato de sódio, 10mM, pH 5,0 : MeOH, (65:35, v/v) / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	Ministry of Public Health, Nonthaburi, Tailândia
Porta <i>et al.</i> (2005)	plasma humano	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Água : ACN, (70:30) / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	USP, São Paulo, Brasil
Egle <i>et al.</i> (2004)	Soro	Nucleosil 100-5, C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN : ST fosfato de sódio diidrogenado, pH 5,0, 50 mM, (26.8:73.2, v/v)	UV, 210 nm	University Hospital Freiburg, Freiburg, Alemanha
Sun <i>et al.</i> (2004)	Gel	C18 (125 x 3 mm, 3 µm)	MeOH : água : hidróxido de amônio, (80:20:0.001, v/v/v) / 0,3 mL/min / isocrático	Massas	Shandong University, Jinan, China
Mathy <i>et al.</i> (2003)	fluidos de ratos	Microbore Nucleosil® C18 (150 x 1 mm, 3 µm)	ST fosfato (20 mM) : ACN (75:25, v/v, pH 7,0) / 40 µL/min / isocrático	UV, 210 nm	Université Catholique de Louvain, Brussels, Bélgica
Sasongko <i>et al.</i> (2003)	fluidos humanos	C 18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	ACN : ST ortofosfato de sódio diidrogenado (0,05 M), pH 4, (20 : 80, v/v) e (17 : 83, v/v) / 0,3 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	Faculty of Pharmacy, The University of Sydney, Austrália
Aboul-Eneim <i>et al.</i> (2002)	cápsulas e solução injetável	C 18 (25 x 4,6 mm, 10 µm)	ACN : ST fosfato (pH 7) com triidroximetil aminometano (25 mM) (55:45, v/v) / 1,5 ml/min / isocrático	UV, 260 nm	Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egito
Lee <i>et al.</i> (2002)	fluidos de ratos	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	MeOH : ácido octanossulfônico, 1mM, pH 3,0 (30:70, v/v) / 1 ml/min / isocrático	UV, 210 nm	National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan
Majcherzyk <i>et al.</i> (2002)	plasma humano	C18 (250 x 4 mm, 5 µm), 30°C	ST acetato de sódio, 0,1M, pH 5,0, : MeOH (70:30, v/v) / 1 mL/min	UV, 210 nm	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suíça
Mclachlan <i>et al.</i> (2001)	fluidos humanos	C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ST Na2HPO4, 0,05 mol/L, pH 4,0 : ACN (80:20, v/v) / 1,3 mL/min / isocrático	UV, 260 nm	The University of Sydney, Austrália

## CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

Referência	Amostra	Parâmetros utilizados			Origem
		Coluna	Fase Móvel / Vazão / Gradiente	Detector	
Moraes <i>et al.</i> (1999)	plasma humano	C18 (150 x 4,6 mm, 4 µm), 40°C	Ácido acético, 5 mM; ACN, (60:40), pH 3,7 / 0,9 mL/min / isocrático	Massas	Institute of Biomedical Sciences, USP, Brasil
Vaden <i>et al.</i> (1997)	fluidos biológicos de gatos	C18 (220 x 4,6 mm, 5 µm)	Água : ACN (84:16, v/v), pH 3,0 / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	North Carolina State University, EUA
Cociglio <i>et al.</i> (1996)	plasma humano	C8 (125 x 4 mm, 5 µm)	Água : ACN (72:28, v/v) / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 260 nm	Institut de Biologie, Montpellier, França
Koks <i>et al.</i> (1995)	fluidos humanos	C18 (125 x 4 mm, 5 µm)	ST acetato de sódio, 0,01M, pH 5,0, : MeOH, (70:30, v/v) / 1,0 mL/min / isocrático	UV, 261 nm	Slotervaart Hospital, Amsterdam, Holanda
Wallace <i>et al.</i> (1992)	fluidos humanos	Fase mista para cromatografia líquida Varian PTHAA-5® (150 x 4 mm)	ST fosfato monobásico, 0,051 M, Ph 3,0, : ACN, (15:85, v/v) / 0,9 mL/min / isocrático	UV, 210 nm	University of Texas Health Science, Texas, EUA

ACN = acetonitrila; MeOH = metanol; ST = solução tampão; UV = ultravioleta.

Marciniec e colaboradores (Marciniec *et al.*, 2007) propuseram alguns métodos para a determinação de fluconazol matéria-prima e estudo de sua estabilidade após esterilização por radiação ionizante. Os autores desenvolveram método por espectrofotometria na região do ultravioleta utilizando a mistura metanol-água (1:4) como solvente e concentração de fluconazol empregada igual a 0,02% m/v.

Também foi proposto, método que utiliza CLAE, utilizando coluna de fase reversa C18 Purosphere STAR<sup>®</sup> e fase móvel composta por solução de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O–metanol–acetonitrila (82,7:7,1:10,2, v/v/v). Para análise, utilizaram vazão de 1,5 mL/min e comprimento de onda igual a 254 nm (Marciniec *et al.*, 2007).

Foram ainda propostos cinco métodos que utilizam CCD, cada um com fase móvel distinta, bem como ressonância magnética nuclear – RMN, espectrofotometria por infravermelho e microscopia eletrônica de varredura, empregados na detecção e caracterização do fluconazol.

Hurtado e colaboradores (Hurtado *et al.*, 2008) desenvolveram um método analítico por CLAE para a quantificação do fluconazol na forma farmacêutica injetável. Foi utilizada coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm, 4 µm) Phenomenex<sup>®</sup>, eluição isocrática da fase móvel composta por água e metanol (55:45, v/v) e detecção por ultravioleta a 260 nm. O tempo de retenção do fluconazol foi de 4,9 minutos.

Outro método utilizando CLAE e desenvolvido para a determinação do fluconazol é proposto por Abdel-Moety e colaboradores (Abdel-Moety *et al.*, 2002). O método utiliza coluna de fase reversa C18, fase móvel composta pela mistura de acetonitrila e triidroximetil aminometano (25 mM) dissolvido em tampão fosfato (pH 7), na proporção 55:45 (v/v), vazão de 1,5 mL/min e comprimento de onda igual a 260 nm. O tempo de retenção do fluconazol foi de, aproximadamente 2,4 minutos.

Muitos trabalhos publicados trazem métodos de determinação do fluconazol em fluidos corporais, tecidos e permeados celulares por CLAE, como pode ser visto no Quadro 1. Alguns desses métodos publicados foram desenvolvidos sem a

utilização de soluções tampão com parte de fase móvel, o que aumenta a vida útil da coluna cromatográfica e do equipamento (Hurtado *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2005; Vaden *et al.*, 1997; Coclgho *et al.*, 1996). Muitos, também, empregam detector de massas para a detecção de pequenas concentrações deste fármaco nas amostras biológicas (Barathi *et al.*, 2008; Youdim *et al.*, 2008; Conrado *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 1999).

Alguns métodos utilizando a espectrofotometria derivada foram relatados na literatura para quantificação do fluconazol. Em 2002, Aboul-Enein e colaboradores (Aboul-Enein *et al.*, 2002 ) determinaram fluconazol por espectrofotometria derivada de primeira ordem na região do UV para análise de xaropes. Göger & Aboul-Enein (Göger & Aboul-Enein, 2001) utilizaram a espectrofotometria derivada de segunda ordem, na região do UV, para avaliar fluconazol em cápsulas e solução intravenosa.

Outros métodos descritos para a determinação do fluconazol incluem método microbiológico (Hurtado *et al.*, 2008), cromatografia gasosa (Debruyne *et al.*, 1988) e cromatografia capilar eletrocínética micelar – MECC (Heeren *et al.*, 1996).

Recentemente alguns trabalhos têm sido publicados sobre a identificação e caracterização de impurezas no fluconazol matéria-prima. Muitas são as impurezas descritas e estas provêm da síntese do fármaco (Dongre *et al.*, 2007 e 2006). No entanto, nesta pesquisa, não foram encontrados dados sobre produtos de degradação do fluconazol descritos na literatura.



### 3.1. INTRODUÇÃO

Os métodos analíticos têm por objetivo fornecer informações confiáveis quanto à natureza e à composição dos materiais submetidos à análise. Sabe-se, entretanto que, certo grau de variabilidade está atrelado a todas as avaliações. Portanto, um dos objetivos da garantia de qualidade é manter em patamar mínimo esta variabilidade.

A validação é parte importante do programa de garantia de qualidade, sendo os procedimentos incluídos nas normas de Boas Práticas de Fabricação exigidas pelo FDA e aplicadas nas indústrias farmacêuticas, devendo, também ocorrer conforme as Boas Práticas de Laboratório. Nos últimos anos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, divulgou aspectos relacionados à validação de métodos analíticos (Brasil, 2003).

A escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada em determinada forma farmacêutica. Precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade são características fundamentais de um método analítico (USP 32, 2009; Ermer, 2001), porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional também devem ser consideradas.

A USP 32 (2009) e a Farmacopeia Britânica (BP, 2003) fazem referência à validação analítica de forma destacada, incluindo a definição dos termos e parâmetros analíticos envolvidos nos ensaios de validação. Os atributos do método analítico ou parâmetros de validação estão descritos em inúmeras publicações (Ermer, 2001; Heyden *et al.*, 2001; Persson & Vessman, 2001; Wood, 1999; Vessman, 1996).

A ICH (*The International Conference on the Harmonization of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) estabelece requerimentos em duas diretrizes: orienta definições de características sobre validação necessária para vários tipos de procedimentos e inclui dados experimentais requeridos e algumas interpretações estatísticas (ICH, 2005).

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

A introdução de métodos analíticos exige a adoção de procedimentos de validação que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação. O desenvolvimento de métodos que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade destes produtos, tanto no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional, como em farmácias magistrais públicas e privadas (Oliveira, 2009).

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (Ribani *et al.*, 2004). Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de métodos analíticos e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (USP 32, 2009; Brasil, 2003; ICH, 2005).

A descrição dos parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método, segundo USP 32 (USP 32, 2009), ICH (ICH, 2005) e a Resolução da ANVISA nº 899 (Brasil, 2003), são:

a) Especificidade/seletividade: é a capacidade do método de determinar exatamente a substância em análise, na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e excipientes presentes na forma farmacêutica. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiver disponível, pode-se comparar os

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

resultados dos testes das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo, métodos farmacopeicos ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por exemplo, luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

b) Precisão: A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e expressa a importância dos erros aleatórios sobre o desempenho analítico. Este procedimento analítico é usualmente expresso como desvio padrão relativo (DPR) (equação 1). A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

- *Repetibilidade (intradia)*: refere-se ao procedimento analítico realizado no mesmo laboratório, em curto período de tempo, com o mesmo analista e mesmo instrumento.

- *Precisão intermediária (interdia)*: está relacionada com variações no mesmo laboratório, obtidos com diferentes analistas, diferentes dias, diferentes equipamentos, etc.

- *Reprodutibilidade*: procedimentos analíticos realizados em laboratórios diferentes (estudos colaborativos, geralmente aplicados para padronização de métodos analíticos).

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (\text{equação 1})$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

c) Exatidão: A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor aceito como verdadeiro. Pode ser determinada pela aplicação do teste de recuperação da concentração média do analito em diferentes concentrações e pelo desvio padrão relativo. No teste de recuperação adiciona-se quantidade conhecida de substância

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

química de referência na amostra ou placebo (placebo enriquecido) e calcula-se o percentual recuperado pelo método através da comparação dos resultados do método proposto com os obtidos por um método já caracterizado, cuja exatidão, tenha sido estabelecida, como por exemplo, um método farmacopeico, ou ainda pode ser inferida, uma vez estabelecida a precisão, linearidade e especificidade do método sendo inferida através da equação da reta linear.

d) Linearidade: É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade deve ser realizada com no mínimo cinco níveis de concentrações diferentes.

e) Limite de detecção: é a menor quantidade que uma substância presente em uma amostra, pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para determinação do limite de detecção (LD), a equação 2 é utilizada:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (\text{equação 2})$$

em que, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva analítica.

f) 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. Para determinação do limite de quantificação (LQ), a fórmula utilizada é mostrada na equação 3.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (\text{equação 3})$$

em que, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analítica e IC é a inclinação da curva analítica.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

g) Robustez: é a capacidade que o método possui em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para desenvolvimento de métodos devem-se realizar variações nos parâmetros considerados críticos e passíveis de erros. Um método é considerado robusto quando as alterações testadas não produzem mudanças significativas nos resultados.

Youden & Steiner (1975) propuseram um método que aplica combinação fatorial para o ensaio de robustez. Esse método permite não apenas avaliar a robustez como também a influência de cada parâmetro no resultado final. No teste de Youden sete parâmetros são escolhidos e avaliados por oito corridas analíticas de acordo com a combinação fatorial (Cesar & Pianetti, 2009). Para determinar a influência de cada parâmetro, a média dos resultados das quatro corridas em que o parâmetro sofreu alteração é comparada com a média dos resultados das quatro outras corridas em que não foi alterado. Sabendo se algum parâmetro apresenta alta influência sobre o resultado analítico é possível estabelecer critérios mais rigorosos para evitar eventuais variações durante a rotina analítica (Cesar & Pianetti, 2009).

A escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada, em determinada forma farmacêutica. Precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade são características fundamentais de um método analítico (USP 32, 2009; Ermer, 2001), porém outras como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional podem também ser consideradas. A validação envolve não apenas os procedimentos do processo produtivo, mas todos os métodos empregados no controle de qualidade, incluindo a comparação do método estudado com o método oficial ou outro método anteriormente validado.

Este trabalho apresenta a validação de alguns métodos desenvolvidos para a avaliação do fluconazol sendo eles: a espectrofotometria derivada na região UV, CLAE, dissolução e microbiológico.

Para o tratamento estatístico foi utilizado o *software* Excel<sup>®</sup>.

### 3.2. PARTE EXPERIMENTAL

#### Materiais

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

Foi utilizado fluconazol, substância de referência, com teor estimado em 100% e identificado pelo lote 098k4715. Este é um padrão primário adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

##### ***Matéria-prima (padrão de trabalho)***

Foi utilizado fluconazol, matéria-prima, com teor declarado em laudo analítico igual a 100,3 % e identificado pelo lote 190508. Substância gentilmente doada pela empresa EMS S/A (Campinas, Brasil).

##### ***Produto farmacêutico***

Foram analisadas cápsulas contendo 150 mg de fluconazol (teor rotulado), manipuladas pela farmácia magistral da Farmácia Escola da UNESP de Araraquara (Lote: 003-05/09), amostra A. Fórmula unitária: fluconazol (150 mg), celulose microcristalina (113 mg), fosfato de cálcio (100 mg), lauril sulfato de sódio (1,5 mg), amido (30 mg), Aerosil<sup>®</sup> (5 mg) e talco (50 mg).

##### ***Placebo***

Foram utilizados placebo do produto farmacêutico fluconazol 150 mg, preparado pela farmácia magistral da Farmácia Escola da UNESP de Araraquara. Fórmula unitária: celulose microcristalina (113 mg), fosfato de cálcio (100 mg), lauril sulfato de sódio (1,5 mg), amido (30 mg), Aerosil<sup>®</sup> (5 mg) e talco (50 mg).

Este produto foi gentilmente doado pela farmácia magistral da Farmácia Escola da UNESP de Araraquara.

### ***Cápsula***

Foram utilizadas cápsulas número zero iguais às utilizadas na fabricação do produto farmacêutico fluconazol 150 mg pela Farmácia Escola da UNESP de Araraquara. As cápsulas foram gentilmente doadas pela farmácia magistral da Farmácia Escola da UNESP de Araraquara.

### ***Amostras de diferentes farmácias magistrais e industrializada***

Amostras de fluconazol (cápsulas contendo 150 mg do fármaco) manipuladas em diferentes farmácias magistrais: amostra B (sem número de lote), amostra C (lote: FL0408002), amostra D (lote: 101852/1), e uma amostra industrializada, produto genérico, amostra E (lote: 47226), foram adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais de Araraquara e foram utilizadas para aplicação dos métodos desenvolvidos.

### **Equipamentos**

- Autoclave (PHOENIX<sup>®</sup>)
- Balança analítica (METTLER<sup>®</sup>, modelo H10)
- Cubetas de quartzo de 1 cm
- Coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C18, 5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm
- Coluna Phenomenex<sup>®</sup> C18, 5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm
- Cromatógrafo líquido Waters<sup>®</sup>, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detetor UV-Vis Waters 2487
- Cromatógrafo líquido Waters<sup>®</sup> modelo 2695
- Cromatógrafo líquido Varian<sup>®</sup> modelo LC 920

## CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

- Espectrofotômetro Hewlet Packard® Mod. 8453, com software chemstation UV – visível
- Espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu®, modelo UV Mini-1240
- Estufa FABBE® Ltda
- Câmara climática Marconi®, MA 835/UR
- Membranas de celulose regenerada com 0,45 mm de diâmetro de poro
- Micropipetas, BOECO
- Paquímetro (STARRET, modelo digital eletrônico série 727).

### **Solventes e reagentes**

- Ácido acético (MERCK)
- Ágar Sabourand
- Água ultrapura – água Milli-Q
- Etanol (Synth, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico (Reagen, Brasil)
- Metanol (MERCK)
- Metanol grau HPLC (J.T.Baker)
- Trietilamina



### 3.2.1. ANÁLISE QUALITATIVA

#### 3.2.2.1. Determinação do peso médio das cápsulas de fluconazol

##### **Método**

A determinação do peso médio foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010). Foram pesadas, individualmente, 20 cápsulas cheias, posteriormente foram esvaziadas e as cápsulas vazias foram novamente pesadas. Os resultados podem ser vistos na Tabela 1. Para cápsulas contendo peso médio acima de 300 mg, a variação de peso permitida é 10%.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 1.** Resultado para o teste de peso médio de fluconazol cápsulas, amostra A.

	Cápsulas cheias	Cápsulas vazias	Diferença	DPR (%)
1	553,5	92,6	460,9	3,62
2	531,9	93,0	438,9	-1,33
3	543,6	95,4	448,2	0,76
4	526,2	94,4	431,8	-2,92
5	525,4	94,2	431,2	-3,06
6	547,8	95,5	452,3	1,69
7	549,8	96,8	453,0	1,84
8	533,1	97,2	435,9	-2,00
9	547,6	96,8	450,8	1,35
10	536,2	96,6	439,6	-1,17
11	552,3	93,7	458,6	3,10
12	535,9	96,4	439,5	-1,19
13	534,5	97,3	437,2	-1,71
14	537,9	93,9	444,0	-0,18
15	541,8	95,4	446,4	0,36
16	542,5	95,9	446,6	0,40
17	555,4	96,9	458,5	3,08
18	530,1	95,5	434,6	-2,29
19	535,8	92,8	443,0	-0,41
20	538,1	93,0	445,1	0,07
		Peso médio	444,81	

DPR= desvio padrão relativo

Todas as vinte cápsulas encontram-se dentro do recomendado pela Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010).

### 3.2.2. ANÁLISE QUANTITATIVA

#### 3.2.2.1. Titulação

As amostras de fluconazol matéria-prima foram doseadas pelo método de titulação em meio não-aquoso descrito na farmacopeia brasileira (F. Bras. IV ed., 2005). Cem miligramas da amostra foram dissolvidos em ácido acético glacial e titulados com ácido perclórico 0,1 M, solução volumétrica (SV). O ponto final foi determinado utilizando cloreto de metilrosanilínio (cristal violeta) como indicador, até mudança de cor de azul para azul-esverdeado. O ácido perclórico foi padronizado com biftalato de potássio e seu real título foi determinado igual a 0,1050. Realizou-se ensaio em branco e foram feitas as correções necessárias. O volume gasto de titulante ao titular o branco foi de 0,2 mL. Sabendo-se que cada mL de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 15,314 mg de fluconazol e tendo realizado o ensaio em triplicata, os resultados foram: teor igual a 97,77% e desvio padrão relativo de 1,23%, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados para determinação de teor de fluconazol pelo método titulométrico em meio não aquoso

Replicata	Massa pesada (mg)	Volume gasto (mL)	Teor (%)
1	100,04	6,35	98,85
2	100,10	6,30	97,99
3	100,00	6,25	96,48
Teor médio			97,77
DPR (%)			1,23

DPR: desvio padrão relativo

### 3.2.2.2. Espectrofotometria na região do UV

#### Desenvolvimento analítico

*Verificação da seletividade dos métodos propostos para determinação do teor do fluconazol em cápsulas pela Farmacopeia Brasileira IV edição (2006) e Farmacopeia Brasileira V edição (2010) (consulta pública da ANVISA 10/2009)*

O teor do produto fluconazol cápsulas foi analisado em duplicata utilizando os métodos espectrofotométricos propostos pela farmacopéia brasileira (F. Bras. IV ed., 2005) e pela consulta pública da ANVISA 10/2009 (Brasil, 2009) que é o método preconizado na Farmacopeia Brasileira V edição (2010). Os métodos empregam hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M como diluentes, respectivamente. Ambos preconizam a utilização do comprimento de onda 261 nm, que é o máximo de absorção mais seletivo do fármaco, e a concentração do princípio ativo igual a 0,02% m/v.

A seletividade do método foi avaliada através da leitura das absorvâncias de soluções placebo preparadas em triplicata. Para este ensaio foi utilizado espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, modelo UV Mini-1240. Os resultados podem ser vistos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados para o teor de fluconazol cápsulas e seu placebo por espectrofotometria na região do UV

Diluyente	Absorvância do produto		Teor médio (%)	Absorvância do placebo			Interferência média (%)
HCl 0,1 M	0,414	0,397	99,7	0,021	0,017	0,017	4,52
NaOH 0,1 M	0,486	0,476	100,0	0,012	0,008	0,010	2,08

Os cálculos de interferência foram executados de acordo com o recomendado pela USP 32 (USP 32, 2009) no capítulo *The dissolution procedure: development and validation* (equação 4).

$$100C \times \left( \frac{A_p}{A_s} \right) \times \left( \frac{V}{L} \right) \quad (\text{equação 4})$$

em que, C é a concentração, em mg/mL, do padrão;  $A_p$  e  $A_s$  são as absorvâncias do placebo e do padrão, respectivamente; V é o volume de meio, em mL; e L é a dosagem do produto, em mg.

Segundo a USP 32 (USP 32, 2009) a interferência de placebos em métodos analíticos não deve exceder 2%. Em ambos os métodos as absorvâncias das soluções placebo representam grande interferência. Este fato mostra a baixa seletividade dos métodos no doseamento do fluconazol e coloca em risco a qualidade dos resultados.

*Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria na região do ultravioleta para o fluconazol cápsulas que não sofra interferências de seu placebo*

Vários foram os testes realizados na tentativa de desenvolver um método por espectrofotometria livre da interferência do placebo. Foram testados diferentes diluentes, tais como água, soluções tampão com pH's iguais a 4 e 8, e o solvente etanol. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4.

Não foi possível o desenvolvimento de um método por espectrofotometria que fosse livre da interferência do placebo ou que esta não fosse significativa. Assim, passou-se a verificar aplicação da espectrofotometria derivada.

## CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 4.** Resultados dos testes realizados durante o desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria livre da interferência do placebo

Diluyente	Absorvância média do produto	Absorvância média do placebo	Interferência do placebo (%)
Água	0,396	0,016	4,04
Tampão pH 4	0,389	0,017	4,36
Tampão pH 8	0,384	0,009	2,37
Etanol	0,398	0,009	2,26

A derivada da absorvância proporciona determinações simultâneas e o aumento da seletividade e sensibilidade do método, entretanto, quanto maior a ordem da derivada, maior o nível do ruído.

### 3.2.2.3. Espectrofotometria derivada na região do UV

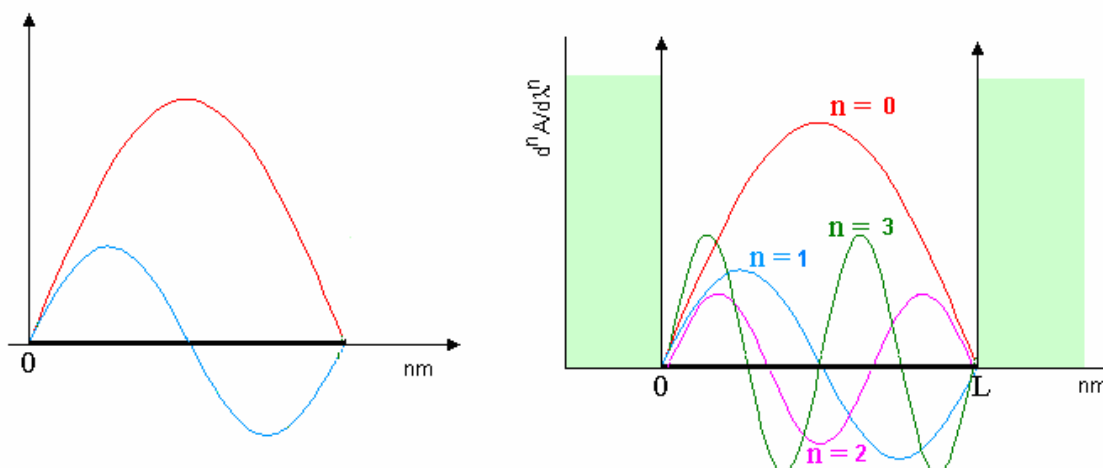
#### Introdução

O método espectrofotométrico por derivadas tem sido amplamente empregado nas análises de controle de qualidade de preparações farmacêuticas devido à sua rapidez, simplicidade e custo relativamente baixo (Hackmann *et al.*, 1990; Levillain & Fombeydie, 1986; Fell, 1978; Talsky *et al.*, 1978). Esta técnica é uma alternativa para a determinação de fármacos que sofrem interferência do placebo ou que apresentam valores baixos de absorvidade (Martins *et al.*, 2007).

A espectrofotometria derivada também tem sido utilizada para separar fármacos que apresentam espectros de absorção em comprimentos de onda próximos (*sobrepostos/overlapping*) quando estas substâncias apresentam bandas de absorção características na região do ultravioleta ou visível (Paschoal *et al.*, 2003).

A espectrofotometria derivativa consiste na representação das derivadas da absorvância em relação ao comprimento de onda ( $dA/d\lambda$ ), em função do comprimento de onda. É positivo onde a absorção aumenta e negativo onde ela

diminui. Assim, uma curva diferencial de ordem  $n$  se anula  $n$  vezes, apresentando  $n + 1$  bandas (Figura 2) (Rocha & Teixeira, 2004; Paschoal *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Representação esquemática das derivadas.

A diferenciação da lei de Lambert-Beer permite obter as equações 5, 6 e 7 que mostram que as derivadas  $d^n A/d\lambda^n$  são sempre proporcionais às concentrações do analito ( $c$ ), sendo as aplicações analíticas baseadas neste fato (Rocha & Teixeira, 2004).

$$dA/d\lambda = c b (d\varepsilon/ d\lambda) \quad \text{(equação 5)}$$

$$d^2A/d\lambda^2 = c b (d^2\varepsilon/ d\lambda^2) \quad \text{(equação 6)}$$

$$d^n A/d\lambda^n = c b (d^n \varepsilon/ d\lambda^n) \quad \text{(equação 7)}$$

Em geral, a derivação espectral visa determinações simultâneas, bem como aumento de seletividade. Acoplado a isto, frequentemente, observa-se aumento de sensibilidade e melhoria do limite de detecção. O aumento de sensibilidade observado na espectrometria derivativa é baseado na observação de que a amplitude da derivada  $n$  da absorvância em relação ao comprimento de onda ( $D^n = d^n A/d\lambda$ ) é inversamente proporcional à largura de banda do espectro ordinário ( $W$ ):

$$D_n \propto 1/W^n \quad (\text{equação 8})$$

Por esta razão, a sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos parâmetros instrumentais e da forma de medida do sinal (método da tangente, *zero-crossing* e *peak-peak/zero-peak*), como também das características do espectro de absorção ordinário. A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que usualmente verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem de derivação (Rocha & Teixeira, 2004; Sanchez-Rojas *et al.*, 1988).

### Desenvolvimento analítico

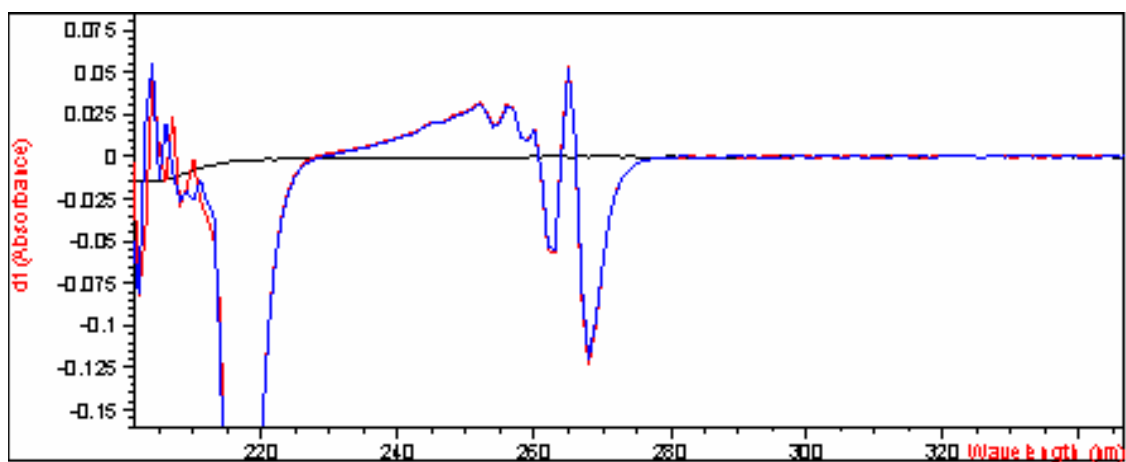
Durante o desenvolvimento analítico o diluente testado foi a água, pois na concentração utilizada o fluconazol é facilmente solúvel em água e, também, devido ao seu menor custo, menor impacto ambiental e risco ao analista.

Buscou-se, primeiramente uma concentração que apresentasse resposta ao meio da faixa normalmente linear para espectrofotometria segundo a lei de Beer, 0,2 a 0,8 de absorvância. Assim a concentração utilizada foi igual a 250 µg/mL que apresenta resposta igual a 0,5 de absorvância.

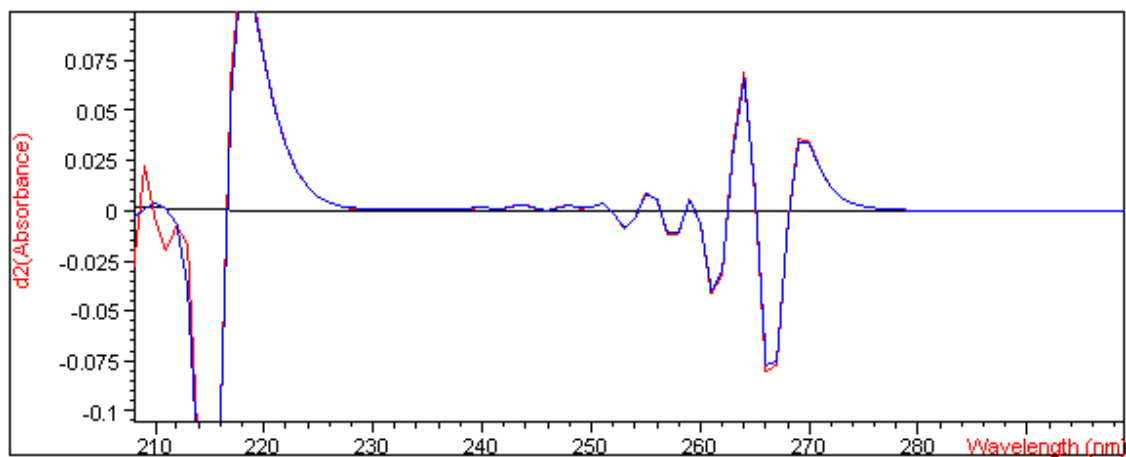
Foram preparadas em triplicata amostras da substância química de referência do fluconazol, do produto fluconazol cápsulas e de seu placebo. O espectro dessas amostras entre os comprimentos de onda de 200 e 400 nm e as derivadas de primeira a quarta ordem foram calculadas pelo *software* do espectrofotômetro utilizado.

As Figuras 3 a 6 apresentam o espectro e suas derivadas. O traço em preto é referente ao placebo, o traço em azul se refere ao produto fluconazol cápsulas e o traço em vermelho se refere ao padrão de trabalho.

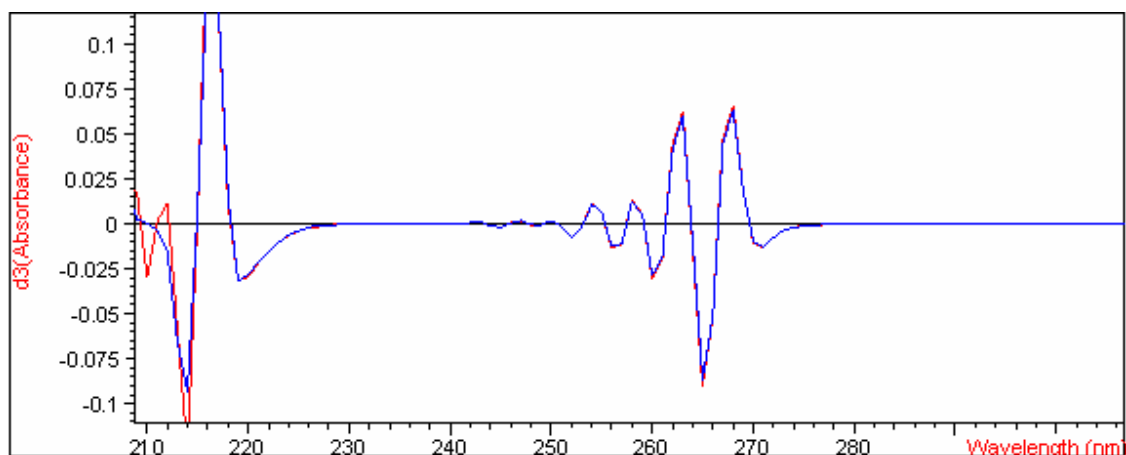




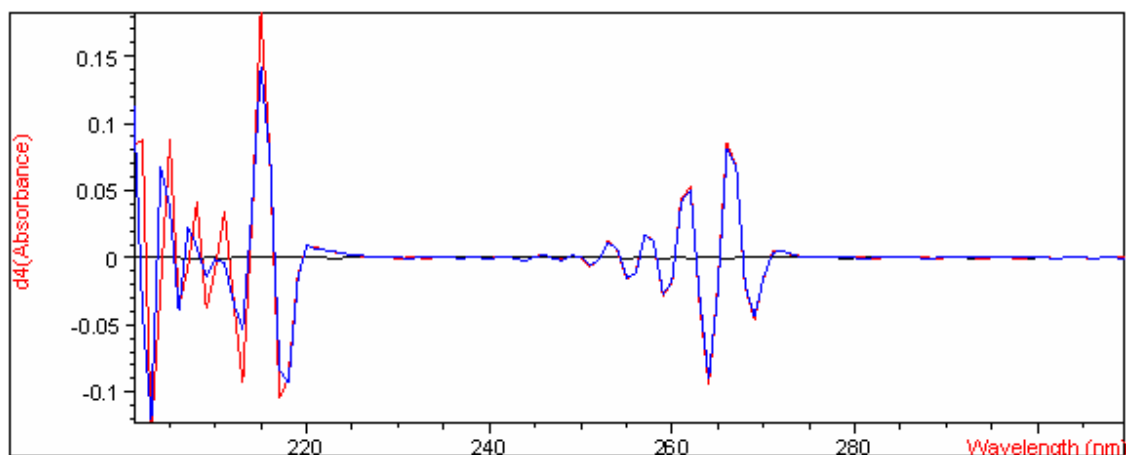
**Figura 3.** Derivada de primeira ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.



**Figura 4.** Derivada de segunda ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.



**Figura 5.** Derivada de terceira ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.



**Figura 6.** Derivada de quarta ordem do espectro ultravioleta do fluconazol em água.

A interferência do placebo foi avaliada em todas as quatro ordens de derivada, nos comprimentos de onda máximos e mínimos de maior relevância.

Como é possível observar na Figura 3, a derivada de primeira ordem apresenta um vale intenso e bem definido em 268 nm. A interferência média do placebo neste comprimento de onda foi de 0,1%, valor de baixa significância analítica e absolutamente aceitável. Assim a interferência do placebo que era de,

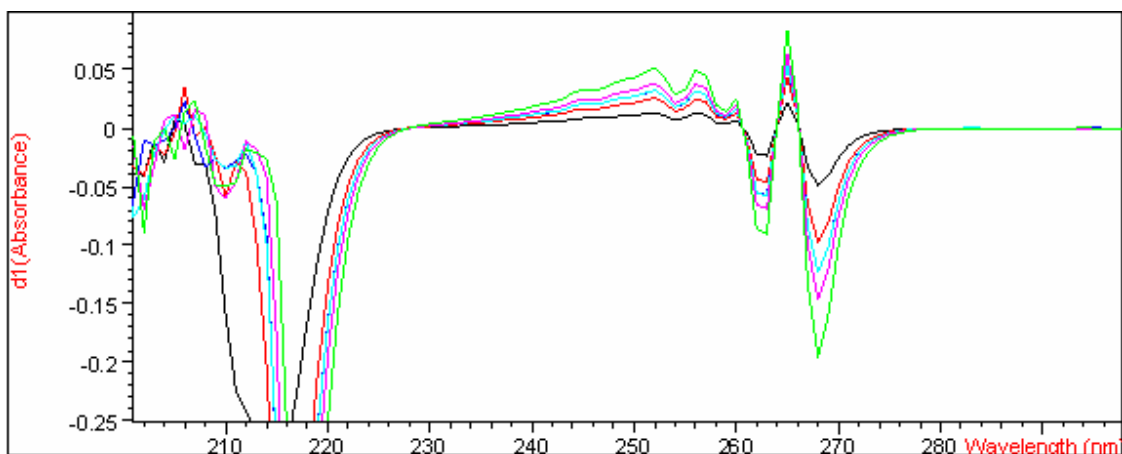
aproximadamente 4%, como mostrado na Tabela 2, foi diminuída consideravelmente utilizando a primeira derivada.

Quanto mais intenso o pico melhor a sensibilidade de resposta em seu comprimento de onda e quanto menor a ordem de derivação melhor a relação sinal-ruído. Desta forma, a derivada de primeira ordem foi escolhida com leitura em 268 nm.

### Validação prévia

Após a escolha do método um teste preliminar de linearidade foi realizado. Foi preparada uma solução mãe do padrão de trabalho na concentração 1250 µg/mL. Esta solução foi utilizada no preparo de seis soluções filhas nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL e 400 µg/mL, através de diluições.

A Figura 7 mostra as curvas de derivada de primeira ordem dos espectros obtidos para soluções em concentrações crescentes avaliadas no teste de linearidade.



**Figura 7.** Curvas de derivada de primeira ordem do espectro ultravioleta obtido com soluções de concentrações crescentes de fluconazol durante o teste de linearidade sobrepostas.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

O método apresentou excelente linearidade na faixa de concentração testada, como mostram a Figura 8 e a Tabela 5. A equação da reta é igual a  $y = 0,4883x + 0,0004$  e o  $r^2$  é igual a 0,999951.

**Tabela 5.** Dados da análise de variância (ANOVA) do teste preliminar de linearidade

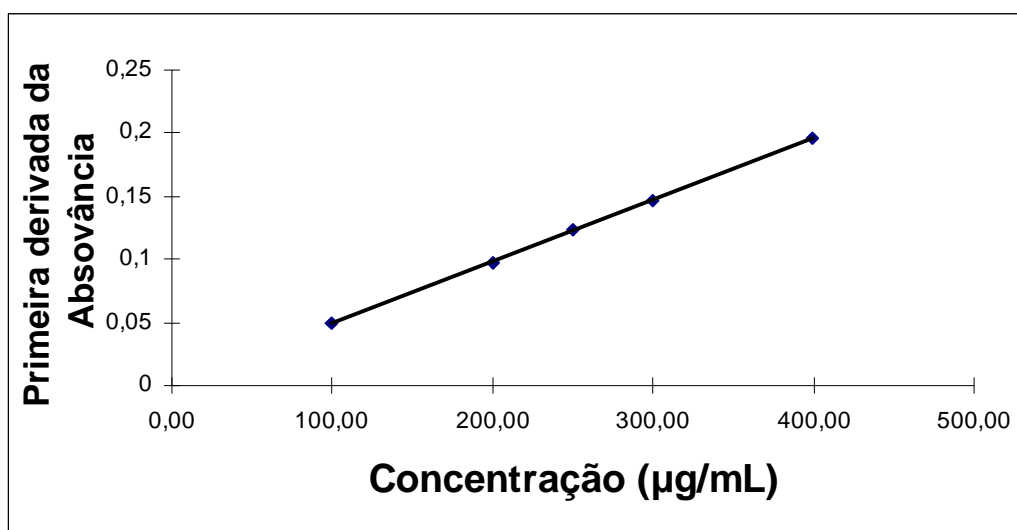
ANOVA	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,01191018	0,0119102	61058,34	1,4616E-07
Resíduo	3	5,8519E-07	1,951E-07		
Total	4	0,01191076			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P
Interseção	0,00042055	0,00053183	0,7907642	0,486829
Variável X 1	0,48829538	0,00197611	247,09986	1,46E-07

Os dados mostram que há regressão significativa, que a reta passa pela origem e o desvio padrão relativo da regressão é igual a 0,36, sendo que o desejável é que seja menor que 1.

O desvio padrão relativo da regressão foi calculado dividindo o erro padrão da regressão pela somatória das respostas (absorvâncias) multiplicada por 100.



**Figura 8.** Plotagem dos resultados do teste preliminar de linearidade, concentração de fluconazol em µg/mL x primeira derivada da absorvância.

### Validação

As medidas espectrofotométricas foram conduzidas utilizando água como diluente e branco. O espectrofotômetro, UV/VIS HP<sup>®</sup> modelo 8453, foi programado para gerar a derivada de primeira ordem do espectro obtido entre 200 e 400 nm. A quantificação foi realizada através da medição da amplitude da derivada de primeira ordem no comprimento de onda de 268 nm.

#### *Preparo das soluções padrão e amostra*

Três soluções estoque foram preparadas na concentração de 1250 µg/mL utilizando fluconazol padrão de trabalho. Para isso 125 mg de fluconazol padrão de trabalho foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, em triplicata. Os padrões foram solubilizados com 5 mL de metanol e tiveram seus volumes completados com água. Cinco soluções de trabalho (150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL) foram obtidas através de diluições de cada solução estoque usando água como diluente.

Estas soluções finais foram utilizadas nos testes de linearidade e precisão de repetibilidade do método. Semelhantemente, três outras curvas foram preparadas nas mesmas concentrações utilizando placebos enriquecidos. Estas preparadas para avaliação da exatidão do método. Para o teste de precisão intermediária três curvas analíticas foram preparadas, por outro analista e com dois dias de intervalo da primeira curva, utilizando fluconazol padrão secundário e contemplando as concentrações baixa, média e alta.

Todas as soluções foram sonicadas por 30 minutos, filtradas empregando papel de filtro quantitativo e o diluente foi empregado como branco.

Para o ensaio de robustez soluções padrão e amostra foram preparadas a 100% da concentração (250 µg/mL) e foram sonicadas por 25 minutos.

*Especificidade:* avaliada pela comparação dos espectros de absorvância contendo possíveis substâncias interferentes (excipientes usados na produção das cápsulas) e amostras contendo fluconazol.

*Linearidade:* determinada através dos cálculos de regressão linear dos valores de absorvâncias em relação às concentrações das soluções padrão (150, 200, 250, 300, e 350 µg/mL) usando o método dos mínimos quadrados.

*Exatidão:* avaliada através dos cálculos da porcentagem de recuperação da concentração média de fluconazol em cinco diferentes concentrações (150, 200, 250, 300, e 350 µg/mL) e pela determinação do desvio padrão relativo (DPR).

*Precisão:* avaliada em diferentes níveis: repetibilidade, avaliada através da construção de três curvas lineares com cinco diferentes concentrações de soluções padrão (150, 200, 250, 300, e 350 µg/mL) analisadas no mesmo dia; intermediária, avaliada através da análise de três diferentes concentrações de soluções padrão: alta, média e baixa, em diferentes dias e realizada por outro analista. Entre os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foi dado o intervalo de dois dias. A faixa de trabalho deriva dos testes de linearidade, precisão e exatidão, sendo a faixa de concentração que atende aos requisitos destes ensaios.

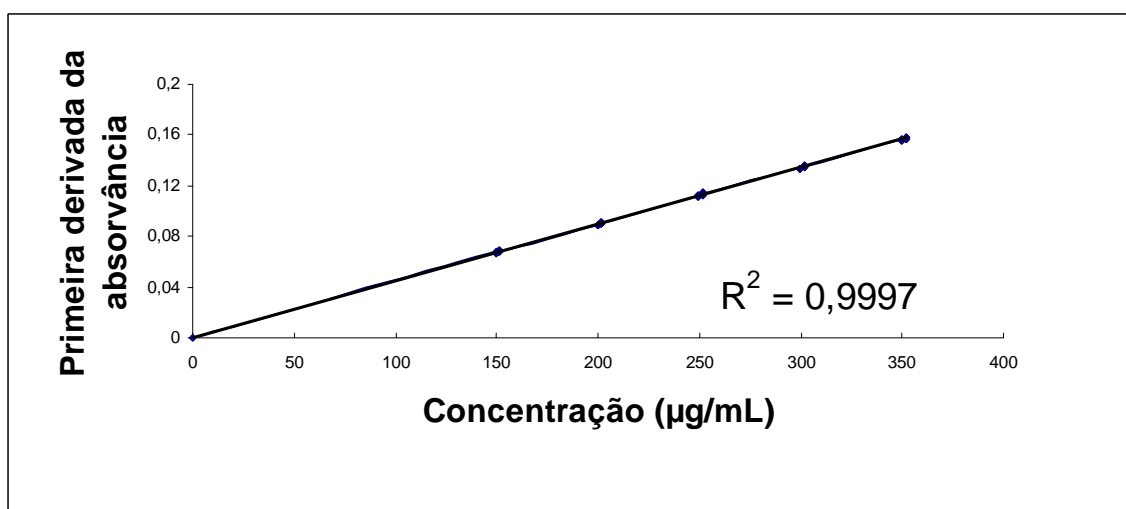
*Limites de detecção e quantificação:* foram obtidos através do desvio padrão do intercepto com o eixo do Y das 3 curvas analíticas construídas para o ensaio de linearidade e a inclinação da curva analítica.

*Robustez:* a interferência do tempo de sonificação sobre o doseamento foi verificado. Soluções padrão e amostra de fluconazol foram preparadas na concentração central da curva analítica (100%, 250 µg/mL). Estas soluções foram sonicadas por 25 minutos.

### Resultados para validação

#### Linearidade

Como resultado da regressão linear foi obtida a equação  $y = 0,446X + 5,3 \times 10^{-4}$ , onde  $y$  é a amplitude do espectro da derivada de primeira ordem em 268 nm e  $x$  a concentração em  $\mu\text{g/mL}$ . O coeficiente de determinação,  $r^2$ , foi igual a 0,9997. A homogeneidade dos resultados é demonstrada pelo desvio padrão da regressão, 0,59. O desvio padrão do intercepto é igual a 0,00027. A Figura 9 apresenta a reta obtida através da análise de regressão.



**Figura 9.** Plotagem dos resultados do ensaio de linearidade. Concentração de fluconazol em mg/mL x primeira derivada da absorvância.

A validade da regressão linear foi testada pela análise de variância (ANOVA). Os resultados mostraram que a inclinação da reta é estatisticamente significativa, ( $p < 0,05$ ). Além disso, a reta passa pela origem, pois o intercepto não é estatisticamente significativo, ( $p > 0,05$ ). A Tabela 6 mostra os resultados obtidos na análise de variância.



### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 6.** Dados da análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,045129801	0,0451298	102441,9	2,97E-74
Resíduo	43	1,89432E-05	4,405E-07		
Total	44	0,045148744			
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>
Interseção	-0,00052666	0,000363513	-1,4488072	0,154645	-0,00125975
Variável X 1	-0,44613139	0,001393875	-320,06552	2,97E-74	-0,4489424

gl: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: quadrados médios.

#### *Exatidão*

Três curvas foram preparadas utilizando cinco diferentes concentrações de placebo enriquecido (150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL) em triplicata e analisadas através do método proposto. Os resultados analíticos foram interpretados interpolando a equação da reta obtida no ensaio de linearidade para chegar à porcentagem de fluconazol recuperada para cada concentração. Os resultados podem ser vistos na Tabela 7. As porcentagens de recuperação obtidas estão entre 98,94 e 101,49 e o DPR médio da recuperação foi igual a 0,65%, o que demonstra forte relação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores reais.

**Tabela 7.** Resultados para o teste de exatidão nos diferentes níveis de concentração de fluconazol em soluções de placebo enriquecido

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
150	99,51	0,39
200	99,89	0,43
250	100,42	0,68
300	100,79	0,57
350	100,51	0,17

DPR: desvio padrão relativo.

#### *Precisão*

As três curvas analíticas preparadas utilizando fluconazol padrão de trabalho com cinco concentrações diferentes (150, 200, 250, 300 e 350  $\mu\text{g/mL}$ ), para o ensaio de repetibilidade, e a curva similarmente preparada contendo três concentrações (150, 250 e 350  $\mu\text{g/mL}$ ), para o ensaio de precisão intermediária, foram analisadas. Sobre os resultados obtidos foram calculados médias, desvios padrão e desvios padrão relativo para cada grupo de concentração separadamente e para toda a curva. Os resultados podem ser vistos na Tabela 8.

O desvio padrão relativo obtido para a repetibilidade foi igual a 0,65% e para a precisão intermediária foi de 0,75%. Esses resultados demonstram a boa precisão do método.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 8.** Resultados para o teste de precisão nos diferentes níveis de concentração de fluconazol

Dia	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)	DPR médio (%)	DPR médio total (%)
Repetibilidade (n=45)				
1	150	0,99		
	200	0,48		
	250	0,57	0,65	
	300	0,55		
	350	0,42		0,75
Intermediária (n=9)				
4	150	0,19		
	250	0,34	0,73	
	350	0,22		

DPR: desvio padrão relativo.

#### *Limites de detecção e quantificação*

Os limites foram estimados através das equações 2 e 3 mostradas na páginas 19 e 20, respectivamente. Os valores encontrados para LD e LQ foram 1,87 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### *Robustez*

Um dos pontos críticos de um procedimento analítico é conseguir extrair todo o fármaco que se encontra misturado aos excipientes de uma forma farmacêutica. Para isso deve-se empregar o solvente adequado e em quantidade adequada, bem como sistema de agitação ou sonificação em condições e tempo suficientes.

Para extração do fluconazol de sua forma farmacêutica (cápsula) foi empregado água e sonificação por 30 minutos.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

A robustez do método foi avaliada em seu ponto crítico que é a extração do fármaco de sua formulação e sua completa solubilização. Para isso foram preparadas soluções padrão de trabalho e amostra, em duplicata, e estas foram submetidas a um tempo inferior de sonificação (25 minutos). O teor das amostras foi avaliado e o resultado foi comparado ao resultado obtido para o teor do produto avaliado nas condições preconizadas através do teste *t-Student*. Os resultados mostram que não há diferença estatisticamente significativa. Assim pode-se considerar o método robusto.

#### *Aplicação do método*

O método espectrofotométrico validado foi aplicado a cinco diferentes amostras de fluconazol em triplicata, sendo quatro amostras produtos magistrais (A, B, C e D) de diferentes farmácias magistrais, e um produto industrializado, genérico (E). Nessas amostras o teor de fluconazol foi avaliado. Os resultados podem ser vistos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Doseamento de fluconazol 150 mg cápsulas manipulado em diferentes farmácias magistrais (A a D) e fluconazol 150 mg cápsulas industrializado, produto genérico (E)

Amostras	Massa (mg)	Teor médio (%)	DPR (%)
A	144,64	96,42	0,65
B	148,07	98,71	0,70
C	140,91	93,94	1,48
D	142,97	95,31	0,84
E	147,71	98,47	1,28

DPR: desvio padrão relativo.

### 3.2.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### Desenvolvimento analítico

CLAE é um método de separação amplamente empregado em estudos de estabilidade, principalmente por possibilitar a separação entre o fármaco em análise e seus produtos de degradação, podendo assim servir como indicativo da estabilidade do produto.

No desenvolvimento analítico buscou-se um método simples e otimizado. Um método rápido, com curto tempo de corrida e baixo custo. Para isso alguns parâmetros cromatográficos foram considerados como a assimetria do pico (que pode ser descrita pelo fator de cauda (T), o número de pratos teóricos (N) e o fator de retenção (k'), equações 9, 10 e 11. Partiu-se dos princípios de não utilização do solvente acetonitrila, devido à forte oscilação de seu custo podendo se tornar bastante elevado, e não utilização de soluções tampão devido ao desgaste que causam ao sistema cromatográfico. Diferentes fases móveis foram testadas empregando metanol (com ou sem a adição de trietilamina 0,5% (v/v) ou ácido acético 0,1% (v/v)) e água em várias proporções que foram de 90:10 a 40:60 de metanol:água. Diferentes taxas de vazão de 0,8 e 1,0 mL/min e os dois máximos de absorção do fluconazol na região UV, 210 e 261 nm foram avaliados. As colunas cromatográficas empregadas foram Agilent® C18 (250 x 4,6 mm, 5µm) não capeada e Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5µm) capeada.

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (\text{equação 9})$$

em que, w é a largura na base a 5% de sua altura, em unidades de tempo e f é a largura do pico de seu início ao meio (ponto de maior altura).

$$N = \frac{16 \times (tR)^2}{W^2} \quad (\text{equação 10})$$

em que,  $t_R$  é o tempo de retenção,  $w$  é a largura na base, em unidades de tempo.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{equação 11})$$

em que,  $t_R$  é o tempo de retenção do fármaco e  $t_M$  é o tempo morto.

Cauda e formação irregular do pico do fluconazol foram observadas em algumas condições, apresentando fator de cauda inadequado e variável que poderia comprometer a exatidão e precisão do método. A adição de trietilamina ou ácido acético na fase móvel não ajudou a melhorar o fator de cauda. Esses eventos podem, provavelmente, ser explicados pelo estabelecimento de interações entre os grupos amino do fluconazol e os grupos silanóis da fase estacionária, que é comumente observado em moléculas contendo esses grupos químicos (Neves *et al.*, 2010). Foram, então, utilizadas colunas capeadas (Symmetry Waters, Milford, MA, USA, e Agilent, Santa Clara, USA) e os valores observados para o fator de cauda na maior parte dos testes foram aceitáveis. O uso de colunas capeadas para melhorar a simetria dos picos em análises de diferentes fármacos que interagem com grupos silanóis é vastamente empregado.

O fluconazol apresenta três diferentes valores de  $pK_a$ :  $11,01 \pm 0,29$ ;  $2,94 \pm 0,10$ ;  $2,56 \pm 0,12$  (ACD, 1994-2002) que correspondem ao grupamento álcool, doador de próton, e aos nitrogênios 4 e 11, receptores de próton. Assim, a solubilidade aquosa do fluconazol é maior em valores extremos de pH (acima de 11,01 e abaixo de 2,94), situações em que o fármaco estaria totalmente ionizado. Em cromatografia líquida de fase reversa fármacos totalmente ionizados podem ser combinados com pareadores iônicos para um melhor desempenho analítico. No entanto isso não foi possível ao fluconazol, pois as colunas empregadas não resistiriam aos valores extremos de pH necessários. Em pH intermediário, o fluconazol estará parcialmente ionizado, isso pode favorecer as ligações aos grupos silanóis.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Apesar das dificuldades com relação à ionização do fluconazol conseguiu-se uma boa simetria do pico com valores de fator de cauda mantido estável em 1,3 – 1,5, considerados aceitáveis. A boa simetria foi conseguida empregando coluna capeada e a fase móvel constituída por metanol e água (60:40, v/v). Os resultados para os parâmetros cromatográficos avaliados para o método desenvolvido estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Parâmetros de desempenho do método cromatográfico desenvolvido para fluconazol

Parâmetros cromatográficos	Resultados	Critério de aceitação
Tempo de retenção do fluconazol (min)	3,7	-
Tempo de retenção do solvente (min)	1,2	-
Fator de retenção, $k'$	2,08	$2 < k' < 10$
Fator de cauda	1,33	0,8–1,5
Número de pratos teóricos, N	2196	$N > 2000$

Assim o método que apresentou os melhores resultados com relação aos parâmetros cromatográficos utiliza coluna de fase reversa, C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) capeada, vazão de 1,0 mL/min, de modo isocrático e com fase móvel composta por água e metanol (60:40, v/v), injeção de 20 µL e efluente monitorado a 261 nm. A concentração de trabalho utilizada é 600 µg/mL, em água purificada como diluente.

#### Validação

A validação analítica foi realizada para fluconazol cápsulas e matéria-prima e em laboratórios diferentes utilizando os cromatógrafos Varian® modelo LC 920, e Waters® modelo 2695. Posteriormente, este método foi testado quanto à sua reprodutibilidade, pois passou a ser aplicado em um terceiro laboratório utilizando

o cromatógrafo a líquido Waters® composto de bomba binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detetor UV-Vis Waters 2487.

### *Preparo das soluções padrão e amostra*

Três soluções estoque foram preparadas na concentração de 1250 µg/mL utilizando fluconazol padrão de trabalho. Para isso 125 mg de fluconazol padrão de trabalho foram pesados em triplicata e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. O padrão foi solubilizado com 5 mL de metanol e o volume completado com água. Seis soluções de trabalho (240, 360, 480, 600, 900 e 1200 µg/mL) foram obtidas através de diluições de cada solução estoque usando água como diluente. A faixa de variação foi testada entre 40-200% da concentração de 600 µg/mL. Semelhantemente, três outras curvas foram preparadas nas mesmas concentrações utilizando placebos enriquecidos. Estas últimas curvas foram preparadas para avaliação da exatidão do método. Todas as soluções foram agitadas por 30 minutos a 50 rpm e filtradas utilizando filtros de seringa de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm.

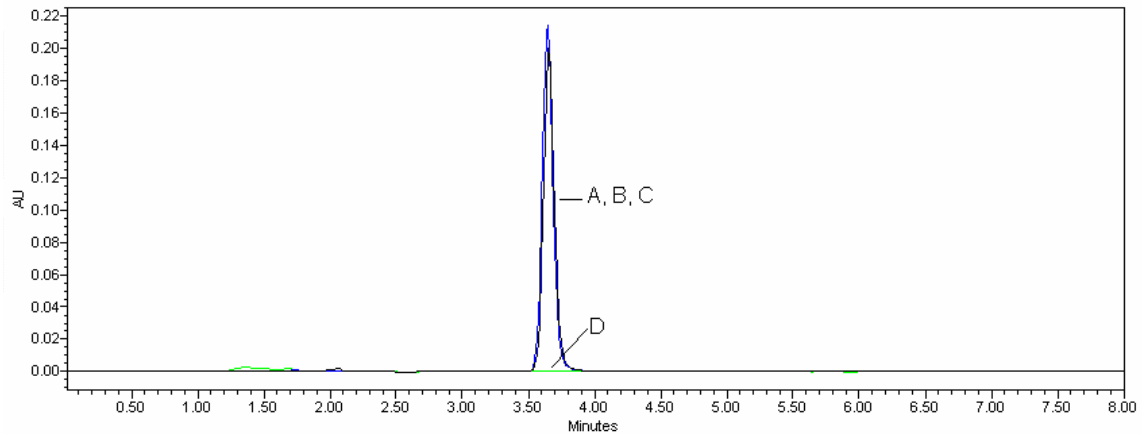
Para o ensaio de robustez soluções padrão de trabalho e amostra foram preparadas a 100% da concentração de análise (600 µg/mL) e foram agitadas por 25 minutos.

## **Resultados da validação**

### *Especificidade*

A especificidade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas do fluconazol SQR, padrão de trabalho, do produto fluconazol cápsulas e seu placebo que poderiam ser potenciais interferentes (Figura 10). Nenhum pico foi observado no tempo de retenção do fluconazol.





**Figura 10.** Sobreposição dos cromatogramas de fluconazol SQR (A), fluconazol padrão de trabalho (B), fluconazol cápsulas (C) e seu placebo (D). Soluções de fluconazol a 100% da concentração (600 µg/mL) eluído a partir da coluna Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40), vazão de 1 mL/min e leitura a 261 nm.

Amostras de fluconazol padrão de trabalho submetidas a diferentes condições de estresse (temperatura, luz UVC, pH e oxidação) foram avaliadas a fim de detectar a ocorrência de algum possível produto de degradação que interferisse no pico do fluconazol. Estas amostras foram avaliadas com detectores UV simples e UV com DAD, do inglês *Diode Arrange Detector*, (detector de arranjo de diodos). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11 e nas Figuras 11 a 15. Nenhuma alteração foi detectada no tempo de retenção do fluconazol, além disso, a porcentagem de recuperação do fluconazol nos ensaios de estresse mostrou que o fármaco não foi afetado, exceto quando exposto ao peróxido de hidrogênio em alta temperatura (90 °C) sob refluxo.

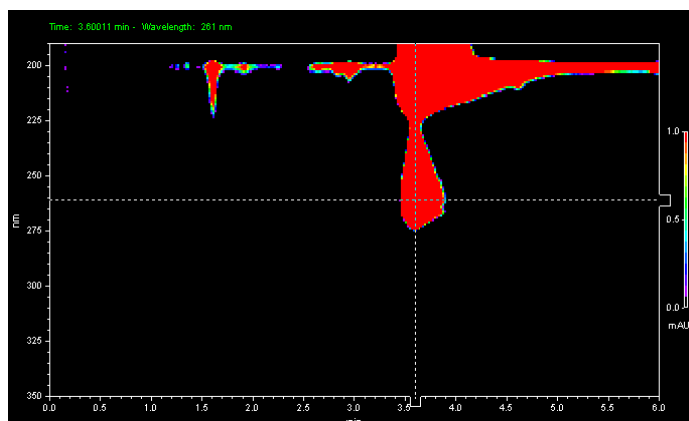
### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 11.** Teor de fluconazol das soluções padrão de trabalho (500 µg/mL) submetidas a diferentes condições de estresse e surgimento de novos picos

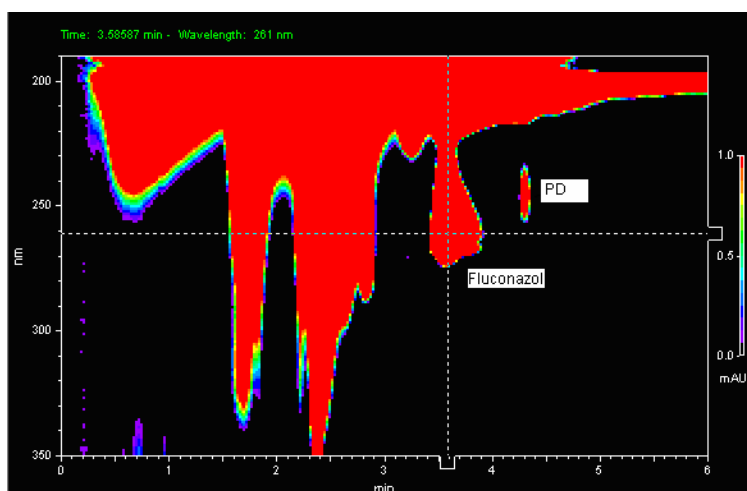
Estresse	Tratamento das amostras	Novos picos (tR)	TR <sup>a</sup> (min)	Recuperação (%)
Referência	Nenhum (recentemente preparada)	-	3,70	100,00
água	após 1 h, em água	não	3,71	98,15
pH	após 1 h, em HCl 0,1 M	não	3,83	99,02
pH	após 1 h, em NaOH 0,1 M	não	3,62	100,00
oxidação	após 1 h, em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (V/V)	não	3,67	94,13
luz UV	após 1 h, sob luz UVC	não	3,69	100,00
	após 24 h, sob luz UVC	não	3,69	100,00
água	após 6 h, sob refluxo, em água a 90 °C	não	3,71	100,00
pH + temperatura	após 6 h, sob refluxo, em HCl 0,1 M a 90 °C	não	3,86	100,00
pH + temperatura	após 6 h, sob refluxo, em NaOH 0,1 M a 90 °C	não	3,67	101,84
oxidação+ temperatura	após 6 h, sob refluxo, em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (V/V) a 90 °C	sim (4,18)	3,65	90,12

TR: tempo de retenção; TR<sup>a</sup>: Tempo de retenção do fluconazol.

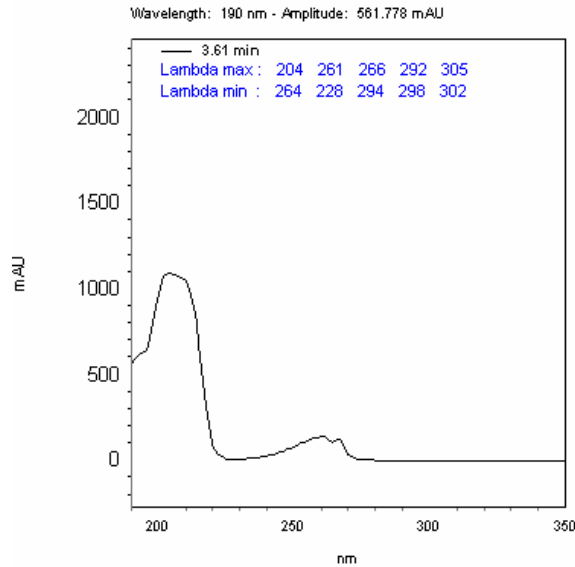
O pico de um possível produto de degradação do fluconazol observado apenas sob oxidação foi totalmente resolvido do pico do fluconazol com resolução igual a 1,58. Desta forma, todos os dados obtidos evidenciam que o método desenvolvido é específico e indicativo de estabilidade para o fluconazol.



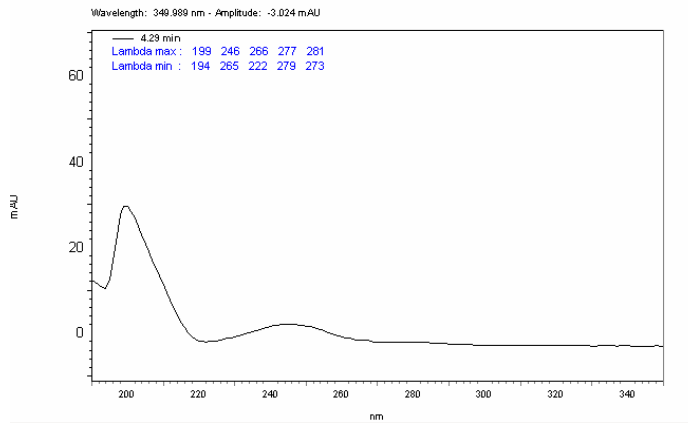
**Figura 11.** Cromatograma UV bidimensional do fluconazol padrão de trabalho preparado em água (500 µg/ mL), utilizando CLAE com detector de arranjos de diodos, coluna capeada Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40) e vazão de 1 mL/min. No eixo à esquerda está a escala dos comprimentos de onda (nm), no eixo à direita a coluna em cores indica a intensidade do sinal (mAU) de cada pico, e em baixo a escala do tempo em minutos (min) indicando o tempo de corrida.



**Figura 12.** Cromatograma UV bidimensional do fluconazol padrão de trabalho preparado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% V/V (500 µg/ mL) após 6 horas de aquecimento a 90 °C sob refluxo, utilizando CLAE com detector de arranjos de diodos, coluna capeada Waters® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), usando a fase móvel metanol:água (60:40) e vazão de 1 mL/min.



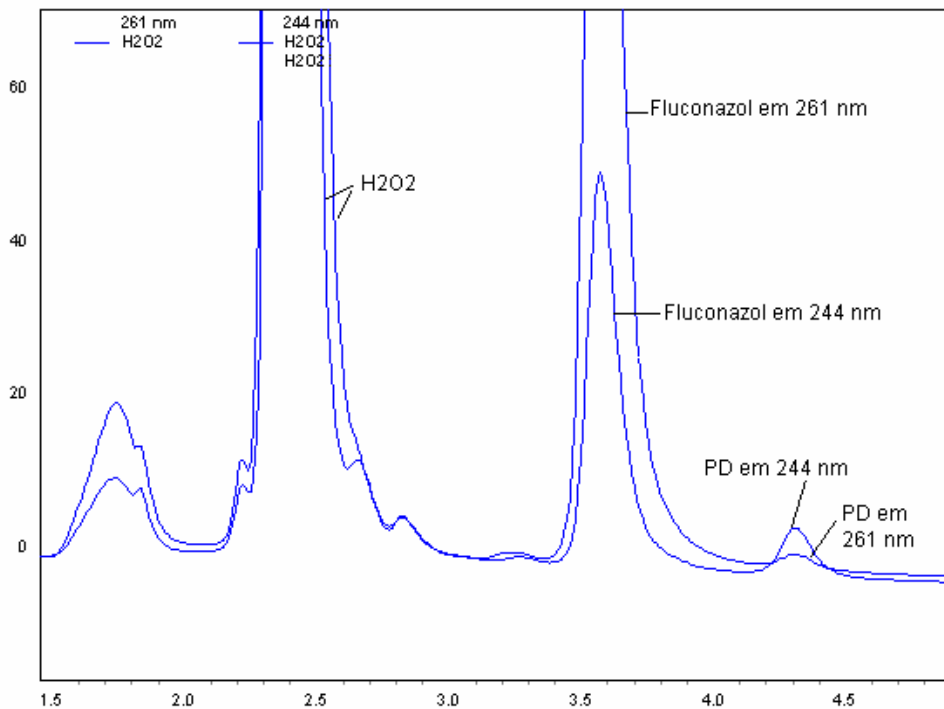
**Figura 13.** Espectro de absorção do fluconazol padrão de trabalho, indicando os máximos e mínimos comprimentos de absorvância, referente ao isograma do fármaco apresentado na Figura 22. Na lateral esquerda está a escala da intensidade do sinal (mAU) e em baixo a escala do comprimentos de onda (nm).



**Figura 14.** Espectro de absorção do possível produto de degradação do fluconazol (PD) obtido após estresse oxidativo, indicando os máximos e mínimos comprimentos de absorvância, referente ao isograma do fármaco apresentado na Figura 24. Na lateral esquerda está a escala da intensidade do sinal (mAU) e em baixo a escala do comprimentos de onda (nm).

O cromatograma UV bidimensional apresentado na Figura 12 apresenta o pico do possível produto de degradação do fluconazol (PD) obtido após o estresse oxidativo que se apresenta separado do pico referente ao fluconazol e apresenta espectro de absorção no UV ligeiramente diferente do fármaco. A diferença espectral também pode ser comprovada ao comparar as Figuras 13 e 14.

A sobreposição de cromatogramas apresentado na Figura 15 destaca as diferenças de absorvidade na região do UV que o fluconazol e seu possível produto de degradação apresentam.

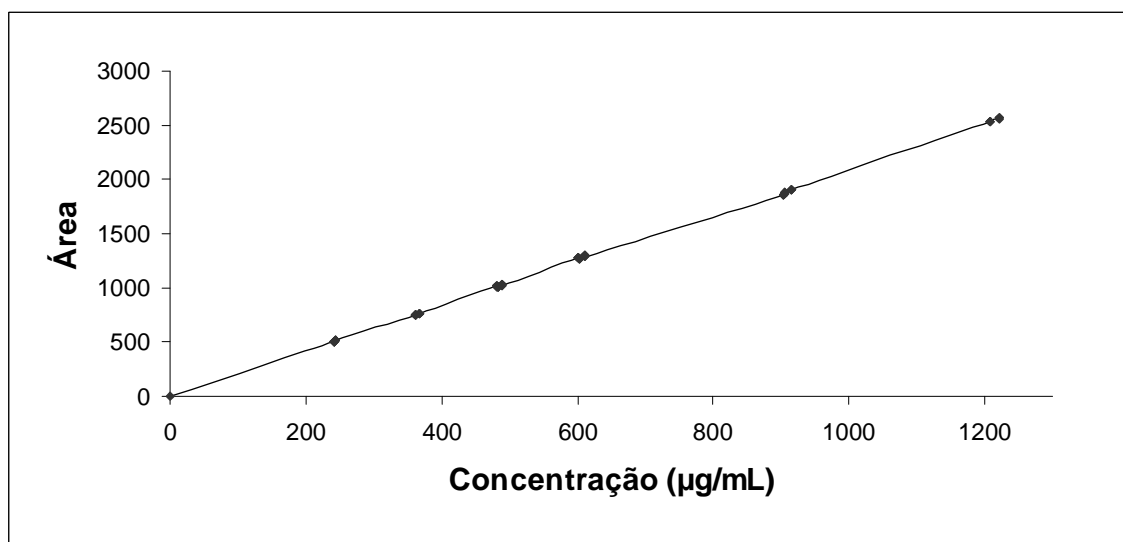


**Figura 15.** Sobreposição de cromatogramas obtido para o fluconazol padrão de trabalho preparado em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% V/V (500 µg/mL) após 6 horas de aquecimento a 90 °C sob refluxo em 261 nm e 244 nm. Na lateral esquerda está a escala da intensidade do sinal (mAU) e em baixo a escala do tempo em minutos (min) indicando o tempo de corrida.

### Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de concentração de 240 a 1200  $\mu\text{g/mL}$  através da inspeção visual da curva analítica plotada (Figura 16) e pelos cálculos de regressão e do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) pelo método dos mínimos quadrados. A equação da reta obtida é:  $y = 2,0840x - 5,3336$ , onde  $y$  corresponde à área do pico e  $x$  à concentração das soluções em  $\mu\text{g/mL}$ , o  $r^2$  foi igual a 0,9997, que indica a excelente linearidade do método na faixa avaliada e o DPR da regressão menor que 0,01%.

A validade da regressão linear também foi acessada através do teste de variância (ANOVA). Os resultados (Tabela 12) mostram que a inclinação da reta é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e que a curva passa pela origem, não sendo o intercepto estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ).



**Figura 16.** Curva analítica de fluconazol obtida no estudo de linearidade por CLAE (coluna capeada Waters<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), usando a fase móvel metanol:água (60:40) e vazão de 1 mL/min) ( $n = 54$ ).

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

**Tabela 12.** Dados da análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	21271241,6	21271242	150602,8	4,01906E-87	
Resíduo	49	6920,79143	141,24064			
Total	50	21278162,4				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	5,3336041	3,63729867	1,4663641	0,148938	-1,97582107	12,6430293
Variável X 1	2,0840051	0,00537009	388,07582	4,02E-87	2,07321353	2,09479676

gl: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; MQ: quadrados médios.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

#### Precisão

A precisão foi avaliada em três níveis, repetibilidade, intermediária e reprodutibilidade. As seis concentrações da faixa linear foram avaliadas em triplicata, exceto para reprodutibilidade em que três níveis de concentração foram analisados. Os resultados são apresentados na Tabela 13 e mostram que o método é bastante preciso.

**Tabela 13.** Resultados para o teste de precisão para diferentes níveis de concentração de solução padrão de fluconazol, em diferentes dias

Concentração (µg/mL)	Resposta média (área ± dp)	DPR (%)	DPR médio (%)	DPR médio total (%)
Repetibilidade (n=54)				
240	509833 ± 2345	0,46		
360	758077 ± 2047	0,27		
480	1017977 ± 3970	0,39		
600	1278355 ± 10354	0,81	0,82	
900	1880044 ± 9588	0,51		1,96
1200	2547616 ± 3566	0,14		
Intermediária (n=27)				
360	797794 ± 2771	0,35		
600	1323803 ± 9729	0,73	0,61	
900	1993784 ± 12849	0,64		
Reprodutibilidade (n=27)				
360	860438 ± 6050	2,54		
600	1400507 ± 13100	0,94	0,61	2,50
900	2083800 ± 3948	0,19		

dp: desvio padrão; DPR:desvio padrão relativo.



## CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

### *Exatidão*

A exatidão foi avaliada através do cálculo de porcentagem de recuperação de fluconazol. As seis concentrações, preparadas em triplicata, avaliadas na linearidade foram acessadas através placebos enriquecidos. A recuperação média foi igual a  $101,06 \pm 0,69\%$ , que mostra o forte acordo entre os valores experimentais e teóricos. Os resultados do ensaio são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Resultados obtidos no ensaio de exatidão para os níveis de concentração de fluconazol ensaiados

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação média (%)	DPR (%)
240	100,97	0,52
360	100,24	0,43
480	101,47	0,26
600	101,69	0,34
900	100,86	0,66
1200	101,37	0,45

DPR: desvio padrão relativo.

### *Faixa de trabalho*

A faixa de trabalho resulta dos ensaios de precisão e exatidão. Assim, a faixa linear, precisa e exata que pode ser trabalhada neste método encontra-se entre 240 e 1200  $\mu\text{g/mL}$ .

### *Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)*

Ambos os limites foram estimados através de calculos baseados no ruído da linha de base através das relações 3:1, para limite de detecção e 10:1, para

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

limite de quantificação. Os resultados para LD e LQ são, respectivamente, 6,72 e 22,41 µg/mL.

#### *Robustez*

O teste de robustez foi executado com base no método de Youden & Steiner (Youden & Steiner, 1975). A robustez do método foi avaliada através de pequenas e deliberadas mudanças em sete parâmetros e oito corridas analíticas empregando fluconazol padrão secundário e fluconazol cápsulas. A influência dessas pequenas mudanças sobre o doseamento do produto foi analisada. As Tabelas 15 e 16 mostram a combinação fatorial dos parâmetros analíticos avaliados e os parâmetros com as variações feitas para o teste de robustez.

**Tabela 15.** Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez através do teste de Youden & Steiner

Variáveis	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	B	b
C,c	C	c	C	c	C	C	C	c
D,d	D	D	d	d	D	D	D	D
E,e	E	e	E	e	E	E	E	E
F,f	F	f	f	F	F	F	F	F
G,g	G	g	g	G	G	G	G	g
<i>Resultados</i>	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>w</i>	<i>z</i>

Para avaliar o efeito de cada parâmetro a média dos quatro valores de resultados correspondentes a condição alterada (letras minúsculas) foi subtraído da média dos quatro valores de resultados obtidos através da análise nas condições padrão (letras maiúsculas) aplicando a equação 12 para cada variável avaliada.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

$$A = \frac{x+y+w+z}{4} - \frac{s+t+u+v}{4} \quad (\text{equação 12})$$

A maior variação no doseamento do fluconazol foi observada em relação ao tempo de agitação e foi igual a 4,74 %. Assim, o tempo de agitação precisa ser rigorosamente observado durante a rotina analítica. Os resultados referentes aos outros parâmetros foram consideravelmente baixos e sem significância, mostrando que pequenas mudanças não implicam em grandes variações quando ocorrem de forma não intencional.

**Tabela 16.** Parâmetros analíticos e suas variações para avaliação da robustez do método cromatográfico para a quantificação do fluconazol

	Variáveis	Condições
A	Coluna cromatográfica	A: Waters <sup>a</sup> a: Agilent <sup>a</sup>
B	Comprimento de onda	B: 261 nm b: 266 nm
C	Vazão	C: 1,0 mL/min c: 0,8 mL/min
D	Fase móvel	D: 60:40 <sup>b</sup> d: 57:43 <sup>b</sup>
E	Volume de injeção	E: 20 µL e: 15 µL
F	Temperatura do forno	F: 20 °C f: 25 °C
G	Tempo de agitação	G: 30 min g: 25 min

a: C18, 250 x 4,6mm, 5 µm; b: metanol:água.

**Padronização da matéria-prima empregando CLAE**

A matéria-prima fluconazol foi padronizada (padrão de trabalho) frente ao fluconazol SQR através do método analítico desenvolvido por CLAE. Somente após padronização a matéria-prima foi utilizada como padrão secundário nos ensaios realizados.

Para a padronização três soluções foram preparadas utilizando fluconazol matéria-prima e uma solução utilizando fluconazol SQR, com a mesma concentração, 600 µg/mL. Esse procedimento foi realizado por dois analistas. O teor das soluções de matéria-prima foi avaliado. Os resultados obtidos pelos dois analistas foram estatisticamente avaliados através do teste *t* de *Student*. Como os resultados para os dois analistas foram estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), a média de todos os resultados foi considerada o teor da matéria-prima, 101,82%. Os resultados podem ser vistos na Tabela 17.

**Tabela 17.** Resultados para os ensaios de padronização da matéria-prima fluconazol

Analista	Amostra	Concentração (µg/mL)	Área média	Teor (%)
1	padrão	0,6104	1452312	100,00
	m-p	0,6324	1541069	102,42
	m-p	0,6564	1599210	102,40
	m-p	0,6040	1474814	102,62
				Teor (%)
			DPR <sup>a</sup> (%)	0,12
Analista	Amostra	Concentração (µg/mL)	Área média	Teor (%)
2	padrão	0,5832	1407397	100
	m-p	0,6188	1507959	100,98
	m-p	0,6020	1472472,5	101,36
	m-p	0,5780	1411152,5	101,17
				Teor (%)
			DPR (%)	0,19

DPR: desvio padrão relativo.

#### ***Aplicação do método***

O método cromatográfico foi empregado na avaliação do teor de diferentes produtos de fluconazol cápsulas. Quatro amostras de diferentes farmácias magistrais (A, B, C e D) e uma amostra industrializada (E) tiveram seus teores e uniformidade de dose unitária avaliados em triplicata.

A Farmacopeia Brasileira (F. Bras.IV ed., 2005 e V ed., 2010) recomenda que o teor do fluconazol deva estar entre 90 e 110% do valor declarado e que deve apresentar uniformidade de dose unitária (F. Bras.IV ed., 1996 e V ed., 2010) entre 85 e 115% do valor declarado e desvio padrão relativo igual ou menor que 6%.

Os resultados podem ser observados na Tabela 18. Todas as amostras apresentam resultados de acordo com o preconizado na Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010). Nenhuma alteração ou pico não esperado foi observado nos cromatogramas em todas as análises.

**Tabela 18.** Resultados para os testes de Doseamento e uniformidade de dose unitária para fluconazol 150 mg cápsulas manipulado em diferentes farmácias magistrais (A a D) e fluconazol 150 mg cápsulas industrializado, produto genérico (E)

Amostra	Teor (média, %)	DPR (%)	Uniformidade (média, %)	DPR (%)
A	97,35	1,98	95,50	2,73
B	95,56	1,56	99,39	5,00
C	94,27	1,40	94,73	2,32
D	91,92	0,98	92,36	2,29
E	97,49	1,65	97,27	1,93

DPR: desvio padrão relativo.

### 3.2.2.5. Dissolução

#### Introdução

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida incorpora-se no solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação do fármaco de uma forma farmacêutica para uma determinada área, numa determinada quantidade e no tempo correto. Esta definição é mais adequada com a aplicação dos ensaios de dissolução aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico a libera (Costa & Lobo, 1999 e 2001). No entanto, podem ser incorporadas na formulação substâncias que permitam a alteração da solubilidade do fármaco no meio (Preechagoon *et al.*, 2000).

O ensaio de dissolução é uma ferramenta importante no controle de qualidade de medicamentos durante toda sua vida útil, sendo que as características de dissolução devem manter-se constantes durante todo o período de validade. Este ensaio torna-se ainda mais importante para fármacos de solubilidade aquosa baixa ou relativamente reduzida, como é o caso do fluconazol.

O método de dissolução deve ser discriminativo e deve possibilitar avaliar o comportamento do produto ao ser produzido e possíveis modificações que seu comportamento possa ter sofrido durante o estudo de estabilidade.

Segundo Marcolongo (Marcolongo, 2003), inúmeras variáveis podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser consideradas e algumas monitoradas a fim de obter resultados confiáveis. Dentre essas variáveis se encontram: a solubilidade, o tamanho de partícula e a natureza química do fármaco; a forma farmacêutica, os excipientes e a tecnologia de fabricação empregada; o aparato utilizado, a vibração do sistema, a velocidade de agitação, a posição e o método de amostragem, o emprego de dispositivos para

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

formas farmacêuticas que flutuam; o volume de meio empregado, a presença de gases no meio, o pH, a evaporação, a presença de tensoativos, a temperatura e a viscosidade do meio; o método de filtração e o método analítico; as condições de estocagem do produto.

Há um grande número de aparatos de dissolução descritos na literatura. Para formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas e comprimidos os mais utilizados são os aparatos 1 (cesto) e 2 (pás) descritos na farmacopeia americana (USP 32, 2009).

As farmacopeia brasileira (F. Bras. IV ed., 1988) e americana (USP 32, 2009) afirmam que as formas farmacêuticas não devem permanecer na superfície do líquido na cuba de dissolução durante o teste. Ao se utilizar o aparato 2 podem ser utilizados os afundadores de cápsulas, feitos de material inerte, com forma de espiral e de tamanho compatível com a forma farmacêutica testada, conhecidos como *sinkers*.

Para o desenvolvimento de um método analítico deve-se inicialmente conhecer bem as características do fármaco e seu comportamento nos meios que serão testados. Deve-se escolher um método analítico para a quantificação que seja sensível, seletivo, exato e preciso. O aparato a ser utilizado deve ser capaz de manter as condições *sink* (concentração que equivalia até 10% da concentração de saturação). Deve-se ainda considerar as condições fisiológicas para que se possa empregar um meio que mimetize a dissolução *in vivo* (Marcolongo, 2003).

A dissolução do fluconazol não era preconizada em nenhuma farmacopeia até dezembro de 2010, quando o método sugerido na consulta pública 10/2009 da ANVISA (Brasil, 2009) foi preconizado na monografia do fluconazol cápsulas da Farmacopeia Brasileira v edição (2010). Este método tem duração de 30 minutos, utiliza 900 mL de HCl 0,1 M a 37 °C, como meio de dissolução, aparato 1 (cesto), rotação de 100 rpm e quantificação por espectrofotometria a 261 nm.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

#### Desenvolvimento analítico – método para quantificação

A seletividade do método preconizado pela Farmacopeia Brasileira foi avaliada empregando o produto manipulado fluconazol cápsulas, seu placebo e cápsulas vazias. Os cálculos de interferência foram executados de acordo com o recomendado pela USP 32 (USP 32, 2009) no capítulo *The dissolution procedure: development and validation* (equação 4). Os resultados, que podem ser vistos na Tabela 19, mostram a grande interferência causada tanto pela cápsula quanto pelo placebo no resultado analítico.

A interferência não deve exceder a 2%.

**Tabela 19.** Resultados do teste de dissolução do produto fluconazol cápsulas e os valores de interferência do placebo e cápsula ensaiados por UV (método preconizado pela Farmacopeia Brasileira)

Cubas	Absorvância	Dissolução (%)	Interferência média (%)
Cápsula 1	0,38	116,17	
Cápsula 2	0,38	115,38	
Cápsula 3	0,37	113,26	
Cápsula 4	0,39	119,61	
Cápsula 5	0,37	112,06	
Cápsula 6	0,38	114,77	
<b>Média</b>	<b>0,38</b>	<b>115,21</b>	
Placebo 1	0,02	5,26	
Placebo 2	0,01	2,63	3,94
Cápsula vazia 1	0,05	13,16	
Cápsula vazia 2	0,03	7,89	10,70
<b>Interferência total</b>	<b>14,64</b>		

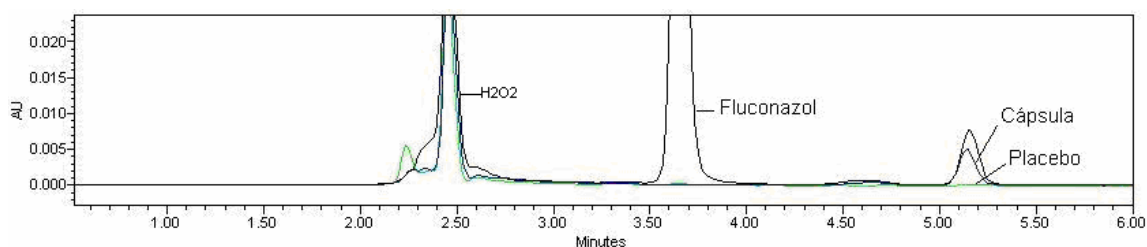


### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Tendo em vista a grande interferência presente no método avaliado (Tabela 19), as amostras de dissolução empregadas no teste de seletividade foram ainda utilizadas empregadas para avaliar os métodos já desenvolvidos e validados (CLAE e primeira derivada de espectrofotometria no UV). Os resultados mostram que ambos os métodos são seletivos também para o ensaio de dissolução e podem ser empregados no teste. A Tabela 20 apresenta esses resultados e as Figuras 17 e 18 mostram a sobreposição de cromatogramas e espectros UV obtidos no teste de seletividade.

**Tabela 20.** Resultados do teste de dissolução do produto fluconazol cápsulas e os valores de interferência do placebo e cápsula sobre os resultados ensaiados por espectrofotometria derivada

Amostras	ABS médio	Interferência (%)
Fluconazol padrão de trabalho	0,083657	-
Placebo	0,000083	0,1
Cápsula	0,0016606	1,98

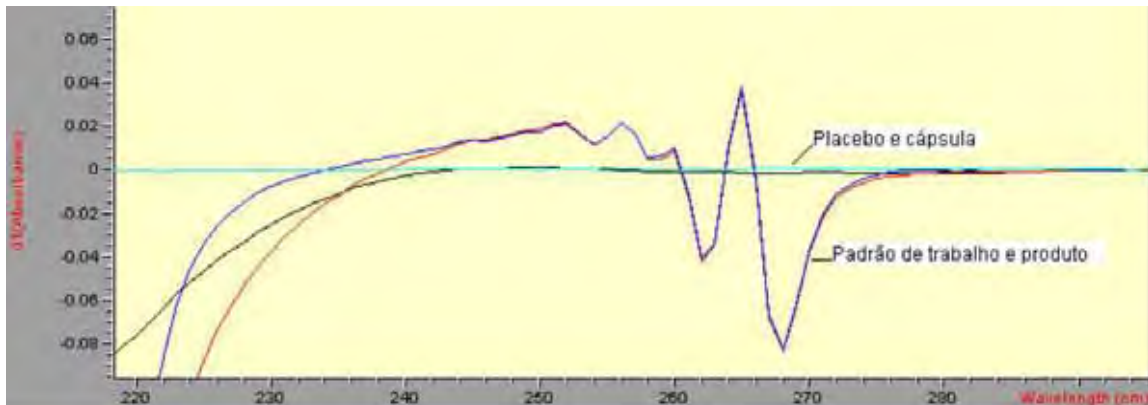


**Figura 17.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos para as amostras de dissolução do produto fluconazol cápsulas, seu placebo e cápsula, através do método por CLAE já desenvolvido para o doseamento do produto.

Como pode ser observado na Figura 17 cápsula e placebo apresentam picos, ou seja, absorvem energia no comprimento de onda escolhido para análise

do fluconazol (261 nm), mas podem ser separados do fármaco através do método desenvolvido por CLAE.

A Figura 18 mostra que o meio de diluição e o placebo não apresentam leitura considerável em 268 nm onde o fluconazol apresenta a sua maior leitura.



**Figura 18.** Sobreposição dos espectros obtidos para as amostras de dissolução do padrão de trabalho de fluconazol, fluconazol cápsulas, seu placebo e cápsula através da primeira ordem de espectrofotometria derivada a 268 nm.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 19 a taxa média de dissolução do produto é de 115,21% e o total de interferentes 14,64 %. Ao se descontar o valor médio de interferentes do valor médio de dissolução obter-se-á uma taxa de dissolução igual a 100,57% que está em acordo com os resultados obtidos para o ensaio de dissolução do produto quando quantificado por CLAE e espectrofotometria derivada (Tabelas 27 e 28).

### Desenvolvimento analítico – método para performance

Os testes de dissolução foram realizados em equipamento HANSON – SR 8 *Plus*, contendo seis cubas de dissolução, de acordo com as normas estabelecidas pela USP 32 (USP 32, 2009). A quantificação do fluconazol nas amostras foi realizada utilizando os métodos anteriormente validados em CLAE e espectrofotometria derivada na região do UV.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

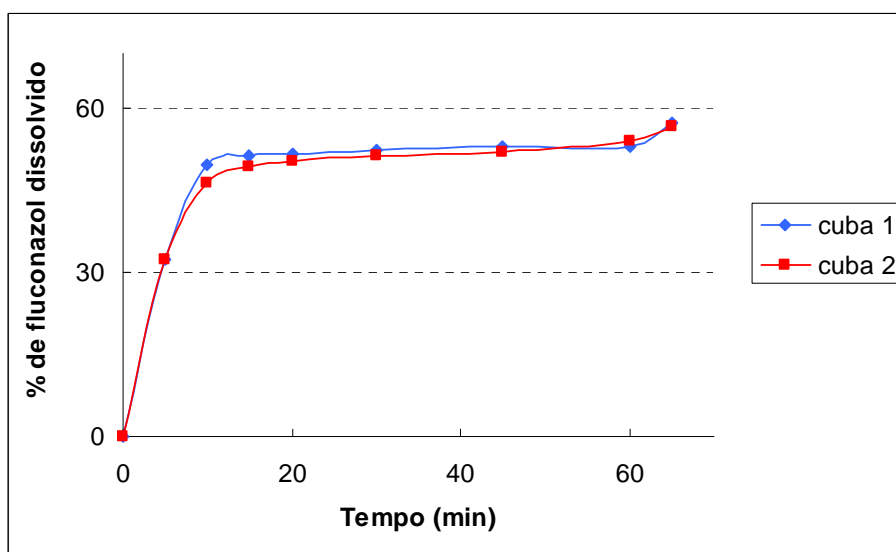
A dissolução do fluconazol cápsulas foi avaliada em meio aquoso (água deionizada), como recomendado pelo FDA (FDA, 2010) e em meio ácido (HCl 0,1 M) que apresenta pH próximo ao gástrico e maior solubilidade do fármaco, ambos a 37 °C. Também foi avaliada a utilização dos aparatos 1 (cesto) e 2 (pá), sendo a pá com e sem o emprego de *sinkers*. Com a utilização de 900 mL de meio a concentração de fármaco é próxima a 166 µg/mL, para cápsulas contendo 150 mg de fluconazol. Esta condição obedece à condição *sink*, desejável para evitar a saturação do meio, como acontece fisiologicamente.

Os meios de dissolução foram desaerados por sonificação e aquecidos a 37 °C. As amostras foram retiradas manualmente após 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 65 minutos foram filtradas em papel de filtro quantitativo e seguiu-se à leitura em espectrofotômetro. Reposição de meio foi realizada após cada coleta utilizando meio de dissolução a 37 °C. Tanto a massa retirada em cada coleta quanto as diluições feitas a cada reposição de meio foram levadas em consideração nos cálculos do perfil de dissolução.

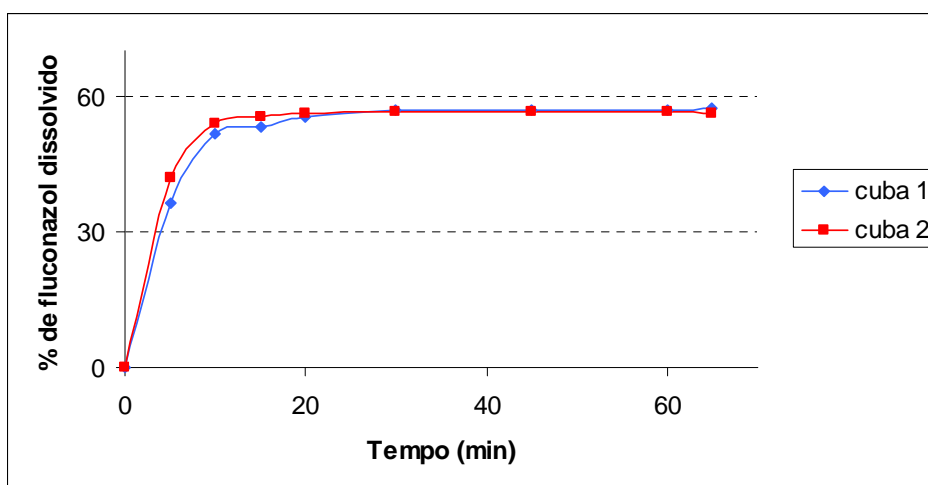
Durante os 5 últimos minutos de dissolução, a velocidade de rotação foi alterada para 150 rpm em todos os ensaios. Esta alteração serviu para verificar se todo o fármaco contido na cápsula foi realmente liberado durante os 60 minutos de ensaio na condição escolhida.

Os meios de dissolução foram utilizados como branco.

Perfis de dissolução empregando as diferentes condições foram ensaiados empregando duas cubas. As condições que compuseram método mais discriminativo foram escolhidas. Os resultados para cada ensaio podem ser vistos nas Figuras 19 a 26. Durante o desenvolvimento analítico a quantificação foi realizada através do método espectrofotométrico com derivada anteriormente validado.



**Figura 19.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pás a 75 rpm por 60 min e a 150 rpm durante 5 min finais, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

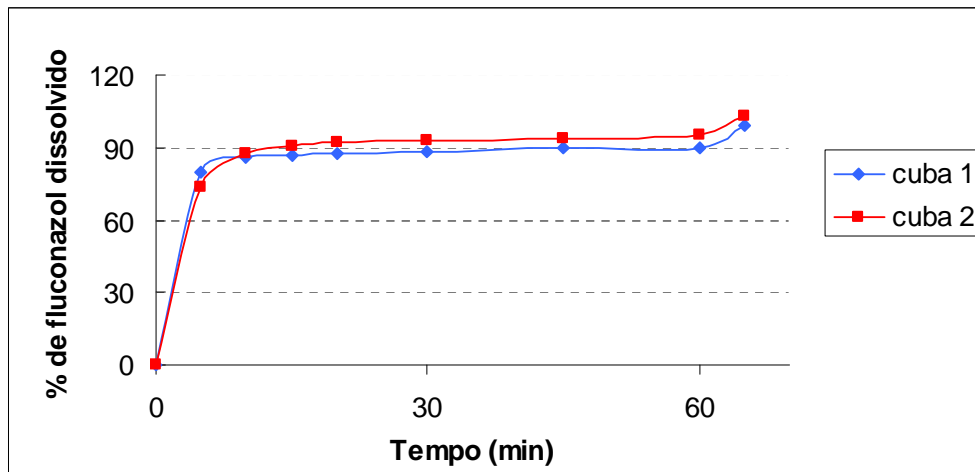


**Figura 20.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando cesto a 100 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e água como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

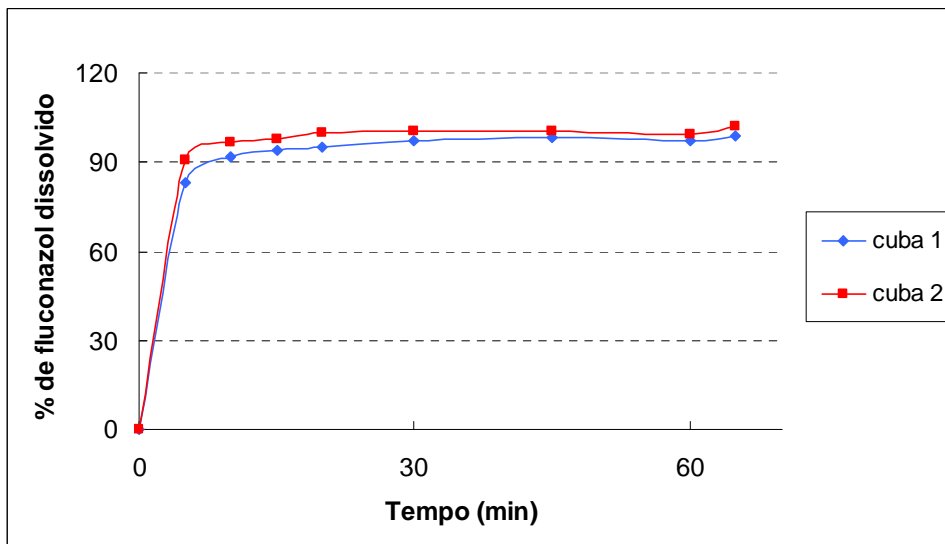
Pode-se observar através dos gráficos de perfil de dissolução apresentados nas Figuras 19 e 20 que a água não é um meio indicado para a dissolução do fluconazol. Foram utilizadas as velocidades mais altas recomendadas pela USP

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

32 (USP 32, 2009) para cada aparato e, ainda, após 60 minutos de dissolução foi empregado alta rotação (150 rpm) por 5 minutos, mesmo assim a porcentagem do fármaco dissolvida não chegou a 60 % da dose contida na cápsula.

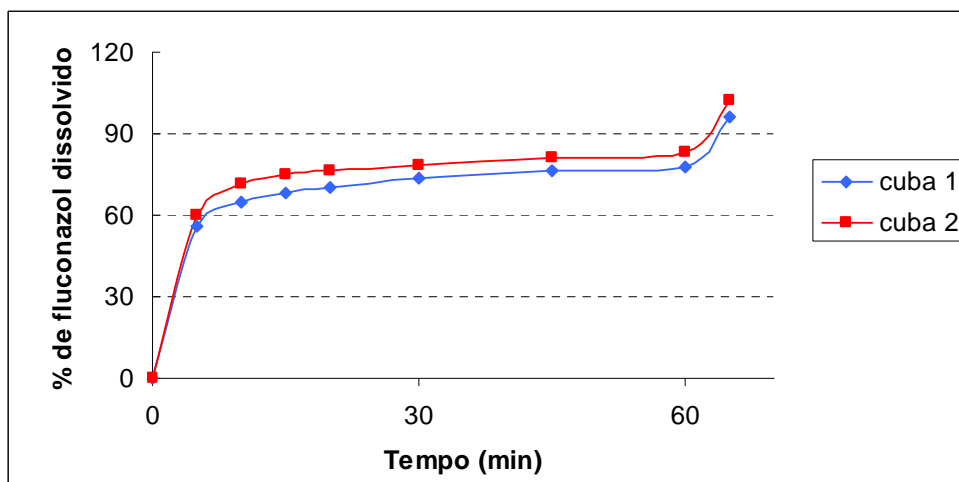


**Figura 21.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 50 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

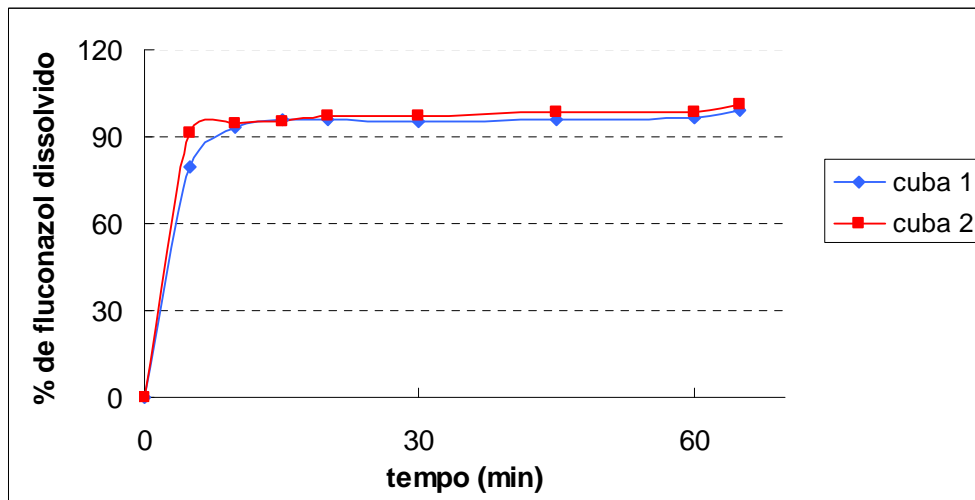


**Figura 22.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 75 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

Os gráficos de perfil de dissolução apresentados nas Figuras 21 e 22 mostram que a utilização do meio de dissolução HCl 0,1 M leva à dissolução do fluconazol bem mais rápida se comparada com o meio água anteriormente empregado. No entanto, o emprego do aparato pá leva à dissolução inicial muito rápida independente da velocidade empregada. Isto não é desejável a um método de dissolução discriminativo.

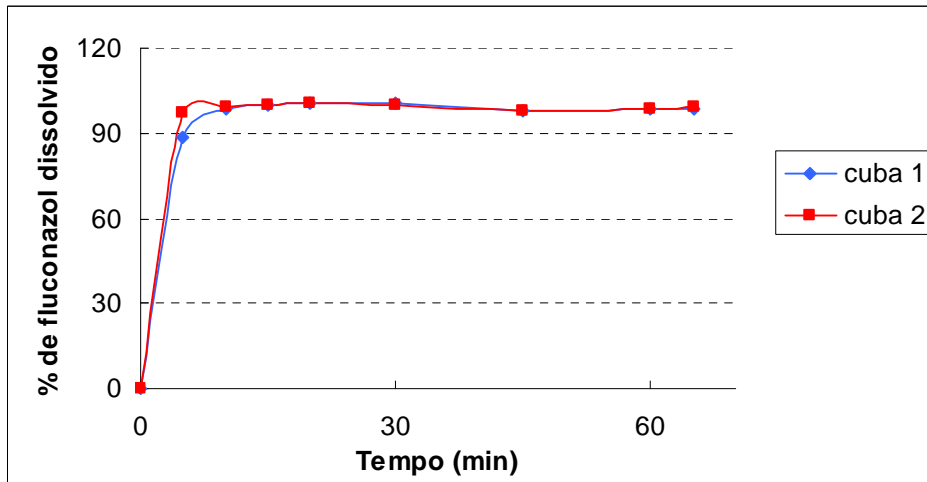


**Figura 23.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 50 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, empregando *sinker* e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

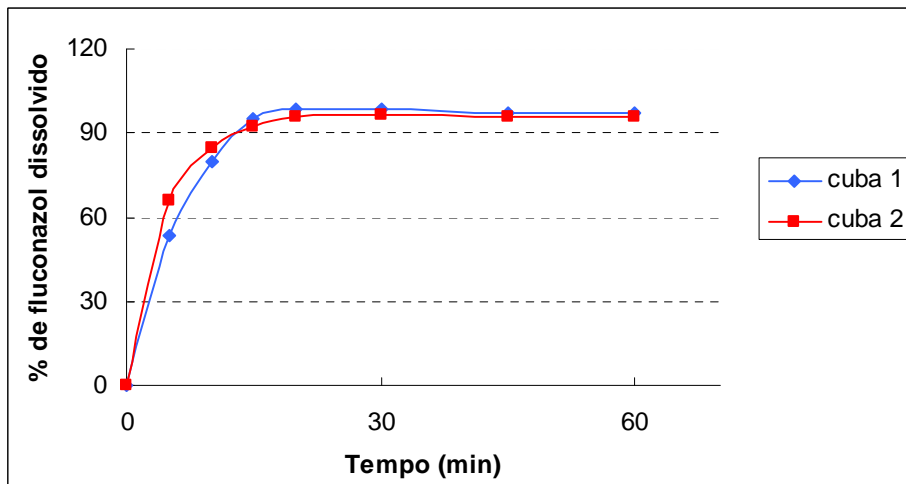


**Figura 24.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando pá a 75 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, empregando *sinker* e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

Os perfis de dissolução apresentados nas Figuras 23 e 24 mostram que a utilização do *sinker* com o aparato pá a 50 rpm e meio de dissolução HCl 0,1 M leva à dissolução do fluconazol bem mais lenta. No entanto o fármaco não é completamente liberado mesmo aos 60 minutos de teste. Pode-se observar que a liberação total só ocorre após os 5 minutos de alta rotação (150 rpm). Já o emprego do *sinker* com o aparato pá a 75 rpm e meio de dissolução HCl 0,1 M a dissolução do fluconazol permanece rápida também no início do ensaio e pouco discriminativa.



**Figura 25.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando cesto a 100 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, e HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.



**Figuras 26.** Perfil de dissolução de cápsulas de fluconazol utilizando cesto a 75 rpm e a 150 rpm durante 5 min finais, empregando HCl 0,1 M como meio de dissolução, analisados por espectrofotometria derivada.

As Figuras 25 e 26 apresentam os gráficos de perfil de dissolução utilizando o aparato cesto e meio de dissolução HCl 0,1 M. Quando empregada a velocidade de 100 rpm, a dissolução do fármaco se torna muito rápida e pouco discriminativa. Ao utilizar velocidade de 75 rpm (Figura 26) foi obtido o perfil mais discriminativo,



## CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

com dissolução inicial ligeiramente mais lenta e chegando a quase 100 % de liberação do fármaco em 30 minutos de teste.

As condições, aparato cesto, 75 rpm de velocidade e HCl 0,1 M a 37 °C como meio de dissolução, foram escolhidas para a dissolução do fluconazol cápsulas com o tempo de dissolução de 30 minutos. Este método foi validado por espectrofotometria derivada e por CLAE.

### **Validação**

Tanto a dissolução quanto os métodos de quantificação (CLAE e espectrofotometria derivada) foram validados de acordo com os guias do ICH (ICH, 2005) e da USP 32 (USP 32, 2009) para validação e dissolução. As seguintes características foram consideradas para a dissolução: precisão, exatidão e faixa de trabalho. Para a quantificação considerou-se: especificidade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão e robustez.

### ***Preparo das soluções padrão e amostra***

#### *Para o método de quantificação*

Uma solução estoque foi preparada na concentração de 500 µg/mL utilizando fluconazol padrão de trabalho. Para isso 50 mg de fluconazol padrão de trabalho foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, em triplicata, e diluído com meio de dissolução, HCl 0,1 M. Cinco soluções de trabalho (135, 150, 165, 180 e 195 µg/mL) foram obtidas, em triplicata, através de diluições de cada solução estoque usando HCl 0,1 M como diluente. Tais soluções foram utilizadas nos ensaios de linearidade e repetibilidade. A faixa de variação foi testada entre 80-120% da concentração de análise, que é, aproximadamente, a concentração obtida dentro da cuba com 900 mL de meio de dissolução para o produto fluconazol 150 mg.

Para a precisão intermediária nova solução estoque foi preparada na mesma concentração e três soluções de trabalho (135, 165 e 195 µg/mL) foram

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

obtidas, em triplicata, através de diluição da solução estoque empregando HCl 0,1 M como diluente. A precisão intermediária foi avaliada por analista diferente e dois dias após ter sido avaliada a repetibilidade.

Semelhantemente, para avaliação da exatidão dos métodos, outra curva analítica foi preparada, em triplicata, contemplando os cinco níveis de concentração. Foram utilizados placebos enriquecidos.

Todas as soluções foram sonicadas por 30 minutos, filtradas em papel de filtro quantitativo para leitura em espectrofotômetro ou filtro de seringa de celulose regenerada e porosidade igual a 0,45 µm para análise por CLAE.

Para o ensaio de robustez soluções padrão e amostra foram preparadas a 100% da concentração (165 µg/mL) e foram sonicadas por 25 minutos.

#### *Para a dissolução*

A precisão de repetibilidade do método foi avaliada através da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas em duplicata usando 5 cubas. A precisão intermediária foi avaliada através de uma dissolução do produto, realizada por outro analista com dois dias de intervalo após a avaliação da repetibilidade e empregando 5 cubas. As amostras foram retiradas manualmente após 30 minutos de teste e filtradas em papel de filtro quantitativo prosseguindo à leitura em espectrofotômetro e utilizando o meio de dissolução HCl 0,1 M como branco. Para a análise por CLAE as amostras foram mais uma vez filtradas utilizando filtros de seringa de celulose regenerada, porosidade igual a 0,45 µm.

A exatidão do método foi avaliada através da dissolução de placebos enriquecidos que foram adicionados às cubas, executou-se a dissolução de acordo com o método desenvolvido e realizou-se coleta manual após 30 minutos de ensaio. As concentrações utilizadas foram alta, média e baixa da faixa linear (135, 165 e 195 µg/mL) dos métodos quantitativos. Como essas eram as concentrações que deveriam ser obtidas nas cubas com 900 mL de meio, foi calculado a partir delas o quantitativo de padrão que deveria ser adicionado a cada placebo para enriquecê-los corretamente. Este ensaio foi realizado em triplicata.

### Resultados para validação do método de quantificação

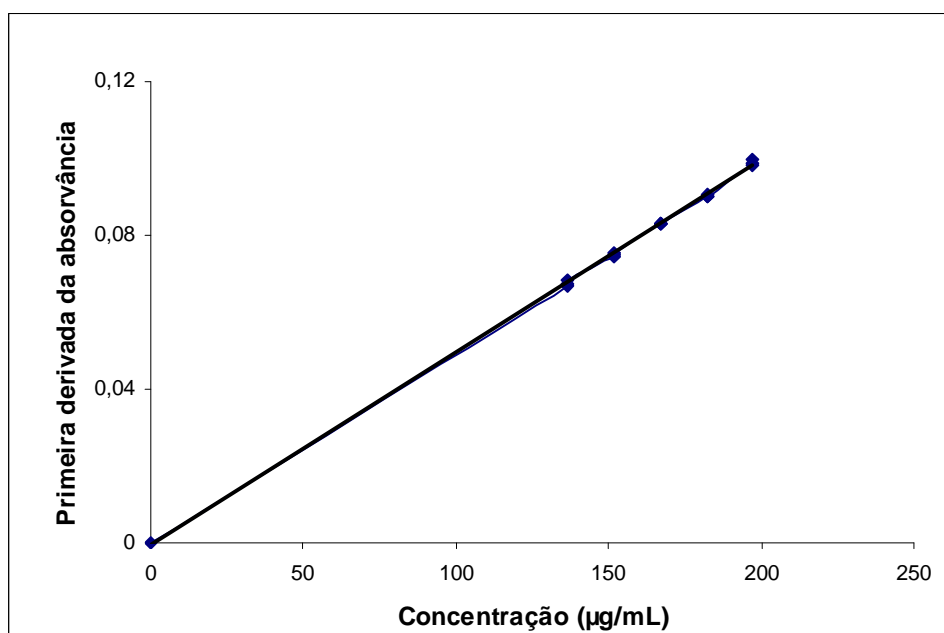
#### *Especificidade*

A especificidade dos métodos de quantificação foi avaliada pela comparação dos cromatogramas das soluções do produto fluconazol cápsulas, amostra A, e seu placebo preparadas a 165 µg/mL diluídos no meio de dissolução, HCl 0,1 M e através da comparação da derivada de primeira ordem dos espectros UV para cada uma das soluções. Os resultados já foram apresentados através das Figuras 9 e 10 e da Tabela 6 que provam serem ambos os métodos específicos e livres de interferentes.

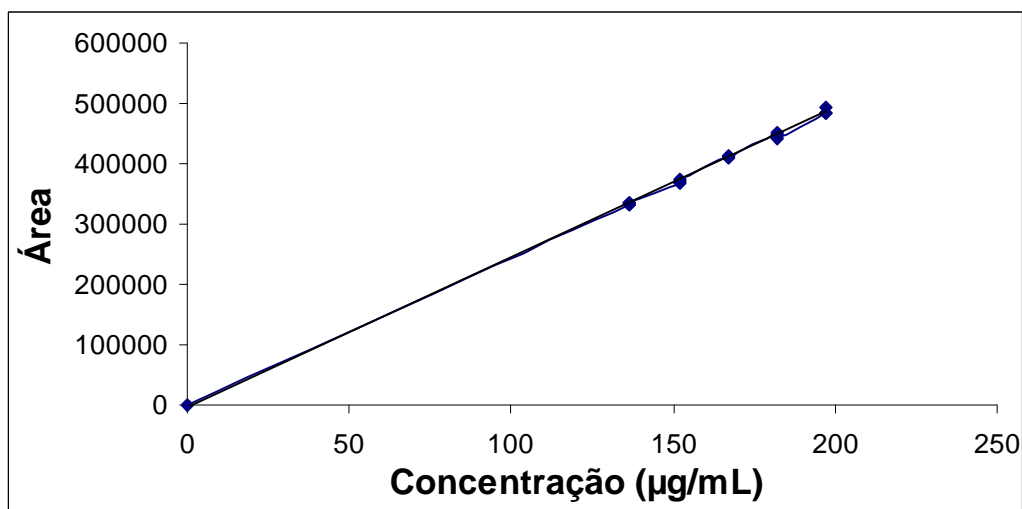
#### *Linearidade*

A linearidade foi avaliada para os dois métodos de quantificação na faixa de concentração de 135 a 195 µg/mL através da inspeção visual da curva analítica plotada (Figuras 27 e 28) e pelos cálculos de regressão e do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) pelo método dos mínimos quadrados para ambos os métodos de quantificação. A equação da reta obtida para CLAE foi:  $y = 2,5 \times 10^{-6} X - 1,1 \times 10^{-4}$ ; e para espectrofotometria derivada foi igual a:  $y = -0,51439 x - 0,00293$ , onde y corresponde a área do pico e x à concentração das soluções em µg/mL, e o  $r^2$  foi igual a 0,996 (CLAE) e 0,998 (espectrofotometria derivada). O desvio padrão da regressão foi igual a 0,62% para espectrofotometria derivada e igual a 0,83% para CLAE.

A validade da regressão linear também foi acessada através do teste de variância (ANOVA). Os resultados (Tabelas 21 e 22) mostram que a inclinação da reta é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para ambos os métodos.



**Figura 27.** Curva analítica de fluconazol obtida no ensaio de linearidade para a quantificação da dissolução por espectrofotometria derivada em primeira ordem (n = 15).



**Figura 28.** Curva analítica de fluconazol obtida no ensaio de linearidade para a quantificação da dissolução por CLAE (n = 15).

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 21.** Análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade por espectrofotometria derivada na determinação de fluconazol

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,00182843	0,001828	6825,02	4,4727E-19	
Resíduo	13	3,48271E-06	2,679E-07			
Total	14	0,00183191				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,00293367	0,00104804	-2,799185	0,01505	-0,0051978	-0,00067
Variável X 1	0,5143902	0,00622645	82,61371	4,47E-19	0,5009387	0,527842

**Tabela 22.** Análise de variância (ANOVA) para o ensaio de linearidade por CLAE na determinação de fluconazol

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	37762832751	3,7763E+10	3260,0806	5,4972E-16	
Resíduo	13	139000855,3	11583404,6			
Total	14	37901833606				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-11194,9	7533,835847	-1,4859496	0,1630853	-27609,718	5219,9181
Variável X 1	2524986,82	44222,66862	57,097115	5,4972E-16	2428633,9	2621339,7

*Precisão*

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. As concentrações da faixa linear foram empregadas. Os resultados são apresentados nas Tabelas 23 e 24 e mostram que os métodos são bastante precisos.

**Tabela 23.** Resultados dos ensaios de precisão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada

Concentração (µg/mL)	DPR (%)	DPR médio (%)	DPR médio total (%)
<b>Repetibilidade (n = 15)</b>			
135	0,78		
150	0,54		
165	0,11	0,75	
180	0,33		2,55
195	0,85		
<b>Intermediária (n = 9)</b>			
135	0,20		
165	1,78	1,35	
195	2,10		

DPR: desvio padrão relativo.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 24.** Resultados dos ensaios de precisão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE

Concentração (µg/mL)	DPR (%)	DPR médio (%)	DPR médio total (%)
Repetibilidade (n = 15)			
135	0,74		
150	0,72		
165	0,37	0,81	
180	0,99		2,29
195	1,09		
Intermediária (n = 9)			
135	0,71		
165	1,02	1,05	
195	1,40		

DPR: desvio padrão relativo.

#### *Exatidão*

A exatidão foi avaliada através do cálculo de porcentagem de recuperação de fluconazol. As cinco concentrações avaliadas na linearidade em triplicata foram acessadas através placebos enriquecidos. A recuperação média foi igual a  $98,56 \pm 0,82\%$ , para CLAE e  $98,35 \pm 0,88\%$  para espectrofotometria derivada, que mostra a forte concordância entre os valores experimentais e teóricos. Os resultados dos ensaios são apresentados nas Tabelas 25 e 26.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

**Tabela 25.** Resultados dos ensaios de exatidão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
135	99,66	1,02
150	98,34	0,17
165	98,14	0,08
180	97,60	0,22
195	97,93	0,15

DPR: desvio padrão relativo.

**Tabela 26.** Resultados dos ensaios de exatidão para a quantificação da dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
135	99,20	0,77
150	98,67	1,36
165	97,75	0,30
180	98,50	0,20
195	98,67	0,65

DPR: desvio padrão relativo.

#### *Faixa de trabalho*

A faixa de trabalho resulta dos ensaios de precisão e exatidão. Assim, a faixa linear, precisa e exata que pode ser trabalhada em ambos os métodos analíticos (CLAE e espectrofotometria derivada) para a dissolução do fluconazol cápsulas encontra-se entre 135 e 195  $\mu\text{g/mL}$ .



### Resultados para validação da performance

A dissolução foi validada através dos dois métodos de quantificação CLAE e espectrofotometria derivada na faixa linear já estabelecida de 135 a 195 µg/mL, sendo que a concentração do produto fluconazol 150 mg, amostra A, na cuba de dissolução contendo 900 mL de meio equivale à concentração central ou 100% analítico (165 µg/mL).

#### Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. Dissoluções do produto fluconazol 150 mg, em cápsulas, amostra A, foram realizadas em duplicata empregando cinco cubas. A precisão intermediária foi avaliada por outro analista com dois dias de intervalo após os ensaios de repetibilidade. No ensaio de repetibilidade a cedência média após 30 minutos de dissolução para as 10 cubas utilizadas foi igual a 97,96% e DPR igual a 2,48%, empregando espectrofotometria derivada; 97,10% e DPR igual a 2,80%, empregando CLAE. Os resultados individuais são apresentados nas Tabelas 27 e 28 e mostram que o método tem boa precisão.

**Tabela 27.** Resultados dos ensaios de precisão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada

Cubas	Cedência média (%)	DPR (%)	DPR médio (%)
Repetibilidade (n = 10)			
cuba 1	100,84	0,43	
cuba 2	95,51	2,57	
cuba 3	97,84	1,96	2,48
cuba 4	96,14	1,05	
cuba 5	99,49	1,57	
Intermediária (n = 5)			
5 cubas	96,94	2,01	

DPR: desvio padrão relativo.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 28.** Resultados dos ensaios de precisão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE

Cubas	Cedência média (%)	DPR (%)	DPR médio (%)
<b>Repetibilidade (n = 10)</b>			
cuba 1	99,55	2,19	
cuba 2	94,91	0,55	
cuba 3	96,61	0,64	2,80
cuba 4	96,01	3,63	
cuba 5	98,44	0,88	
<b>Intermediária (n = 5)</b>			
5 cubas	95,02	2,44	

DPR: desvio padrão relativo.

#### *Exatidão*

A exatidão foi avaliada através do cálculo de porcentagem de recuperação de fluconazol. Os três níveis de concentração avaliados na linearidade foram acessados através placebos enriquecidos que foram adicionados às cubas no início do ensaio de dissolução. O teste foi realizado em triplicata. A recuperação média foi igual a 98,04% e 98,86%, o DPR médio igual a 0,89% e 1,20% para CLAE e espectrofotometria derivada, respectivamente. Estes dados mostram o forte acordo entre os valores experimentais e teóricos. Os resultados individuais podem ser vistos nas Tabelas 29 e 30.

**Tabela 29.** Resultados dos ensaios de exatidão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por espectrofotometria derivada

Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
135	100,08	0,42
165	99,03	0,32
195	97,46	0,34

DPR: desvio padrão relativo.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

**Tabela 30.** Resultados dos ensaios de exatidão para a dissolução do produto fluconazol 150 mg cápsulas por CLAE

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
135	98,93	0,23
165	97,17	0,55
195	98,02	0,63

DPR: desvio padrão relativo.

#### *Faixa de trabalho*

A faixa de trabalho resulta dos ensaios de precisão e exatidão. Assim, a faixa linear, precisa e exata que pode ser trabalhada em ambos os métodos analíticos (CLAE e espectrofotometria derivada) para a dissolução do fluconazol cápsulas encontra-se entre 135 e 195  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Uniformidade de doses unitárias**

Um dos fatores que pode muito interferir nos resultados da dissolução é a uniformidade de doses unitárias. Caso o produto não apresente uniformidade certamente apresentará resultados de dissolução imprecisos. Assim, a uniformidade do lote que passará pelo ensaio de dissolução deve ser conhecida.

O teste de uniformidade de doses unitárias foi realizado para o produto fluconazol cápsulas (amostra A) de acordo com a Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010), pelo ensaio de uniformidade de conteúdo. Assim, dez cápsulas foram analisadas, transferindo o conteúdo de cada uma para dez balões volumétricos. O solvente metanol foi utilizado para auxiliar a dissolução do princípio ativo, sendo que este correspondeu a 4% da solução total hidroalcolica. As soluções foram diluídas até concentração igual a 600  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando água como diluente. As amostras foram analisadas por CLAE. Os resultados encontrados para o ensaio de uniformidade de conteúdo é apresentado na Tabela 31.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

**Tabela 31.** Resultados do teste de uniformidade de doses unitárias de cápsulas de fluconazol. Valor unitário de cada cápsula em mg/unidade e porcentagem, média e desvio padrão relativo (DPR)

Cápsulas	mg/unidade	UC (%)
1	143,79	95,86
2	137,13	91,42
3	141,89	94,59
4	141,83	94,55
5	150,31	100,20
6	142,27	94,85
7	140,18	93,45
8	147,07	98,04
9	144,83	96,55
10	143,18	95,46
média	143,25	95,50
DPR (%)	2,54	2,54

UC: Uniformidade de conteúdo; DPR: Desvio padrão relativo

O teste apresentou resultados dentro dos limites especificados pela farmacopéia brasileira (F. Bras. V ed., 2010), todas as unidades apresentaram valor unitário entre 85 e 115 % do valor.

### 3.2.2.6. Doseamento Microbiológico

#### Desenvolvimento analítico

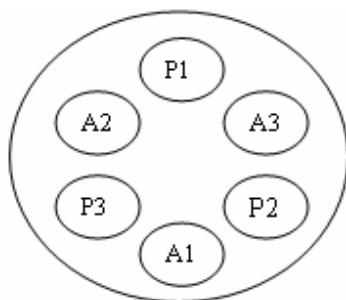
Por ser o fluconazol um antifúngico a avaliação de sua atividade é tão ou mais importante quanto seu doseamento físico-químico. Assim, tanto o produto fluconazol cápsulas quanto as amostras após estudos de estabilidade preliminar foram avaliadas quanto sua atividade pelo método de difusão em ágar desenvolvido e validado em nosso laboratório. As condições empregadas no ensaio encontram-se descritas na Tabela 32.

**Tabela 32.** Parâmetros usados no desenvolvimento e validação do ensaio microbiológico por difusão em ágar para o fluconazol cápsulas

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
Meio de cultura	ágar Sabouraud
Solução diluente	salina
Concentração do inóculo	2% (25% de transmitância em 580 nm)
Concentrações das soluções padrão e amostra preparadas em água (µg/mL)	25,0; 50,0; 100,0
Temperatura de incubação (°C)	25
Tempo de incubação (horas)	24

Foram utilizadas 21 placas de Petri para o doseamento do fluconazol em cápsulas. Em cada ensaio foram utilizadas 7 placas de Petri, e os resultados foram analisados estatisticamente. Em capela de fluxo laminar, foram transferidos para cada placa, com auxílio de pipetador automático, 20,0 mL de ágar sabouraud para a camada base. Após a solidificação desta camada, foram adicionados por meio de pipetador automático, 5,0 mL de ágar sabouraud contendo o inóculo.

Após a solidificação da camada semeada, foram distribuídos, equidistantemente, 6 cilindros de aço inoxidável por placa. Cada cilindro recebeu 100,0 µL das soluções do padrão de trabalho (P) ou da amostra (A), em razão de concentrações igual a 2 e em delineamento 3 x 3, como mostra a Figura 29.



**Figura 29.** Delineamento utilizado para aplicação das amostras. P1=25 µg/mL, P2 = 50 µg/mL, P3 = 100 µg/mL; A1 = 25 µg/mL, A2 = 50 µg/mL, A3 = 100 µg/mL.

As placas foram colocadas em estufa incubadora a 25 °C. Após 24 horas, foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro, com auxílio de paquímetro. Em cada ensaio os resultados foram analisados estatisticamente e a potência de cada doseamento calculada.

A potência do fármaco foi determinada pela equação 13 de Hewitt (Hewitt, 1977). Os ensaios foram realizados em dias diferentes, e cada amostra corresponde à média de seis determinações.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100 \quad (\text{equação 13})$$

na qual:

$$M = F/b$$

$$b = E/l$$

$$E = \frac{1}{4} \times [(\bar{A}_3 + \bar{P}_3) - (\bar{A}_1 + \bar{P}_1)]$$

$$F = \frac{1}{3} \times [(\bar{A}_1 + \bar{A}_2 + \bar{A}_3) - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2 + \bar{P}_3)]$$

l = logaritmo da razão das doses

As siglas A3, A2 e A1 se referem aos valores médios dos halos de inibição formados pelas soluções da amostra de alta, média e baixa concentração, respectivamente.

As siglas P3, P2 e P1 se referem aos valores médios dos halos de inibição formados pelas soluções do padrão de trabalho de alta, média e baixa concentração, respectivamente.

### **Validação**

O método foi validado conforme requisitos preconizados pela Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010) empregando soluções de padrão de trabalho, amostras e placebos fortificados, nas três diferentes concentrações.

O ensaio foi validado, através de análise estatística, utilizando análise de variância, descrita na Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010).

### **Resultados da validação**

O ensaio foi validado, através de análise estatística, utilizando análise de variância, descrita na Farmacopeia Brasileira (F. Bras. V ed., 2010).

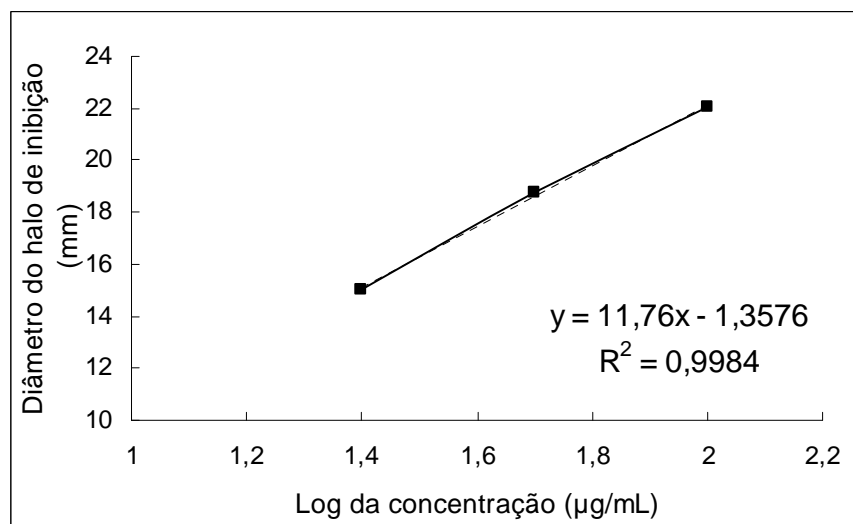
A validação do método microbiológico cumpriu plenamente os parâmetros requeridos como mostram as Tabelas 33 a 35 e a Figura 30.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 33.** Valores médios obtidos para o doseamento microbiológico por difusão em ágar cilindros em placa de fluconazol padrão de trabalho, para obtenção da curva analítica

Concentração (µg/mL)		Diâmetro dos halos (mm)	Diâmetro médio (mm)	Desvio padrão	DPR (%)
P1	25,0	15,62	15,00	0,73	4,86
		14,25			
P2	50,0	15,13	18,79	0,89	4,73
		19,20			
		17,87			
		19,29			
P3	100,0	21,93	22,08	0,76	3,43
		21,45			
		22,86			

Cada valor de diâmetro corresponde a média de 7 halos de inibição; DPR: desvio padrão relativo.



**Figura 30.** Curva analítica de fluconazol padrão de trabalho obtida no doseamento microbiológico em difusão em ágar, cilindros em placa.



### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

**Tabela 34.** Análise de variância dos dados obtidos no doseamento de fluconazol pelo ensaio microbiológico difusão em ágar, cilindros em placa

Fontes de variação	gL	SQ	QM	Fcal	Ftab
Preparação	1	3,657017	3,657017	1,968561	4,17
Regressão	1	342,0906	342,0906	184,1463*	7,56
Desvio de paralelismo	1	0,0564	0,0564	0,03036	4,17
Quadrático	1	0,142245	0,142245	0,07657	4,17
Diferença de quadrático	1	0,138972	0,138972	0,074808	4,17
Entre doses	5	346,0852	69,21705		
Entre placas	6	0,59845	0,099742		
Dentro (erro)	30	1,85771	0,061924		
Total	42	348,5414			

gL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: variância

**Tabela 35.** Valores experimentais obtidos no doseamento microbiológico de fluconazol no teste de recuperação

Concentração de fluconazol nos placebos fortificados (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
	102,36		
25,0	88,58	96,95	6,66
	99,91		
	99,03		
50,0	89,63	96,96	6,13
	102,23		
	101,17		
100,0	91,56	97,98	5,15
	101,19		

Cada valor de recuperação corresponde a média de 3 halos de inibição; DPR: desvio padrão relativo.

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os resultados obtidos na determinação de fluconazol cápsulas e das amostras submetidas a estudo de estabilidade preliminar no ensaio microbiológico, calculados pela fórmula de Hewitt (Hewitt, 1977), estão demonstrados nas Tabelas 36 e 37.

**Tabela 36.** Valores experimentais obtidos para o doseamento microbiológico de fluconazol pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar cilindros em placa

Valor rotulado (mg/cápsula)	Valor encontrado (mg/cápsula)	Potência (%)	DPR (%) Intra-dias	DPR (%) Inter-dias
150	131,05	87,16	7,65	
	129,45	86,13	4,28	6,15
	139,63	93,09	3,45	

Cada valor encontrado corresponde a média de 7 halos de inibição; DPR: desvio padrão relativo

**Tabela 37.** Valores experimentais obtidos para o doseamento das amostras submetidas a estudo de estabilidade preliminar pelo ensaio microbiológico por difusão em ágar

Condição de estresse	Teor médio (%)	DPR (%)
90 dias sob 40 °C e 75% de UR	30,27	1,32
60 dias sob 60 °C	27,72	6,62
66 dias sob luz UVC	33,39	3,91
180 dias sob luz UVC	25,00	5,84

DPR: desvio padrão relativo; UR: umidade relativa.

O doseamento microbiológico por difusão em ágar é um método específico para antibióticos, antibacterianos e antifúngicos. O ensaio microbiológico vem sendo utilizado em laboratórios clínicos desde a introdução de antibióticos e outros agentes antimicrobianos (Andrews, 1999).

### CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

O doseamento microbiológico por difusão em ágar, cilindros em placa, desenvolvido e validado para o fluconazol em cápsulas demonstrou ser um método preciso, exato, linear e sensível. Para assegurar a validade do ensaio microbiológico na determinação da potência do fluconazol, foram utilizadas três concentrações diferentes para amostra, idênticas às da substância de referência, em delineamento 3 x 3. Estas doses estão em progressão geométrica (razão 2,0), já que o sistema utilizado possui relação linear entre o logaritmo da concentração da substância analisada e o diâmetro dos halos de inibição. Em cada ensaio foram utilizadas sete placas, efetuando-se a leitura dos halos de inibição. Com os resultados obtidos foi construída a curva analítica para fluconazol padrão de trabalho, obtendo-se um coeficiente de determinação de  $r^2 = 0,9984$ .

A potência das cápsulas foi calculada pela equação de Hewitt (Hewitt, 1977), obtendo-se teor médio de 88,96 %, com desvio padrão relativo de 6,15 %. Diferentemente do esperado o resultado encontrado para a potência do fluconazol é diferente dos resultados encontrados obtidos através dos métodos físico-químicos para o seu teor, como ser visto nas Tabelas 13 e 21 (amostra A). Esperávamos forte correlação entre o teor encontrado de fluconazol e sua atividade. Como não foi possível observar essa correlação possivelmente a atividade do fármaco, possivelmente, está ligada a sítios moleculares diferentes dos envolvidos na absorção de radiação UV. O que demonstra a necessidade de determinação de potência para os agentes antimicrobianos.

Por este método também tiveram sua atividade avaliada as amostras submetidas a estudo de estabilidade preliminar. As condições a que foram submetidas foram: estufa (60 °C, 60 dias), câmara climática (40 °C 75% RH, 90 dias) e UVC radiação (254 nm, 66 e 180 dias). Os resultados mostraram que a atividade dessas amostras foi reduzida em mais de 50% em relação à atividade inicial do produto.

Ao comparar os resultados obtidos para a atividade (ensaio microbiológico, Tabela 36) e para o doseamento (ensaios físico-químicos, Tabelas 9 e 18, amostra A) das amostras submetidas ao estudo de estabilidade preliminar observa-se que há substancial diferença entre os resultados. Tendo em mente

### **CAPÍTULO III – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

---

este fato, sugere-se que a análise microbiológica do fluconazol seja recomendada como técnica de rotina em seu controle de qualidade, uma vez que avalia a potência do fármaco e conseqüentemente sua qualidade terapêutica.

Possivelmente essa recomendação pode se estender a maior parte, se não todos, dos fármacos que apresentam atividade antimicrobiana, considerando que nem sempre o sítio ativo do fármaco corresponde àquele que responde ou reage durante o ensaio físico-químico.

### 4.1 Introdução

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de armazenamento e uso, as mesmas condições características que possuía quando da época de sua fabricação (Vadas, 2000; Ansel *et al.*, 2000).

A estabilidade dos medicamentos também pode ser definida como o período a partir da data de fabricação e empacotamento da formulação até que a sua atividade química e biológica não seja menor que um nível pré-determinado de potência rotulada e suas propriedades físicas não tenham mudado apreciavelmente e de forma deletéria. Embora existam exceções, 90% das potências descritas em rótulos, geralmente são reconhecidas como o nível mínimo de potência aceitável. O prazo de validade é então definido como o período de tempo no qual a preparação permanecerá estável, dentro dos limites aceitáveis para efeito terapêutico, quando armazenada sob as condições recomendadas (Vadas, 2000).

Muitos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, entre eles, a estabilidade das substâncias ativas, a interação excipiente-fármaco, os processos de produção, a forma farmacêutica, a embalagem e o sistema de lacre, as condições durante o transporte, armazenamento e o período entre a fabricação e a utilização do produto. Fatores ambientais que podem alterar um produto com o tempo incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, pH, interações, contaminação microbiana, entre outros (Kommanaboyina & Rhodes, 1999).

O estudo da cinética das reações químicas tem por objetivo a correlação matemática de dados experimentais, visando estabelecer hipóteses sobre os fatores determinantes da velocidade de uma reação e elucidar os mecanismos de reação envolvidos (Netz & Ortega, 2002).

No âmbito farmacêutico, a cinética química tem aplicação relevante nos estudos de estabilidade de medicamentos, assim como a caracterização dos mecanismos envolvidos na degradação dos mesmos. O conhecimento de tais aspectos permite estabelecer prazos de validade fidedignos, além de assegurar e otimizar a estabilidade dos medicamentos, detectando incompatibilidades decorrentes da mistura dos produtos ou evitando o efeito tóxico associado a produtos de degradação (Netz & Ortega, 2002).

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de várias condições, tais como, concentração dos reagentes, temperatura, pH, solvente utilizado, presença de tensoativos na formulação, umidade, excipientes, luz e oxigênio (Lachman *et al.*, 2001; Florence & Attwood, 2003). Consequentemente, para que o estudo seja efetivo devem-se aplicar princípios de cinética química. O estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo de estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (Nudelman, 1975). A cinética química classifica as reações em ordem de reações, que são designadas de: ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, terceira ordem ou mesmo ordens cinéticas mais complexas (Netz & Ortega, 2002). Nas reações de ordem zero, a decomposição procede a uma velocidade constante, sendo independente da concentração de quaisquer reagentes. Nesse caso, um gráfico de concentração (c) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k) de degradação do fármaco (Florence & Attwood, 2003).

As reações de primeira ordem indicam que as velocidades de reação dependem da concentração do reagente, obtendo-se uma reta, com a representação do logaritmo da concentração ( $\log C$ ) em função do tempo (t). Neste tipo de reação, uma substância decompõe-se em um ou mais produtos. A

cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ( $1/C$ ) em função do tempo ( $t$ ) fornece uma reta (Florence & Attwood, 2003). O modelo cinético pode ser representado pelas equações 8 a 13:

$$t_{90\%} = (0,1 \times C_0)/k \text{ (reação de ordem zero)} \quad \text{(equação 14)}$$

$$C = C_0 - kt \text{ (reação de ordem zero)} \quad \text{(equação 15)}$$

$$t_{90\%} = 0,106/k \text{ (reação de primeira ordem)} \quad \text{(equação 16)}$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \text{ (reação de primeira ordem)} \quad \text{(equação 17)}$$

$$t_{90\%} = 1/(9k \times C_0) \text{ (reação de segunda ordem)} \quad \text{(equação 18)}$$

$$1/C = 1/C_0 + kt \text{ (reação de segunda ordem)} \quad \text{(equação 19)}$$

nas quais  $t$  equivale ao tempo;  $t_{90\%}$  equivale ao tempo necessário para que a concentração seja reduzida em 90%;  $C_0$  equivale à concentração inicial e  $k$  corresponde à constante de velocidade da reação.

Quando a ordem de reação é desconhecida, é possível deduzi-la pela análise dos gráficos plotados para cada ordem. A representação gráfica que resultar em uma linha reta indica qual a ordem de reação. Este método possui algumas limitações, principalmente em relação ao tempo de exposição da amostra ao fator de degradação (Netz & Ortega, 2002).

Quando os graus de decomposição são muitos baixos, é difícil diferenciar as ordens de reação, uma vez que todas parecem ser lineares (Netz & Ortega, 2002). Na reação de ordem zero, o fator limitante é outro, que não a concentração, por exemplo, a solubilidade ou a absorção da luz em certas moléculas fotossensíveis. Em formas farmacêuticas sólidas, que são expostas à degradação pela água (umidade), os fármacos decompõem-se de acordo com velocidades de pseudo-primeira ordem, à medida que as reações ocorrem entre o fármaco e a

água. O sistema comporta-se como uma suspensão, e como existe um excesso de fármaco no estado sólido, a velocidade de reação de primeira ordem torna-se, na realidade, uma velocidade de pseudo ordem zero e a velocidade de diminuição da quantidade de fármaco ao longo do tempo é linear (Lachman *et al.*, 2001).

Velocidades de reação de pseudo ordem zero ocorrem frequentemente com fármacos formulados na forma de suspensão (Lachman *et al.*, 2001). Muitas decomposições de formas farmacêuticas sólidas ou em suspensão seguem cinética de ordem zero. O ácido ascórbico, por exemplo, degrada-se a uma mesma velocidade em condições anaeróbicas, independente da concentração ser 1,3 ou 5 M (Netz & Ortega, 2002).

Apesar da importância das formulações sólidas, têm existido, relativamente, poucas tentativas para avaliar detalhadamente a cinética de decomposição deste tipo de formulação. Muitos dos trabalhos iniciais foram desenvolvidos com o único objetivo de prever a estabilidade, mas os dados foram tratados utilizando-se equações de velocidade derivadas de reações em solução (Florence & Attwood, 2003).

O estudo das formas farmacêuticas sólidas é um dos grandes problemas das ciências farmacêuticas, principalmente quando se tem fármacos sensíveis à umidade, e não há a possibilidade de prever as mudanças rápidas da mesma no ambiente. Uma vez que a estabilidade em relação à umidade depende da sensibilidade dos fármacos direta e indiretamente ao seu teor no ambiente, as reações hidrolíticas podem envolver uma combinação de eventos complexos (Waterman, 2005).

Grande parte dos fármacos apresenta em sua estrutura molecular grupos funcionais que são facilmente atacados pela água, hidrolisando-se e formando novas moléculas (Ev, 2003).

A oxidação, na maioria das vezes, ocorre por meio de radicais livres. A maioria dos fármacos se apresenta na forma reduzida e a presença de 20% de oxigênio livre na atmosfera pode acarretar problemas de estabilidade (Ev, 2003).



No estado sólido, os processos fotoquímicos ocorrem na superfície do produto. Na maioria dos casos, o interior do produto sólido será inalterado, independente do tempo e exposição. As reações fotoquímicas são processos complexos, que usualmente ocorrem em duas etapas. A primeira etapa envolve uma reação primária, que corresponde, diretamente, à absorção de um fóton, fazendo com que o estado da molécula fique excitado. Esta reação não depende da temperatura para a reação das moléculas (Tonnesen, 2001).

A reação fotoquímica primária, frequentemente, é seguida de reações secundárias (térmicas), devido à presença de produtos intermediários originados dos processos fotoquímicos iniciais. Diferentes tipos de reações podem ser iniciados fotoquimicamente, por exemplo, redução, desalquilação, hidrólise, oxidação, isomerização, rearranjo de anéis, polimerização ou remoção de diversos substituintes como halogenados ou grupos carboxílicos (Tonnesen, 2001).

Os protocolos básicos para novos fármacos e respectivos produtos são descritos nas diretrizes do ICH para testes de fotoestabilidade, divulgados desde janeiro de 1998 (ICH, 1997). Estas diretrizes determinam que os testes de fotoestabilidade, sejam parte integral dos testes de estresse, os quais são subdivididos em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios.

Dentro de uma formulação muitos fatores são capazes de acelerar ou diminuir a velocidade das reações. O pH está entre esses fatores, já que as reações podem ser catalisadas por ácidos e/ou bases (Ev, 2003).

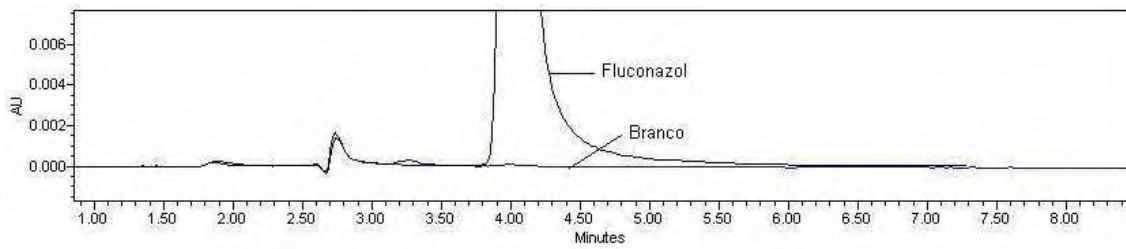
Os testes de degradação forçada, ou teste de estresse, são definidos como os testes de estabilidade da substância de referência e de medicamentos que excedem as condições utilizadas para os testes acelerados. Os testes de estresse são de extrema importância para a indústria farmacêutica e também para pesquisa. Estes testes são aplicados aos estudos de pré-formulação, no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e também para selecionar a melhor formulação (Klick *et al.*, 2005).

De acordo com vários documentos regulatórios, toda vez que a empresa for registrar um novo produto, é obrigatório realizar os testes de estresse, que devem ser incluídos na documentação (FDA, 2004; Brasil, 2005). O teste de estresse é a principal ferramenta utilizada para prever problemas relacionados à estabilidade, desenvolvimento de métodos analíticos e identificação de produtos e comportamentos de degradação.

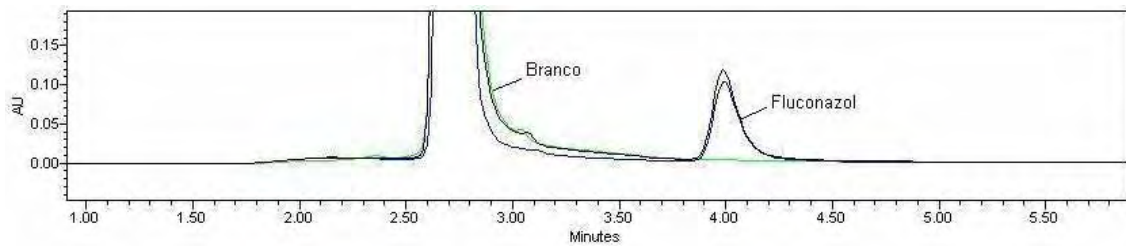
### **4.2. Estudo sob condições de estresse**

Estudo de estresse foi realizado com o intuito de verificar a estabilidade intrínseca do fluconazol e contribuir para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, utilizando fluconazol padrão de trabalho. Durante o estudo de estresse pode-se observar que o fluconazol é bastante estável e só apresenta produtos de degradação em condições muito extremas.

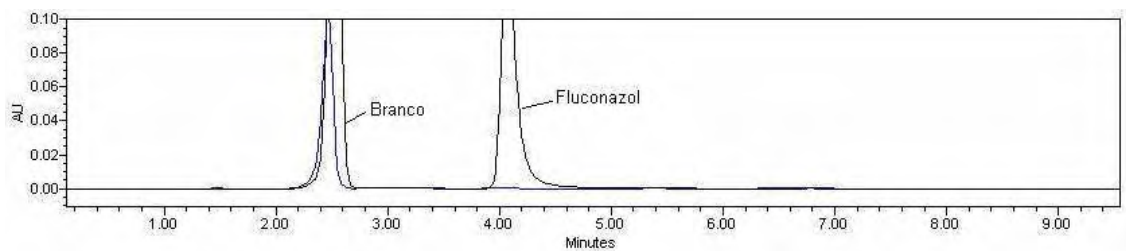
Foram preparadas soluções de hidróxido de sódio 0,1 M, ácido clorídrico 0,1 M, água deionizada e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% v/v e 10% v/v contendo fluconazol na concentração de 1 mg/mL foram deixadas por uma hora a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período foram diluídas até a concentração 500 µg/mL, neutralizadas e filtradas em filtros de seringa de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm. Soluções branco, igualmente preparadas, mas sem a adição do fluconazol foram analisadas por CLAE. Os cromatogramas referentes a estas soluções podem ser vistos abaixo nas Figuras 31, 32, 33 e 34.



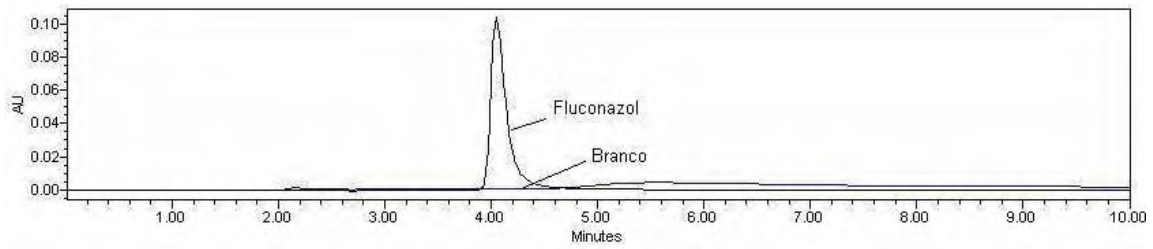
**Figura 31.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em água a temperatura ambiente e seu branco.



**Figura 32.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e 10% (v/v) a temperatura ambiente e seu branco.

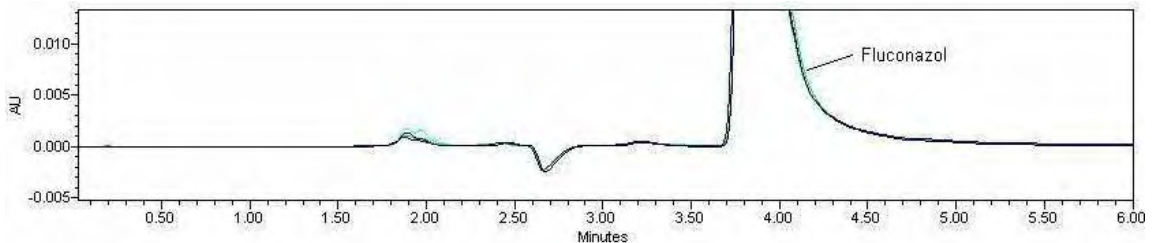


**Figura 33.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em HCl 0,1 M a temperatura ambiente e seu branco.

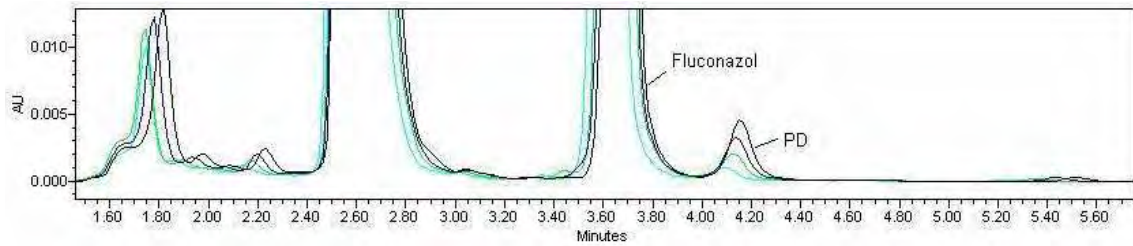


**Figura 34.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) sob estresse em NaOH 0,1 M a temperatura ambiente e seu branco.

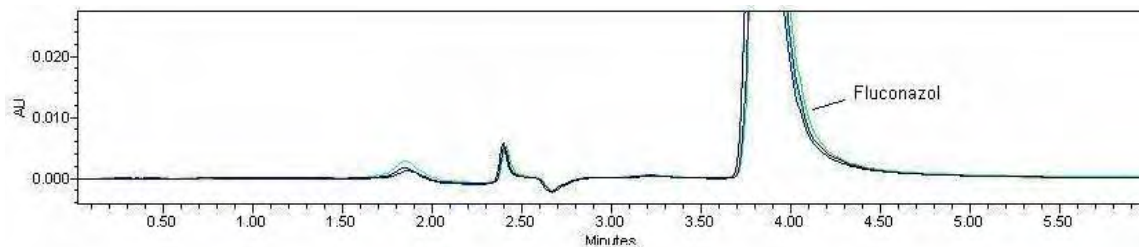
Novas soluções, da mesma maneira preparadas, estiveram sob aquecimento a 90 °C e refluxo por seis horas. Frações foram coletadas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas e após diluição, neutralização e filtração foram analisadas. Soluções branco também foram analisadas. Os cromatogramas referentes a estas soluções podem ser vistos nas Figuras 35, 36, 37 e 38.



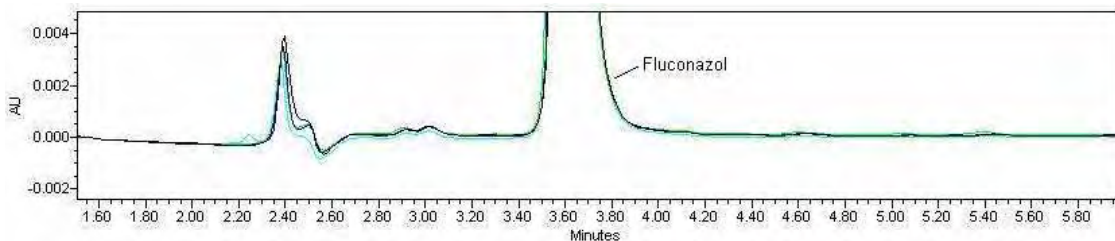
**Figura 35.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse aquoso sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas.



**Figura 36.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse oxidativo ( $H_2O_2$  3%) sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas. O cromatograma apresenta um possível produto de degradação (PD).



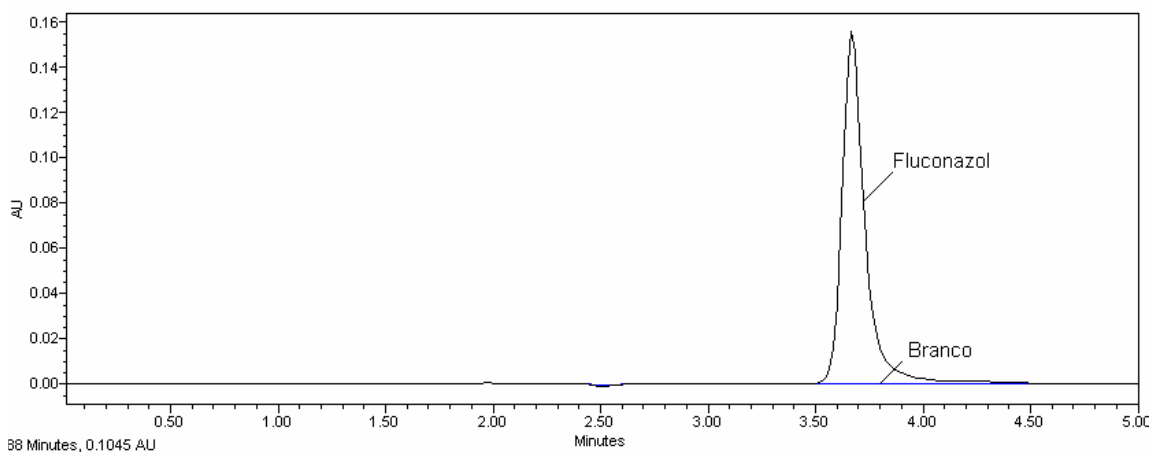
**Figura 37.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse ácido sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas.



**Figura 38.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse básico sob refluxo de alíquotas retiradas após 30 minutos, duas, quatro e seis horas.

Para a fotodegradação foram preparadas soluções metanólicas contendo fluconazol na concentração igual a 1 mg/mL. Duas soluções contendo fluconazol,

uma coberta com papel alumínio e uma solução branco foram colocadas em câmara de fotodegradação com lâmpada UVC, a temperatura ambiente, por duas e 24 horas. Não ocorreu degradação aparente do fluconazol, nem o aparecimento de algum novo pico, como mostra a Figura 39.



**Figura 39.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol (solução padrão de trabalho) em condição de estresse sob luz UVC após 24 horas de exposição.

A única condição em que um novo pico pode ser observado foi durante o estresse com aquecimento e refluxo da solução preparada em peróxido de hidrogênio 3% v/v. Possivelmente ocorreu oxidação da molécula do fluconazol, talvez no sítio da hidroxila, formando um novo composto. Esse possível produto de degradação foi identificado como PD, como pode ser visto na Figura 36. A substância PD pode ser separada do fluconazol pelo método analítico desenvolvido por CLAE, um método indicativo de estabilidade.

A estabilidade físico-química que fluconazol parece ter quando avaliado por absorção de radiação UV é interessante. Estabilidade é uma qualidade requerida a todos os fármacos, pois aumenta segurança destes quanto à manutenção de suas propriedades até o momento de sua utilização. Por outro lado, uma tão grande estabilidade pode se tornar um problema com relação ao descarte do fármaco e sua presença na natureza.

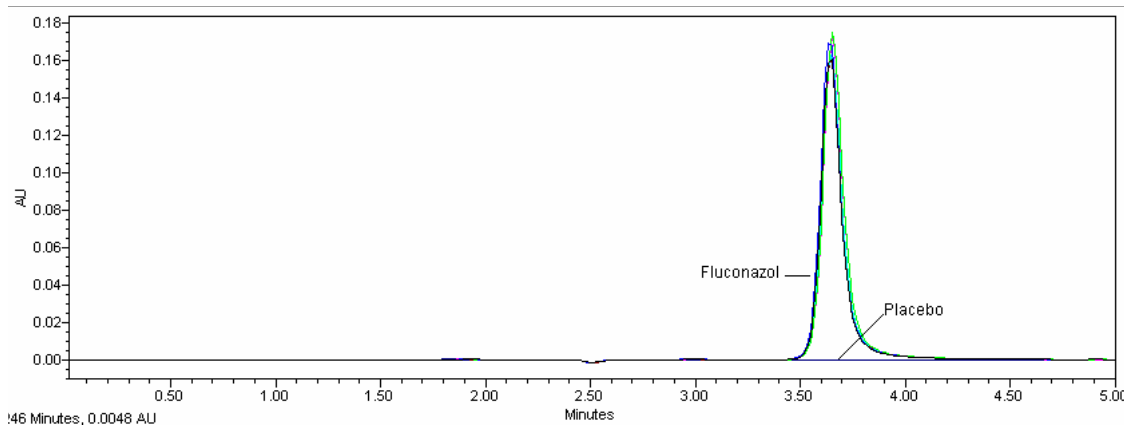
### **4.3. Estudo de Estabilidade Preliminar**

O produto manipulado fluconazol 150 mg cápsulas (amostra A) foi submetido a estudo de estabilidade preliminar com o intuito de avaliar a estabilidade do fármaco e da formulação sob condição de estresse. Foram empregados calor seco, calor úmido e luz UV. Para isso utilizou-se estufa (Fabbe Ltda, Brasil), câmara climática (Marconi, MA 835/UR) e câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W (45 cm de comprimento). Todos os equipamentos foram mantidos ligados durante todo o estudo.

As amostras foram avaliadas quanto às características organolépticas de cor, odor e aspecto, por análise visual. Além disso, as amostras foram avaliadas quanto ao teor residual de fluconazol e a possível formação de produtos de degradação. O monitoramento da degradação foi efetuado pelo método cromatográfico validado previamente. As condições empregadas, nos estudos preliminares de estabilidade, foram:

**Calor seco:** neste estudo de degradação térmica por calor seco a estufa foi mantida a 60 °C. Três cápsulas de fluconazol foram abertas e seu conteúdo homogeneizado em uma placa de Petri foi colocado na estufa. Em outra placa, o equivalente a um peso médio de placebo foi homogeneizado e também mantido em estufa a 60 °C. Quantidade equivalentes a 50 mg de fluconazol foram retiradas nos seguintes tempos: 7, 14, 21, 32, 45 e 60 dias.

Soluções de produto e placebo foram preparadas em concentrações equivalentes a 500 µg/mL de fluconazol utilizando água como diluente. Essas soluções foram analisadas por CLAE após serem filtradas por filtros de seringa de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm. Os resultados podem ser vistos na Tabela 38 e na Figura 40.



**Figura 40.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol submetido à estabilidade preliminar sob calor seco (60 °C) para as amostras retiradas após diferentes períodos.

**Tabela 38.** Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à estufa (60 °C), analisadas por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Área média	Teor médio (%)	DPR (%)
0	1173732	97,48	0,12
7	1184501	98,64	1,16
14	1247412	102,49	0,09
21	1190173	99,11	1,30
32	1257749	102,65	0,56
45	1229465	102,39	0,31
60	1162287	97,45	0,31

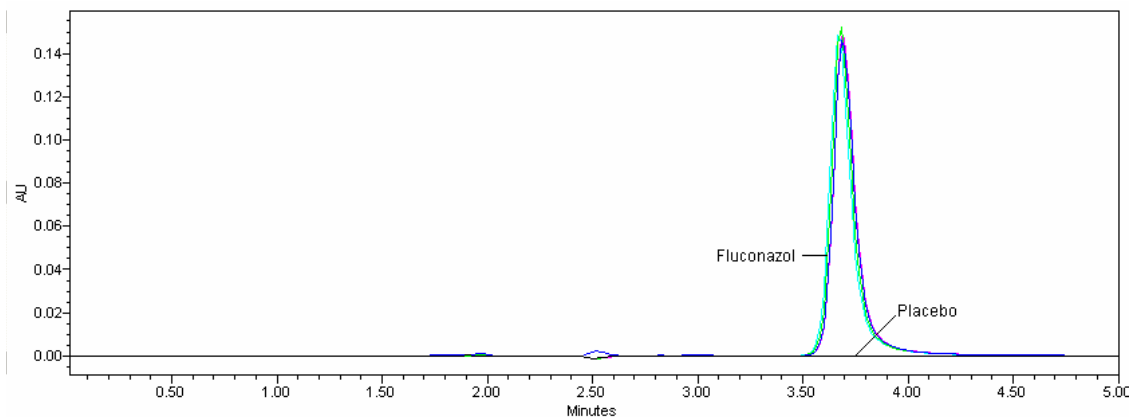
DPR: desvio padrão relativo.

Como pode ser observado, o fluconazol apresenta alta estabilidade frente ao calor seco (60 °C) de modo que não houve decaimento em seu teor nem aparecimento de novo pico em seu cromatograma.



**Calor úmido:** neste estudo de degradação por calor úmido a câmara climática foi mantida a 40 °C e 75% de umidade relativa (UR). Três cápsulas de fluconazol foram abertas e seu conteúdo homogeneizado em uma placa de Petri destampada que foi colocada na câmara. Em outra placa, o equivalente a um peso médio de placebo foi homogeneizado e também mantido na câmara climática. Quantidades equivalentes a 50 mg de fluconazol foram retiradas nos seguintes tempos: 14, 21, 30, 60 e 90 dias.

Soluções de produto e placebo foram preparadas em concentrações equivalentes a 500 µg/mL de fluconazol utilizando água como diluente. Essas soluções foram analisadas por CLAE após serem filtradas por filtros de seringa de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm. Os resultados podem ser vistos na Tabela 39 e na Figura 41.



**Figura 41.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol submetido à estabilidade preliminar sob calor úmido para as amostras retiradas após diferentes períodos.

**Tabela 39.** Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à câmara climática (40 °C/ 75% UR), analisadas por CL AE

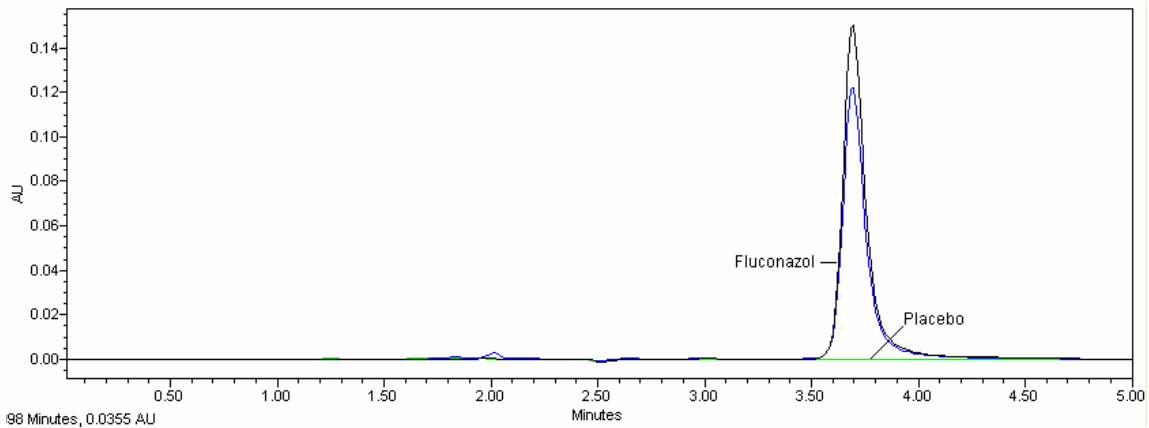
Tempo de exposição (dias)	Área média	Teor médio (%)	DPR (%)
0	1163929	96,90	0,65
14	1098479	96,56	1,61
21	1126073	96,30	0,86
30	1155066	96,89	0,21
60	1099159	95,19	0,58
90	1198170	95,36	1,97

DPR: desvio padrão relativo.

Como pode ser observado, o fluconazol apresenta alta estabilidade frente ao calor úmido nas condições adotadas no estudo de modo que houve ligeiro decaimento em seu teor e não surgiu novo pico em seu cromatograma.

**Fotodegradação:** neste estudo de fotodegradação a câmara espelhada foi mantida à temperatura não superior a 25 °C. Três cápsulas de fluconazol foram abertas e seu conteúdo homogeneizado em uma placa de Petri. Em outra placa o equivalente a um peso médio de placebo foi homogeneizado e também mantido na câmara espelhada. Ambas as placas foram expostas destampadas à distância de 10 cm da lâmpada. Quantidades equivalentes a 50 mg de fluconazol foram retiradas nos seguintes tempos: 21, 33 e 66 dias.

Soluções de produto e placebo foram preparadas em concentrações equivalentes a 500 µg/mL de fluconazol utilizando água como diluente. Estas soluções foram analisadas por CLAE após serem filtradas por filtros de seringa de celulose regenerada de porosidade igual a 0,45 µm. Os resultados podem ser vistos na Tabela 40 e na Figura 42.



**Figura 42.** Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas análises de fluconazol submetido à estabilidade preliminar sob luz UVC para as amostras retiradas após 21 e 66 dias.

**Tabela 40.** Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à câmara de fotodegradação (luz UVC, 254 nm, 20 W) analisadas por CLAE

Tempo de exposição (dias)	Área média	Teor médio (%)	DPR (%)
0	1163929	96,90	0,65
21	1236681	95,75	0,42
33	1193460	99,29	0,75
66	1054347	91,18	0,03

DPR: desvio padrão relativo.

A única condição a que o fluconazol demonstrou certa instabilidade foi a luz UVC. Houve queda de aproximadamente 5% no teor do fármaco após 66 dias de exposição. No entanto não surgiu novo pico em seu cromatograma.

Durante o estudo de estabilidade preliminar para as três condições, a formulação do produto fluconazol 150 mg cápsula e seu placebo apresentavam-se inicialmente brancos, mas tornaram-se levemente amarelado (placebo) e amarelo

mais intenso (produto) após 30 dias de exposição ao calor seco e úmido e após 21 dias de exposição à luz UV.

Tendo em vista o fluconazol ser um antifúngico, considera-se tão importante quanto a manutenção da integridade física do produto sua atividade antifúngica. Por isso ensaios microbiológicos estão sendo realizados com o fármaco íntegro e após os estudos de estabilidade preliminar.

#### **4.4. Degradação**

Considerando a fotossensibilidade do fluconazol, verificada a partir dos resultados obtidos nos estudos de fotodegradação preliminar, a cinética de fotodegradação do fármaco tornou-se objeto de nosso estudo. No entanto ao prolongar o tempo de estresse sob a luz UVC a quantidade de fluconazol determinada por CLAE não diminuía, nem novos picos foram detectados, ao contrário, observou-se aumento na área do pico referente ao fluconazol. Este aumento na área levou a um cálculo de teor elevado e irreal. Os resultados para este estudo podem ser vistos na Tabela 41.

**Tabela 41.** Valores obtidos na quantificação de fluconazol cápsulas expostas à câmara de fotodegradação (luz UVC, 254 nm, 20 W) para o estudo de cinética de degradação, analisadas por CLAE

---

Tempo de exposição (dias)	Teor médio (%)	DPR (%)
0	96,90	0,65
21	95,75	0,42
33	99,29	0,75
66	91,18	0,03
90	96,98	0,94
120	107,47	2,03
150	100,07	0,68
180	95,92	0,44

---

DPR: desvio padrão relativo.

Comparando os resultados obtidos para cada amostra submetida a fotodegradação com o padrão de trabalho empregado nas determinações

observamos um aumento considerável nos valores de absorção para a mesma quantidade de massa analisada medidas em 261 nm. Este aumento na absorção também foi observado para as amostras submetidas a estresse por calor seco e calor úmido, como mostra a Tabela 42.

**Tabela 42.** Valores obtidos de absorvância para as amostras de fluconazol submetidas a estresse lidas em 261 nm comparativamente ao padrão de trabalho, empregando a mesma quantidade de massa do fármaco

Condições das amostras	Tempo de exposição (dias)	ABS média	Porcentagem em relação ao padrão
Padrão	-	0,507407	-
Luz UVC	66	0,661487	130,37
	90	0,629214	124,01
	120	0,690127	136,01
	150	0,678960	133,81
	180	0,641940	126,51
Calor seco	60	0,571536	112,64
Calor úmido	90	0,557995	109,97

ABS: valor de absorção em 261 nm.

Tendo em vista estes resultados pode-se inferir que todas as condições de estresse levaram a modificações na molécula do fluconazol que resultam em aumento da absorvância do fármaco.

Estes resultados corroboram aqueles publicados por Marciniak e colaboradores (Marciniak *et al.*, 2007) que ao estudarem a esterilização do fluconazol por radiação ionizante mostraram que após ser submetido à esterilização a absorção do fármaco à energia na região dos raios UV é aumentada.

## **5. CONCLUSÕES**

Métodos analíticos seletivos para a análise do produto fluconazol cápsulas foram desenvolvidos e validados, bem como método indicativo de sua estabilidade.

A baixa seletividade apresentada pelos métodos farmacopeicos mostra a necessidade de rever a monografia farmacopeica do fluconazol.

Também foi desenvolvido e validado método analítico de dissolução para cápsulas de fluconazol, que mostrou que a utilização de *sinker* não traz melhores resultados para as amostras ensaiadas.

Diferentemente do que a maioria das publicações sobre estabilidade do fluconazol afirma, observou-se que o fármaco é instável quando submetido a calor seco e úmido e à luz UVC, bem como em meio oxidativo e sua instabilidade não é identificada de modo fácil.

A estabilidade do fluconazol deve ser estudada aplicando diferentes técnicas que possam separar produtos de degradação, como a CLAE, e avaliar a atividade do antifúngico, como o microbiológico por difusão em ágar.

Estes resultados apontam para a necessidade de mudanças na manipulação e encapsulamento do fluconazol, em seu material de embalagem e condições de armazenamento. Apontam, ainda, para a necessidade de aprimoramento das pesquisas em estabilidade de fármacos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOETY, E.M.; KHATTAB, F.I.; KELANI, K.M.; ABOUAL-ALAMEIN, A.M. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. *Fármaco*, v.57, p.931-938, 2002.
- ABOUL-ENEIN, H.Y.; GÖGER, N.G.; TÜRKALP, A. Quantitative determination of fluconazole in syrups by first order derivative spectrophotometry. *Analytical Letters*, v.35, n.7, p.1193–1204, 2002.
- ACD/pKa DB. Advanced Chemistry Development Inc., Copyright©1994-2002.
- ANDREWS, J.M. Microbiological Assays. In: REEVES, D.S.; ISE, R.; ANDREWS, J.M.; HITE, L.O. Eds. *Clinical Antimicrobial Assays*. New York: Oxford University Press, 1999. p.35-44.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. *Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos*. São Paulo: Editorial Premier, 2000. p.568.
- AYUB, A.C.; VIANNA-SOARES, C.D.; FERREIRA, L.A. Fluconazole method validation by RP-HPLC for determination in biological skin matrices. *Journal of Chromatographic Science*, v.45, n.5, p.286-290, 2007.
- BENNETT, E. J. Antimicrobianos (continuação) Agentes antifúngicos. In *As bases farmacológicas da terapêutica*; GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN A. Eds. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003. p.975-979.
- BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*, v.5, n.2, p.159-172, 2004.
- BARATHI, D.V.; HOTH, K.K.; SAGAR, P.V.V.; KUMAR, S.S.; REDDY, P.R.; NAIDU, A.; MULLANGI, R. Development and validation of a highly sensitive and robust LC–MS/MS with electrospray ionization method for simultaneous quantitation of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma: application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B*, v.868, p.70–76, 2008.
- BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2009. Consulta pública nº 10, de 23 de março de 2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/586cab804040e9e9a1eba111452>



- [53526/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%BA+10%2C+de+23+de+mar%C3%A7o+de+2009..pdf?MOD=AJPERES](#), acesso em 24/03/2009 e 20/07/2010.
- BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 1, de 29 de Julho de 2005, que aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. . *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 01 agosto de 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2003. Resolução nº 899 de 29 maio de 2003. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2 jun. 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Medicamentos Referência. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/Ofed7180402d4a9985e38754e035b7cb/lista\\_a\\_030211.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/Ofed7180402d4a9985e38754e035b7cb/lista_a_030211.pdf?MOD=AJPERES), acesso em 21/01/2009 e 20/01/2011.
- BRITISH PHARMA COEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, v.1, 2003.
- CARRASCO-PORTUGAL, M.DEL.C.; FLORES-MURRIETA, F.J. Gender differences in the oral pharmacokinetics of fluconazole. *Clinical Drug Investigation*, v.27, n.12, p.851-855, 2007.
- CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia*, v.19, n.2, p.130-139, 2006.
- CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; v.45, p.235-240, 2009.
- COCLGHO, M.; BRANDLSSOU, S.; ALRLC, R.; BRESSOLLE, F. High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, v.686, p.11-17, 1996.
- COELHO, H.; MATINATTIL, A.N.F.; ARAÚJO, M.B.; BERGOLD, A.M.; BUENO, F. Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.2, p.235-246, 2004.
- CONRADO, D.J.; PALMA, E.C.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; RATES, S.M.K.; DALLA COSTA, T. Development and validation of a LC-MS/MS

- method with electrospray ionization for determination of LASSBio-579 in rat plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, p.677–682, 2007.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v.59, n.4, p.181-190, 1999.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Influence of dissolution medium agitation on release profiles of sustained-release tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.27, n.8, p.811-817, 2001.
- DASH, A.K.; ELMQUIST, W.F. Fluconazole. In: BRITAIN, H.G. *Analytical profiles of drug substances and excipients*. San Diego: Academic Press, 2001. v.27, p.67-113.
- DEBRUYNE, D.; RYCKELYNCK, J.P.; BIGOT, M.C.; MOULIN, M. Determination of fluconazole in biological fluids by capillary column gas chromatography with a nitrogen detector. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.77, n.6, p.534–535, 1988.
- DESAI, S. R.; SHAIKH, M. M.; DHARWADKAR, S. R. *Thermochim. Acta.*, v.399, 81–89, 2003.
- DESAI, S. R.; DHARWADKAR, S. R. Study of process induced polymorphic transformations in fluconazole drug. *Analysis*, v.66, n.2, 115–122, 2009.
- DONGRE, V.G.; GHUGARE, P.D.; KARMUSE, P.P.; SOUDAGAR, S.R.; PANDA, N.; KUMAR, A. Isolation and structural identification of an impurity in fluconazole bulk drug substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.45, n.3, p.422-429, 2007.
- DONGRE, V.G.; KARMUSE, P.P.; GHUGARE, P.D.; SALUNKE, S.M.; PANDA, N.; KUMAR, A. Preparative isolation and structural elucidation of impurities in fluconazole by LC/MS/MS. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.42, n.3, p.334-340, 2006.
- EGLE, H.; TRITTLER, R.; KÜMMERER, K. New, rapid, fully automated method for determination of fluconazole in serum by column-switching liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.26, n.4, p.425-431, 2004.
- ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I. An integrated approach. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, n.5-6, p.755-767, 2001.

- EV, L.S. Estabilidade de Medicamentos. In: REIS, A.M.M.; GOMES, M.J.V.M. *Ciências farmacêuticas – uma abordagem em farmácia hospitalar*. Rio: Atheneu, 2003. p. 235-249.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- FDA. Food and Drug Administration, 2004. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 2004.
- FDA. Food and Drug Administration. Disponível em: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_SearchResults\\_Dissolutions.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm), acesso em 02/05/2009 e 20/07/2010.
- FELL, A.F. Analysis of pharmaceutical dosage forms by second derivative ultraviolet-visible spectrophotometry. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, v.15, p.260-267, 1978.
- FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p.155-218.
- GÖGER, N.G.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Quantitative determination of fluconazole in capsules and IV solutions by UV spectrophotometric methods. *Analytical Letters*, v.34, n.12, p.2089–2098, 2001.
- GU, X.J.; JIANG, W. Characterization of polymorphic forms of fluconazole using Fourier-transform raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.84, p.1438-41, 1995.
- HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v.51, p.7-12, 1990.
- HEEREN, F.; TANNER, R.; THEURILLAT, R.; THORMANN, W. Determination of fluconazole in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography with detection at 190 nm. *Journal of Chromatography A*, v.745, p.165-172, 1996.
- HEWITT, W. *Microbiological assay*. New York: Academic Press, 1977.
- HEYDEN, Y.V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method

- validation. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, n.5-6, p.723-753, 2001.
- HOLLER, S.; VALENTA, C. Effect of selected fluorinated drugs in a “ringing” gel on rheological behavior and skin permeation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.66, p.120–126, 2007.
- HURTADO, F.K.; SOUZA, M.J.; MELO, J.; ROLIM, C.M.B. Microbiological assay and hplc method for the determination of fluconazole in pharmaceutical injectable formulations. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, n.2, p.224-228, 2008.
- ICH. Harmonised Tripartite Guideline, 1997. *Photostability testing of new drug substances and products. Federal Register; Q1B*, 1997. disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>, acesso em 23/01/2009 e 20/07/2010.
- ICH. Harmonised Tripartite Guideline, 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)*, 2005. disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>, acesso em 23/01/2009 e 20/07/2010.
- KIM, S-S.; IM, H-T.; KANG, I-M.; LEE, H-S.; LEE, H-W.; CHO, S-H.; KIM, J-B.; LEE, K-T. An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B. Analytical Technology Biomedical Life Science*, v.852, n.1-2, p.174-179, 2007.
- KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; SANGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*, February, 2005.
- KOKS, C.H.W.; ROSING, H.; MEENHORST, P.L.; BULT, A.; BEIJNEN, J.H. High-performance liquid chromatographic determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, v.663, p.345-351, 1995.

- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.25, n.7, p.857-868, 1999.
- LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M.J. Testes de estabilidade e fundamentos decinética química. In: Lachman, L.; Lieberman, H.A.; Kanig, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2ed. 2001. p.1277-1355.
- LEE, C.H.; YEH, P.H.; TSAI, T.H. Hepatobiliary excretion of fluconazole and its interaction with cyclosporin A in rat blood and bile using microdialysis. *International Journal of Pharmaceutics*, v.241, p.367–373, 2002.
- LEVILLAIN, P.; FOMBEYDIE, D. Derivative spectrometry. Principles, advantages and limitations, applications. *Analysis*, v.14, p.1-20, 1986.
- MAJCHERCZYK, P.A.; MOREILLON, P.; DECOSTERD, L.A.; SANGLARD, D.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P.; MARCHETTI, O. Single-step extraction of fluconazole from plasma by ultra-filtration for the measurement of its free concentration by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.28, p.645–651, 2002.
- MARCINIEC, B.; DETTLAFF, K.; JAROSZKIEWICZ, E.; BAFELTOWSKAC, J. Radiochemical stability of fluconazole in the solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, p.1876–1880, 2007.
- MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.32, n.5, p.449-460, 2006.
- MARTINS, J.D.; NERY, C.G.C.; PIANETTI, G.A.; VIANA-JUNIOR, N.S.; VIANNA-SOARES, C.D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.1, p.63-70, 2007.

- MATHY, F-X.; VROMAN, B.; NTIVUNWA, D.; WINNE, A.J.; VERBEECK, R.K.; PRE´AT, V. On-line determination of fluconazole in blood and dermal rat microdialysates by microbore high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.787, p.323–331, 2003.
- MCLACHLAN, A.J.; GROSS, A.S.; BEAL, J.L.; MINNS, I.; TETT, S.E. Analytical validation for a series of marker compounds used to assess renal drug elimination processes. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.23, n.1, p.39-46, 2001.
- MORAES, L.A.; LERNER, F.E.; MORAES, M.E.; MORAES, M.O.; CORSO, G.; DE NUCCI, G. Fluconazole bioequivalence study: quantification by tandem mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.21, n.2, p.200-207, 1999.
- MORETTI, M.L. A importância crescente das infecções fúngicas. *Revista Panamericana de Infectologia*, v.9, n.2, p.8-9, 2007.
- NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. *Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.203-222.
- NEVES J.; SARMENTO, B.; AMIJI, M.M.; BAHIA, M.F. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor dapivirine from polymeric nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.52, p.167–172, 2010.
- NUDELMAN, N.S. *Estabilidade de Medicamentos*. Buenos Aires: Ateneo, 1975.
- OLIVEIRA, CLCG, 2009. **Desenvolvimento de métodos analíticos e estudo de estabilidade de linezolidina em comprimidos**. 2009. 196 p. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- O'NEIL, M.J. *et al.* (2006, 2010). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (14th Edition - Version 14.6). Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc.
- PARK, J.S.; YU, K.A.; KANG, T.H.; KIM, S.; SUH, Y.G. Discovery of novel indazole-linked triazoles as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.17, p.3486–3490, 2007.

- PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.39, n.1, p.105-113, 2003.
- PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v.30, n.1, p.171-177, 2007.
- PERSSON, B-A.; VESSMAN, J. The use of selectivity in analytical chemistry-some considerations. *Trends in Analytical Chemistry*, v.20, n.10, p.526-532, 2001.
- PORTA, V.; CHANG, K.H.; STORPIRTIS, S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole. *International Journal of Pharmaceutics*, v.288, n.1, p.81-86, 2005.
- PORTA, V.; YAMAMICHI, E.; STORPIRTIS, S. Avaliação biofarmacêutica *in vitro* de cápsulas de fluconazol. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.3, p.333-343, 2002.
- PREECHAGOON, D. A. Udomprateep and G. Manwiwattanagul, Improved dissolution rate of poorly soluble drug by incorporation of buffers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.26, n.8, p.891-894, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, v.27, n.5, p.807-812, 2004.
- SANCHEZ-ROJAS, F.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, v.35, n.10, p.753-761, 1988.
- SASONGKO, L.; WILLIAMS, K.M.; DAY, R.O.; MCLACHLAN, A.J. Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. *British Journal Clinical Pharmacology*, v.56, p.551-561, 2003.
- SUN, S.; LOU, H.; GAO, Y.; FAN, P.; MA, B.; GE, W.; WANG, X. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the analysis of

- fluconazole and evaluation of the impact of phenolic compounds on the concentration of fluconazole in *Candida albicans*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.34, p.1117–1124, 2004.
- TALSKY, G.; MAYRING, L.; KREUZER, H. High resolution, higher-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angw. Chem. Int. Ed. English*, v.17, n.11, 785-799, 1978.
- TELLES FILHO, F.Q. Posaconazol: um novo triazólico de segunda geração. *Pratica Hospitalar*, v.52, p.58-60, 2007.
- TONNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.225, p.1-14, 2001.
- United States Pharmacopoeia 32st ed, National Formulary XXVII; Rockville, MD, US Pharmacopoeial Convention: 2009.
- VADAS, E.B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENARO, A.R. Ed. *Remington. A Ciência e a prática em farmácia*. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.1022-1031.
- VADEN, S.L.; HEIT, M.C.; HAWKINS, E.C.; MANAUGH, C.; RIVIERE, J.E. Fluconazole in cats: Pharmacokinetics following intravenous and oral administration and penetration into cerebrospinal fluid, aqueous humor and pulmonary epithelial lining fluid. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.20, p.181-186, 1997.
- VESSMAN, J. Selectivity or Specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.4, p.867-869, 1996.
- WALLACE, J.E.; HARRIS, S.C.; GALLEGOS, J.; FOULDS, G.; CHEN, T.J.; RINALDI, M.G. Assay of fluconazole by high-performance liquid chromatography with a mixed-phase column. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.36, n.3, p.603-606, 1992.
- WATERMAN, K.C.; ADAMI, R.C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v.293, p.101–125, 2005.



- WATTANANAT, T.; AKARAWUT, W. Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. *Biomedical Chromatography*, v.20, n.1, p.1-3, 2006.
- WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v.18, n.9+10, p.624-632, 1999.
- YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. *Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*. Washington: AOAC, 1975. 88p.
- YOUDIM, K.A.; LYONS, R.; PAYNE, L.; JONES, B.C.; SAUNDERS, K. An automated, high-throughput, 384 well cytochrome P450 cocktail IC50 assay using a rapid resolution LC–MS/MS end-point. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.48, p.92–99, 2008.
- ZHANG, S.; MADA, S.R.; TORCH, M.; GOVAL, R.K.; VENKATARAMANAN, R. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic assay for the determination of fluconazole in human whole blood using solid phase extraction. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.30, n.3, p.314-319, 2008.