

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO FÁRMACO NITRATO
DE ISOCONAZOL NA MATÉRIA-PRIMA E MATRIZ CREME
EM CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO**

ALESSANDRA VON AHN

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, março de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Alessandra Von Ahn

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO FÁRMACO NITRATO
DE ISOCONAZOL NA MATÉRIA-PRIMA E MATRIZ CREME
EM CONDIÇÕES FORÇADAS DE DEGRADAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Orientador Dr. João Henrique Z.dos Santos

Porto Alegre, maio de 2011

“O futuro é mera projeção do presente se for normal – e não desejado. Isto porque o desejo é sempre singular, escapa à regra, e então causa alguma novidade. Quem descobre a presença do desejo inventa o seu futuro.”

Jorge Forbes

Agradecimentos

Ao Dr. João Henrique Z. dos Santos, meu orientador. Obrigada por sua competente contribuição em minha vida acadêmica como orientador. Agradeço pela confiança, incentivo e estímulo, por sua permanente disponibilidade e apoio constante em cada etapa deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim.

Um especial agradecimento aos respeitados professores da banca examinadora, por aceitarem o convite de participar da minha defesa de dissertação, honrando-me com suas presenças.

A Deus, por Seu amor e Sua presença marcante em todos os momentos e acima de tudo por ter me possibilitado esta conquista. Obrigada pela constante proteção de um Pai, sempre renovando minha fé e esperança.

Ao meu noivo, Alexandre, pelo amor, tolerância e paciência.

À Maria Cristina Mattos pelo constante incentivo, injeções de ânimo, otimismo, coragem e esperança.

Aos meus familiares pela compreensão das ausências.

À Multilab pela disponibilização de seu laboratório de análises, em especial aos coordenadores Liberato e Fibebe pela oportunidade, apoio científico e condições para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, pelo auxílio e amizade durante meu trabalho de mestrado.

A todos aqueles que de alguma forma ou outra, contribuíram para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

	SUMÁRIO.....	IV
	LISTA DE TABELAS.....	VIII
	LISTA DE FIGURAS.....	X
	ABREVIATURAS, SIGLAS E GLOSSÁRIO.....	XIV
	RESUMO.....	XV
	ABSTRACT.....	XVI
1	INTRODUÇÃO.....	2
2	OBJETIVOS.....	6
2.1	Objetivo Geral.....	7
2.2	Objetivos Específicos	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1	Fármacos Antifúngicos	9
3.2	Compostos azólicos.....	10
3.3	Nitrato de Isoconazol	13
3.4	Métodos de determinação	14
3.5	Estabilidade do Fármaco – Testes de Estresse.....	16
3.6	Validação de método analítico.....	22
3.6.1	Especificidade/Seletividade	25
3.6.2	Linearidade	26
3.6.3	Limite de Detecção e Quantificação	26
3.6.4	Exatidão.....	27
3.6.5	Precisão.....	29
3.6.6	Robustez	30
4	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	31

4.1	Substância Química de Referência – SQR.....	32
4.2	Substância Química de Trabalho – SQT	32
4.2.1	Análise Qualitativa da Substância Química de Trabalho	32
4.2.1.1	Determinação da faixa de fusão	32
4.2.1.2	Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho.....	33
4.2.1.3	Cromatografia em Camada Delgada	33
4.2.1.4	Reação para determinação de nitratos.....	34
4.2.2	Padronização da SQT	34
4.3	Amostra de Nitrato de Isoconazol Creme	34
4.4	Validação de Metodologia Analítica.....	34
4.4.1	Material.....	34
4.4.2	Método.....	35
4.4.2.1	Preparo da solução tampão.....	35
4.4.2.2	Preparo da fase móvel.....	36
4.4.2.3	Preparo da solução padrão	36
4.4.2.4	Preparo da solução amostra.....	36
4.4.2.5	Condições cromatográficas	36
4.4.3	Parâmetros de validação	37
4.4.3.1	Especificidade.....	37
4.4.3.1.1	Teste de doseamento (quantitativo)	38
4.4.3.1.2	Teste qualitativo.....	38
4.4.3.1.2.1	Preparo das amostras	40
4.4.3.2	Linearidade.....	41
4.4.3.3	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	42
4.4.3.4	Exatidão.....	42

4.4.3.5	Precisão.....	43
4.4.3.6	Robustez	44
4.4.3.7	Adequabilidade do sistema.....	46
4.5	Estudo de Estabilidade	46
4.5.1	Fotólise	47
4.5.1.1	Condições.....	47
4.5.1.1.1	Amostras em solução	47
4.5.2	Oxidativa.....	48
4.5.2.1	Condições.....	48
4.5.2.1.1	Preparo da amostra de NI creme e branco.....	48
4.5.2.1.1	Preparo da matéria-prima NI	49
4.5.3	Hidrólise.....	50
4.5.3.1	Hidrólise ácida	50
4.5.3.1.1	Condições.....	50
4.5.3.1.1.1	Preparo da amostra de NI creme.....	50
4.5.3.1.1.2	Preparo da matéria-prima de NI	51
4.5.3.2	Hidrólise alcalina.....	51
4.5.3.2.1	Condições.....	51
4.5.3.2.1.1	Preparo da amostra de NI creme.....	51
4.5.3.1.1.2	Preparo da matéria-prima de NI	52
4.5.3.2.1.3	Preparo da amostra para controle de decaimento de teor.....	52
4.5.3.2.1.4	Determinação do ponto isobéptico.....	52
4.5.3.2.1.5	Avaliação da reversibilidade da solução amostra de nitrato de isoconazol creme.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1	Análise Qualitativa da SQT.....	55
5.1.1	Determinação da faixa de fusão.....	55
5.1.2	Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho.....	55
5.1.3	Cromatografia em Camada Delgada.....	57
5.1.4	Reação para determinação de nitratos.....	58
5.2	Análise Quantitativa da SQT.....	58
5.3	Validação de metodologia analítica para forma farmacêutica creme....	59
5.3.1	Especificidade.....	59
5.3.2	Linearidade: Curva de calibração.....	62
5.3.3	Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	64
5.3.4	Exatidão: Teste de recuperação.....	64
5.3.5	Precisão (Repetibilidade).....	65
5.3.6	Precisão Intermediária.....	66
5.3.7	Robustez.....	67
5.3.8	Adequabilidade do sistema.....	69
5.4	Estudo de Estabilidade.....	70
5.4.1	Fotólise.....	70
5.4.1.1	Exposição das amostras acondicionadas na embalagem original.....	70
5.4.1.2	Condições empregadas na fotólise.....	73
5.4.2	Oxidativa.....	76
5.4.3	Hidrólise ácida.....	78
5.4.4	Hidrólise alcalina.....	79
6	CONCLUSÃO.....	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Características físico-químicas do nitrato de isoconazol	13
Tabela II: Condições empregadas em fármacos antifúngicos para avaliação de estudos de estresse.	20
Tabela III: Parâmetros de adequação do sistema e recomendações.....	23
Tabela IV: Parâmetros de validação recomendados pelo INMETRO e ANVISA.	24
Tabela V: Classificação e finalidade dos testes para a validação de método.....	24
Tabela VI: Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.	25
Tabela VII: Parâmetros de adequação e conformidade do sistema por CLAE.....	37
Tabela VIII: Condições cromatográficas da análise de nitrato de isoconazol creme.	37
Tabela IX: Formulação simulada para creme de nitrato de isoconazol.	38
Tabela X: Semelhanças entre os compostos em estudo.....	39
Tabela XI: Amostras a serem avaliadas na análise de especificidade qualitativa. ...	39
Tabela XII: Ensaio realizados para degradação do produto, matéria-prima e branco.	46
Tabela XIII: Valores obtidos na determinação da faixa de fusão do isoconazol.	55
Tabela XIV: Valores obtidos na determinação do teor do nitrato de isoconazol SQT por potenciometria.....	58
Tabela XV: Dados analíticos para curva de calibração do doseamento de NI.	63
Tabela XVI: Percentual de recuperação obtida nas diferentes concentrações – Doseamento de isoconazol creme.	65
Tabela XVII: Doseamento das seis preparações de creme de isoconazol e seus desvios (Equipamento 1: HPLC Shimadzu Proeminence DAD).	66
Tabela XVIII: Doseamento das 6 (seis) preparações de creme dermatológico de isoconazol e seus desvios (Equipamento 2: HPLC Hitachi DAD Elite LaChrom).	66
Tabela XIX: Comparação das análises (entre dias e diferentes equipamentos)	67

Tabela XX: Avaliação da estabilidade das amostras.....	68
Tabela XXI: Análise quanto ao uso de diferentes filtros	68
Tabela XXII: Variações nos parâmetros cromatográficos para determinação de robustez.....	69
Tabela XXIII: Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos	69
Tabela XXIV: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetida à fotólise durante 72 horas.....	71
Tabela XXV: Valores experimentais obtidos no estudo de fotólise das soluções de NI creme, obtidas por CLAE.....	73
Tabela XXVI: Valores experimentais obtidos no estudo de fotólise das soluções de matéria-prima de NI, obtidas por CLAE.....	73
Tabela XXVII: Valores experimentais obtidos no estudo de fotólise das soluções da amostra controle de NI creme, obtidas por CLAE.	74
Tabela XXVIII: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetido à hidrólise oxidativa durante 24 horas.....	77
Tabela XXIX: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetidos à hidrólise ácida durante 6 horas.	78
Tabela XXX: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetidos à hidrólise alcalina durante 6 horas.....	80
Tabela XXXI: Resultados da análise do produto em condições alcalinas – NaOH 1 M	81
Tabela XXXII: Resultados da análise do produto em condições alcalinas – avaliação da reversibilidade da reação.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do nitrato de isoconazol.....	4
Figura 2: Estrutura química de fármacos antifúngicos da classe dos imidazóis	10
Figura 3: Estrutura química de fármacos antifúngicos da classe dos triazóis	11
Figura 4: Diferença entre precisão, tendência e exatidão..	28
Figura 5: Espectro na região do infravermelho do nitrato de isoconazol SQT. Amostra pastilhada com KBr. Resolução: 4 cm^{-1}	56
Figura 6: Sobreposição dos espectros da matéria prima (preto) e do nitrato de isoconazol SQR (azul) na região do infravermelho. Amostra pastilhada com KBr. Resolução: 4 cm^{-1}	56
Figura 7: Imagem da cromatoplaça de sílica gel funcionalizada com octadecilsilano com aplicação das soluções de referência A, B e solução teste.	57
Figura 8: Pureza de pico referente à amostra do creme de nitrato de isoconazol....	59
Figura 9: Cromatograma obtido da solução da SQT (diluyente fase móvel) de nitrato de isoconazol ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$; fase móvel: trietilamina 1% (v/v) (pH ajustado a 2,9 com H_3PO_4): metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo $1,0\text{ mL min}^{-1}$; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C	60
Figura 10: Cromatograma obtido da solução (diluyente fase móvel) amostra na forma farmacêutica creme ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de NI). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$; fase móvel: trietilamina 1% (v/v) pH ajustado a 2,9 com H_3PO_4): metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo $1,0\text{ mL min}^{-1}$; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C	60
Figura 11: Cromatograma obtido da solução do branco (diluyente fase móvel) na forma farmacêutica creme ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de NI). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$; fase móvel: trietilamina 1% (v/v) (pH ajustado a 2,9 com H_3PO_4): metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo $1,0\text{ mL min}^{-1}$; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C	61

Figura 12: Cromatograma obtido da solução (diluyente fase móvel) SQT de isoconazol e miconazol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$; fase móvel: trietilamina 1% (v/v) pH ajustado a 2,9 com H_3PO_4): metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C ... 62

Figura 13: Representação gráfica da regressão linear do método de doseamento obtida na análise de linearidade da SQT através do software LC Solution – Shimadzu..... 63

Figura 14: Representação gráfica dos resíduos na faixa de concentração empregada no método de doseamento obtida na análise de linearidade da SQT através do software LC Solution – Shimadzu..... 64

Figura 15: Cromatograma obtido através da análise do padrão de nitrato de isoconazol. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil ($250 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção $10 \mu\text{L}$, temperatura de análise: 45°C 71

Figura 16: Cromatograma obtido através da análise da amostra de nitrato de isoconazol creme após fotólise. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil ($250 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção $10 \mu\text{L}$, temperatura de análise: 45°C 72

Figura 17: Cromatograma obtido através da análise da matéria-prima nitrato de isoconazol após fotólise. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil ($250 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção $10 \mu\text{L}$, temperatura de análise: 45°C 72

Figura 18: Cromatograma obtido através da análise da amostra nitrato de isoconazol creme após fotólise durante período de 60 horas. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9: metanol: acetonitrila:

tetrahidrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45 °C	74
Figura 19: Gráfico de pureza de pico referente ao pico de nitrato de isoconazol solução amostra após fotólise.	75
Figura 20: Gráfico de pureza de pico referente ao pico de nitrato de isoconazol solução amostra após fotólise.	76
Figura 21: Cromatograma obtido através da análise da amostra de NI na forma creme após hidrólise oxidativa. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45°C.	77
Figura 22: Cromatograma obtido através da análise da amostra na forma creme após hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9 metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45 °C.	78
Figura 23: Cromatograma obtido através da análise da matéria-prima de NI após hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9 metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µl, temperatura de análise: 45°C.	79
Figura 24: Cromatograma obtido através da análise da amostra na forma creme após hidrólise alcalina. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ , coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45°C.	80

- Figura 25: Cromatograma obtido através da análise da matéria-prima após hidrólise alcalina. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9; metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de 1,0 mL min⁻¹, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45°C. 81
- Figura- 26: Sobreposição das leituras dos espectros das amostras de nitrato de isoconazol creme em diferentes valores de pH. 82

ABREVIATURAS, SIGLAS E GLOSSÁRIO

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CN	Ciano
BP	Farmacopéia Britânica (British Pharmacopea)
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
K'	Fator de retenção
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MP	Matéria prima
MeOH	Metanol
NI	Nitrato de isoconazol
SQT	Substância química de trabalho
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USP	Farmacopéia Americana (United States Pharmacopea)
UV	Espectrofotometria de ultravioleta

RESUMO

A estabilidade do nitrato de isoconazol foi avaliada frente às condições de degradação (hidrólise ácida, alcalina e oxidativa, radiação UV). A matéria-prima foi caracterizada e identificada pelos métodos disponíveis na monografia do insumo: características organolépticas, solubilidade, faixa de fusão, espectrofotometria de absorção molecular no infravermelho, cromatografia em camada delgada e testes qualitativos via úmida. Para a análise do produto utilizou-se metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região ultravioleta (UV) em 225 nm. O processo de validação de metodologia analítica foi baseado de acordo com as guias de validação disponíveis na literatura. As amostras foram expostas às seguintes condições: ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 e 1 M e peróxido de hidrogênio 3%. A fotoestabilidade foi realizada em câmara de luz UV. Nas condições avaliadas, o fármaco é degradado apenas em meio alcalino (57% para a matéria-prima e 30% para o creme). Em meio fortemente alcalino (3h) o teor é reduzido em 90%. Finalmente, diferentes soluções da amostra hidrolisadas em meio alcalino, ajustadas em diferentes valores de pH e analisadas em espectrofotômetro ultravioleta demonstraram um ponto isobéptico em aproximadamente 275 nm, sugerindo que o comportamento em meio alcalino descreve uma reação reversível.

ABSTRACT

The stability of isoconazole nitrate was evaluated under degradation conditions: acid, alkaline, oxidative hydrolyses and UV irradiation. The raw material was characterized and identified by the methodology available in the pharmacopeia: organoleptic characteristics, solubility, fusion temperature range, molecular absorption in the infrared, thin layer chromatography, and qualitative tests. For the analysis of the product, high performance liquid chromatography with UV detector (225 nm) was employed. The validation process of the analytical methodology was based in accordance with the available guides of validation in literature. The samples were exposed to the following conditions: chloridric acid (0.1 M), sodium hydroxide (0.1 and 1 M) and hydrogen peroxide (3 %). The photostability was carried on a UV-chamber. Under the evaluated conditions, the drug was degraded solely in alkaline medium (57 % for the raw material and 30% for the cream). In strong alkaline medium (3 h), the initial content is reduced in 90 %. Finally, different sample solutions which were subjected to alkaline degradation, after pH adjustments and UV analysis have shown the presence of an isosbestic point in 275 nm, suggesting a reversible phenomenon in alkaline medium.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos são produtos acabados cuja falta de controle de fabricação, conservação e administração pode gerar conseqüências graves aos consumidores. Tanto no processo de desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas (estudo de formulação, estabilidade, testes farmacológicos e toxicológicos), como no processo de fabricação destes medicamentos, o controle de qualidade é indispensável para garantir ao consumidor a alta qualidade dos produtos que recebe¹. Conseqüentemente, a validação de métodos analíticos tem estado em foco e é uma exigência de agências reguladoras da área farmacêutica, assim como os estudos de degradação forçada.

A condução de estudos de degradação forçada gera dados valiosos para segurança e avaliação da potência de um produto. No medicamento podem ocorrer alterações químicas que podem levar à redução da atividade terapêutica, bem como levar a efeitos indesejados, uma vez que há uma grande variedade estrutural nos compostos utilizados como fármacos, muitas espécies de reação de decomposição são possíveis². Como conseqüência foi publicado o Informe Técnico nº1/2008 pela ANVISA com recomendações de procedimentos a serem realizados em fármacos, quando se desconhece sua impureza ou produto de degradação. Assim, atualmente são exigidos tais estudos das indústrias farmacêuticas no momento do registro do produto.

A descoberta de derivados imidazólicos, com atividade antifúngica, representou importante etapa na terapêutica das micoses superficiais e profundas, nos fins da década de 60 e nos anos de 70, pela sua elevada atividade e baixa toxicidade³. Os derivados imidazólicos são substâncias dotadas de alta versatilidade, possuindo amplo espectro de atividade antimicrobiana. As propriedades antimicóticas desses derivados estão relacionadas quimicamente à sua forma estrutural. Os parâmetros essenciais para a atividade antifúngica são a presença de, pelo menos, um anel imidazólico e a união desse anel ao restante da molécula por uma ligação C-N³.

O nitrato de isoconazol (Figura 1) está descrito como um sólido à temperatura ambiente e seus cristais são brancos ou quase brancos. É praticamente insolúvel em água, solúvel em metanol e ligeiramente solúvel em álcool. Quimicamente corresponde a 1-[(2RS)-2-[(2,6-diclorobenzil)oxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol¹. Imidazóis é uma classe de compostos aromáticos heterocíclicos de derivados imidazólicos e isómeros, anfóteros, com estrutura de anel aromático similar, mas com vários substituintes². Sua ação farmacológica como agente antifúngico é a de destruir fungos, suprimindo sua habilidade de crescer ou reproduzir³.

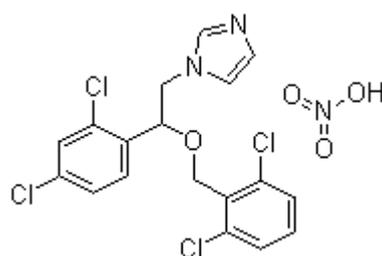


Figura 1: Estrutura química do nitrato de isoconazol

É de suma importância a caracterização físico-química do princípio ativo, possibilitando sua padronização e avaliação de sua pureza, tornando-o adequado para validação em matrizes farmacêuticas como o creme, buscando demonstrar a confiabilidade dos resultados das análises executadas.

Até o presente verificou-se não haver estudos publicados sobre a estabilidade do nitrato de isoconazol creme na literatura científica consultada. Assim surgiu-nos o questionamento da estabilidade do nitrato de isoconazol na forma farmacêutica creme dermatológico e vaginal, nas condições recomendadas pelos órgãos fiscalizadores.

Frente às situações expostas, julgaram-se necessários o desenvolvimento e a validação de metodologia para análise desse fármaco e de sua forma farmacêutica bem como o estudo de degradação, pois os estudos realizados com a forma farmacêutica do fármaco em questão não constam na literatura pesquisada, tampouco em compêndios oficiais, o presente projeto virá a contribuir para o

conhecimento do comportamento do fármaco frente às condições adversas que foram adotadas e avaliadas nos testes de degradação forçada.

A seguir, passaremos a descrever e comentar aspectos pertinentes a fármacos antifúngicos com abordagem dos compostos imidazólicos em geral. Características físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas do nitrato de isoconazol também são descritas, relatando algumas técnicas utilizadas para sua determinação. O capítulo apresenta ainda estratégias sobre avaliação de estabilidade em fármacos bem como determinação de estudos de degradação forçada e condições de análise, além de abordar o processo de validação de metodologia analítica.

O capítulo da parte experimental descreve os ensaios utilizados na qualificação e quantificação da substância química de trabalho utilizada, a metodologia analítica empregada para a preparação do padrão e da amostra, as condições cromatográficas utilizadas, estratégias usadas para a validação de metodologia analítica e condições empregadas na determinação dos ensaios de estresse aplicadas na matéria-prima e produto.

Na discussão dos resultados encontram-se os valores obtidos nos ensaios da matéria-prima utilizada como Substância Química de Trabalho (SQT), os valores encontrados para os parâmetros de validação e os resultados dos testes de degradação forçada realizados na matéria-prima e produto (creme) do nitrato de isoconazol.

Finalmente, o último capítulo relata as principais conclusões obtidas da validação de metodologia analítica para o NI creme, bem como a discussão dos resultados obtidos através das condições de degradação adotadas para a análise do fármaco e sua forma farmacêutica.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a potencialidade de degradação do isoconazol por decomposição forçada sob uma variedade de condições de estresse.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método para análise quantitativa de nitrato de isoconazol em creme por cromatografia líquida de alta eficiência.

- Submeter o fármaco (matéria-prima e NI creme) a condições de degradação forçada, correlacionando o efeito da condição de estresse (fotólise, hidrólise oxidativa e hidrólise ácida e alcalina) e a taxa de decomposição da matéria-prima e do creme de nitrato de isoconazol.

- Avaliar a interferência dos produtos de degradação sobre o método analítico proposto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fármacos Antifúngicos

Os fármacos antifúngicos são classificados em agentes químicos clássicos, agentes químicos atuais e em antibióticos. Os agentes químicos clássicos são aqueles medicamentos que apresentam, de maneira geral, espectro de ação reduzido contra fungos, atuando como fungistático de modo indireto ao modificar as condições locais como, por exemplo, o iodo, os ácidos graxos e derivados, ácido salicílico, tolnaftato e tolclato. Os agentes químicos atuais são representados pelos imidazóis e triazóis, flucitosina e alilaminas e os antibióticos representados pelos poliênicos (anfotericina B, nistatina e natamicina) e a griseofulvina⁴.

Os fármacos antifúngicos exercem ações fungistáticas ou fungicidas^a, direta ou indiretamente. Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), excetuando-se a fluocitosina e a griseofulvina, que atuam na síntese do ácido nucléico⁵.

Contraopondo-se ao grande número de agentes antibacterianos, os agentes antifúngicos são em número limitado. As principais famílias de antifúngicos compreendem os poliênicos, os azólicos, tiocarbamatos, alilaminas, derivados morfolínicos e uma miscelânea de outros agentes que incluem a 5-fluorocitosina, a griseofulvina, entre outros. Todavia, a maior importância recai sobre os poliênicos, a 5-fluorocitosina e os azólicos⁶.

^aFungicidas são as substâncias químicas utilizadas para destruir fungos nocivos a seres humanos e vegetais;
Fungistáticos são as substâncias químicas que inibem a atividade vital de fungos.

3.2 Compostos azólicos

Os azóis são antimicóticos, químicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e bolores, apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição um.

Os imidazóis foram descobertos em 1949, sendo que o nitrato de imidazol foi utilizado experimentalmente pela primeira vez em 1967. Atualmente dispõe-se de vários derivados do imidazol para uso sistêmico ou tópico no tratamento de diversas infecções micóticas^{6, 7}.

Os antifúngicos azólicos são classificados como imidazóis (isoconazol, miconazol, cetoconazol, entre outros) e triazóis (itraconazol, fluconazol, voriconazol, entre outros). Os imidazóis apresentam dois átomos de nitrogênio no anel azólico (Figura 2), enquanto os triazóis apresentam três átomos de nitrogênio no anel azólico (Figura 3).

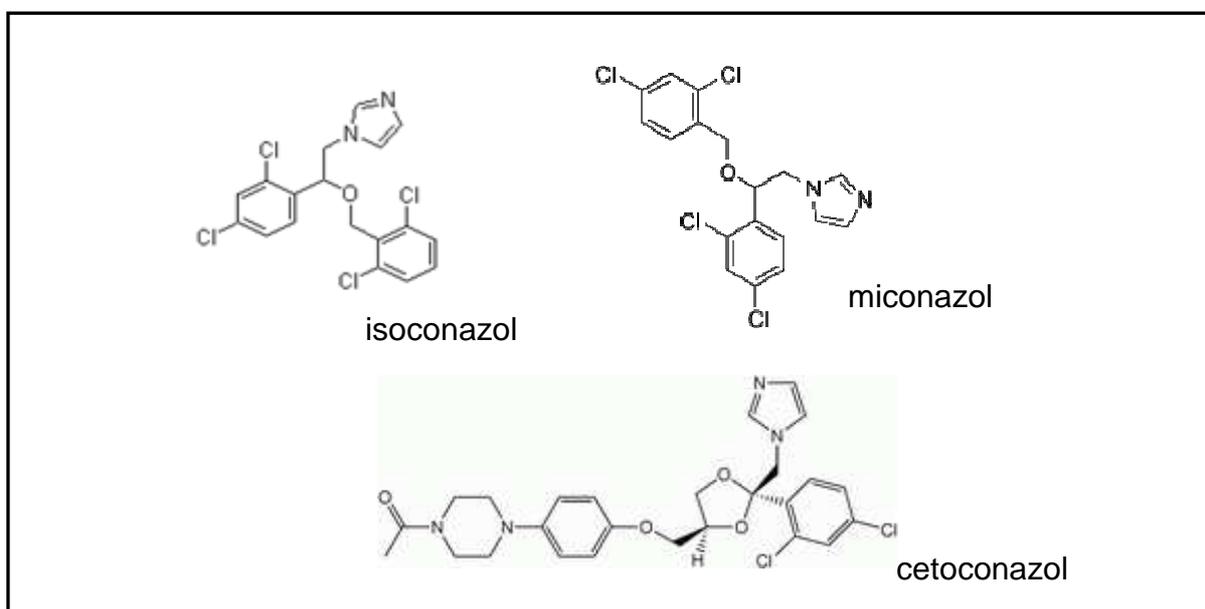


Figura 2: Estrutura química de fármacos antifúngicos da classe dos imidazóis

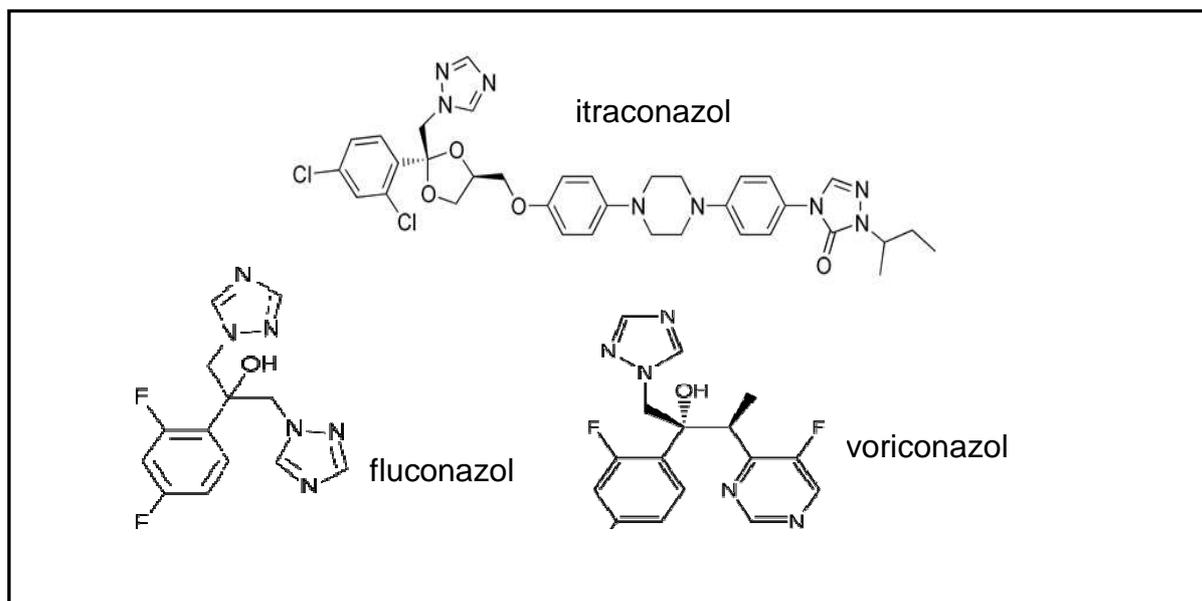


Figura 3: Estrutura química de fármacos antifúngicos da classe dos triazóis

O grupo de fármacos azólicos teve o uso clínico iniciado em meados da década de 1970, causando grande impacto na terapia antifúngica, pelo seu largo espectro de ação e, a partir do cetoconazol, pela facilidade da administração oral. Aos imidazólicos juntaram-se, nos anos 1990, os triazólicos (fluconazol e itraconazol), com maior biodisponibilidade e atividade mais intensa. Recentemente, foi liberado para uso médico o voriconazol, um triazólico de segunda geração com espectro de ação mais amplo do que os azólicos anteriores, e aguardam-se o posaconazol, o ravuconazol e outros novos derivados⁸.

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. Os imidazóis inibem a lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular⁹. Em termos moleculares, um nitrogênio disponível (nitrogênio na posição três nos imidazólicos e o nitrogênio na posição quatro nos triazólicos) estabelece uma ligação com o Fe do heme, na sexta posição de

coordenação; o restante da molécula do antifúngico interage com a apoproteína^b do citocromo P-450, onde, a estrutura de cada azol determinará sua especificidade, na dependência desta ligação¹⁰.

Todos os azólicos têm meia-vida sérica^c suficientemente longa para possibilitar a terapia com uma ou duas doses por dia. O fluconazol tem excelente biodisponibilidade, alcançando boas concentrações em diferentes fluídos orgânicos, inclusive no líquido cefalorraquiano^d, e 75% da dose oral é excretada por via urinária⁸. A metabolização dos azóis é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico¹¹.

O espectro de ação dos imidazólicos e triazólicos abrange os agentes de paracoccidiodomicose, histoplasmose, coccidiodomicose, criptose, blastomicose norte-americana e dermatomicoses. A maioria das espécies de *Candida* mostra susceptibilidade aos azólicos, notando-se que *C. krusei* e *C. glabrata* são menos susceptíveis. O itraconazol atua adicionalmente contra *Aspergillus fumigatus* e diversas outras espécies desse gênero, sendo uma alternativa à anfotericina no tratamento de pacientes com aspergilose^e, além de ser o principal recurso na terapia antifúngica de pacientes com micoses sistêmicas endêmicas. O cetoconazol também é empregado no controle destas últimas infecções, porém é limitado a casos não graves. O fluconazol mostra boa atuação e é preferido no tratamento de pacientes com infecções por espécies sensíveis de *Candida*, além de ser utilizado na criptococose e nas infecções urinárias e do sistema nervoso central por fungos susceptíveis. O voriconazol, o posaconazol e o ravuconazol são triazólicos de segunda geração, resultantes de modificações na estrutura química do fluconazol e

^b Apoproteínas são moléculas resultantes da combinação de proteínas (que possuem um pólo solúvel nos lipídeos e outro na água) com os lipídeos, a fim de que estes possam ser solubilizados e poderem circular num meio aquoso como o sangue¹².

^c Meia-vida sérica é o tempo necessário para a concentração plasmática ou a quantidade de fármaco no corpo ser reduzida 50%¹³.

^d O líquido cefalorraquidiano é um fluido corporal estéril e de aparência clara que ocupa a região entre o crânio e o córtex cerebral. É uma solução salina muito pura, pobre em proteínas e células, e age como um amortecedor para o córtex cerebral e a medula espinhal¹⁴.

^e Aspergilose é uma infecção pulmonar causada pelo fungo *Aspergillus*¹⁵.

itraconazol. Representam avanços na terapêutica das infecções fúngicas por terem o espectro de ação ampliado^{10,11,15}.

3.3 Nitrato de Isoconazol

De acordo com a Farmacopéia Européia¹⁶, a Tabela I apresenta as características físico-químicas do nitrato de isoconazol.

Tabela I: Características físico-químicas do nitrato de isoconazol

	Descrição
Nome químico	Nitrato de 1-[(2RS)-2-[(2,6-Diclorobenzil)oxi]-2-(2,4-diclorofenil)-etil]-1H-imidazol
Fórmula molecular:	C ₁₈ H ₁₅ Cl ₄ N ₃ O ₄
Massa molecular	479,1 Da
Ponto de fusão	178°C – 182°C
Descrição	Pó branco
Limite de teor declarado	99,0% a 101,0%
Solubilidade	Muito pouco solúvel em água, solúvel em metanol, levemente solúvel em etanol (96%)

Do ponto de vista farmacodinâmico, nitrato de isoconazol creme é um antifúngico de amplo espectro, eficaz contra dermatófitos, leveduras, fungos leveduriformes (incluindo o agente responsável pela pitiríase versicolor) e bolores. Também apresenta eficácia contra o agente patogênico do eritasma e bactérias Gram-positivas^{17,18}.

Com relação às características farmacocinéticas, o isoconazol é rapidamente absorvido pela pele. Os níveis máximos da substância na pele foram alcançados após uma hora e mantidos por pelo menos sete horas (estrato córneo^f: aproximadamente 3500 µg mL⁻¹ ± 7 mmol L⁻¹, epiderme: aproximadamente 20 mcg mL⁻¹ ± 40 µmol L⁻¹ e derme: aproximadamente 3 mcg mL⁻¹ ± 6 µmol L⁻¹).

^fEstrato Córneo: camada mais superficial da epiderme responsável pela proteção do organismo contra agressões físicas e químicas, além de servir como uma barreira contra evaporação excessiva de água da pele¹⁹.

A remoção do estrato córneo antes da aplicação aumentou os níveis de isoconazol no tecido escoriado em um fator de aproximadamente dois. Os níveis da substância no estrato córneo e na epiderme excederam em muitas vezes as concentrações antimicóticas mínima inibitória e biocida dos patógenos mais importantes (dermatófitos, bolores e leveduras), atingindo tais concentrações também na derme.

O isoconazol não é inativado metabolicamente na pele. Após a remoção do estrato córneo, menos de 1% da dose aplicada atinge a circulação sistêmica, considerando-se um intervalo de exposição de 4 horas. O isoconazol é completamente metabolizado e rapidamente eliminado. Os ácidos 2,4-dicloromandélico e 2-(2,6-diclorobenziloxi)-2(2,4-diclorofenil)-acético foram caracterizados como os metabólitos quantitativamente mais importantes^{17, 18}.

3.4 Métodos de determinação

Na literatura pesquisada não foram encontrados métodos analíticos desenvolvidos para o isoconazol em creme. A Farmacopéia Européia (2008) apresenta monografia para análise de teor da matéria-prima por titulação potenciométrica em meio não aquoso.

A maioria dos métodos disponíveis na literatura refere-se aos imidazóis, os quais na sua maioria consistem em métodos por CLAE. Imram *et al.*²⁰ desenvolveram método por CLAE com detector ultravioleta-visível, utilizando uma coluna AmyCoat (tris-(3,5-dimetifenilcarbamato) RP da Kromasil®, com diferentes combinações de água e acetonitrila como fase móvel, para separação quiral dos antifúngicos imidazólicos econazol, miconazol, isoconazol e sulconazol. O comprimento de onda utilizado foi 225 nm. O método mostrou-se útil e reprodutível, podendo ser utilizado para resolução destas moléculas em matrizes biológicas.

Métodos espectrofotométricos (componente de regressão principal e primeira derivada) e cromatográficos foram propostos por Karacan *et al.*²¹ para determinação de valerato de diflucortolona e nitrato de isoconazol na formulação creme. Por espectrofotometria, utilizando componente principal de regressão, a matriz dos dados da concentração foi preparada usando misturas sintéticas dos fármacos em

metanol: água (3:1 V/V). A matriz dos dados da absorvância, que corresponde à matriz dos dados da concentração, foi obtida medindo-se absorvâncias em 24 comprimentos de onda na faixa de 242-298 nm. Utilizando-se primeira derivada, os valores $dA/d\lambda$ foram medidos em 247,8 nm para a diflucortolona e 240,2 nm para o isoconazol. Para o método cromatográfico foram utilizadas as seguintes condições: coluna ACE[®] C₁₈, com fase móvel composta de metanol e água (95:5 V/V) e vazão de 1,0 mL min⁻¹. Os métodos foram validados analisando-se misturas sintéticas, mostrando-se adequados para aplicação em preparações farmacêuticas na forma de creme.

Di Pietra *et al.*²² utilizaram colunas com diferentes materiais de empacotamento (Hypersil C₁₈, Spherisorb-CN, Chromspher-B) na cromatografia líquida de fase reversa, para obter separações seletivas de imidazóis tais como o cetoconazol, clotrimazol, tioconazol, bifonazol, isoconazol, econazol, miconazol e fenticonazol. A melhora na sensibilidade da análise por HPLC com detecção UV foi obtida com a reação fotoquímica pós-coluna. O procedimento de extração em fase sólida mostrou ser uma técnica conveniente de preparo da amostra na forma farmacêutica creme, obtendo-se boa recuperação dos fármacos.

Os pesquisadores Thunberg *et al.*²³ realizaram estudo de alguns compostos racêmicos da Farmacopéia Européia, dentre elas o isoconazol, para verificar a validade da exigência da especificação que consta no compêndio, investigando as propriedades quirópticas dos enantiômeros, com a utilização da espectroscopia circular dicróica ou cromatografia quiral e polarimetria. As condições experimentais para a medida da rotação óptica dos compostos estudados foram tomadas das especificações da farmacopéia, portanto, somente água, metanol e diclorometano foram utilizados como solventes, com concentrações dos analitos que variaram de 10 a 50 mg mL⁻¹. Para um composto racêmico, esse deve apresentar um ângulo de rotação inferior a 0,1° o que corresponde a uma rotação específica de 2 a 10, de acordo com o compêndio. A separação dos enantiômeros foi otimizada com a utilização de uma coluna analítica de dimensões 250 × 4,6 mm, com diâmetro de partícula de 10 µm. A fase estacionária quiral utilizada no estudo foi de tris-(4-metilbenzoato) de celulose, disponível comercialmente como Chiralcel OJ[®] ou

Chiralcel OD[®] (tris-(3,5 dimetilfenilcarbamato) de celulose) e Chiralpak AD[®] (tris-(3,5 dimetilfenilcarbamato) de amilose) ou Chiralpak AS[®] (tris-(1-(S)- feniletilcarbamato) de amilose. A fase móvel foi constituída de hidrocarboneto (iso-hexano ou heptano) com a adição de modificadores tais como 1-propanol, 2- propanol, etanol ou acetonitrila. Ao contrário da polarimetria que demonstrou baixa sensibilidade à mistura que contém enantiômeros com excesso enantiomérico de 40% a 80%, com a utilização da cromatografia quiral foi possível verificar as diferenças entre as várias misturas, tornando-se uma alternativa com medidas significativas na avaliação da pureza óptica de enantiômeros e misturas não racêmicas. Para o isoconazol foi possível realizar a medida de rotação óptica por polarimetria, o qual apresentou ângulo de rotação de 0,31° para 5 mg mL⁻¹ em metanol.

3.5 Estabilidade do Fármaco – Testes de Estresse

Enquanto classicamente estabilidade refere-se à habilidade de resistir à perda de um produto químico devido à decomposição, no campo farmacêutico o termo “estabilidade” refere-se ao tempo de armazenamento permitido antes que todo e qualquer produto de degradação na forma da dosagem alcance um nível suficiente para representar risco ao paciente. Baseado neste tempo, a data de validade de um produto é determinada. O nível permissível de uma dada impureza dependerá da dose terapêutica e da probabilidade de toxicidade²⁴.

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas²⁵. Este teste mostra-se como uma tendência dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto, demonstrando-se assim, que o conhecimento do comportamento químico pode ser usado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada. Embora o conceito de teste de estresse não seja novo para a indústria farmacêutica, o procedimento não havia sido claramente definido até a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) fornecer uma definição em seu guia sobre estabilidade, indicando que os testes de estresse são designados para auxiliar a determinar a

estabilidade intrínseca da molécula, estabelecendo os caminhos de degradação, a fim de identificar os prováveis produtos da degradação e validar a capacidade do método analítico usado como indicador de estabilidade²⁶.

Um dos principais objetivos a serem atingidos através desse teste é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação. Estes também fornecem informações sobre as rotas de degradação e dos produtos formados, que poderiam ser produzidos durante o período de armazenamento²⁵.

Vários fatores ambientais influenciam na estabilidade, como temperatura, umidade e luz. Outros fatores que contribuem, relacionados ao próprio produto, são: propriedades físicas e químicas de substância ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem²⁷. Fármacos degradados podem resultar em situações indesejáveis para o usuário, tais como: perda ou diminuição da potência, aumento da atividade, geração de efeitos tóxicos ou colaterais²⁸. Por estes motivos, os compêndios descrevem recomendações quanto ao armazenamento de cada fármaco em sua respectiva monografia, como manter o produto ao abrigo da luz (para as substâncias fotolábeis), manter sob refrigeração ou em local fresco (para as substâncias termolábeis), manter em local seco (para substâncias lábeis à umidade), entre outras. Para o armazenamento do nitrato de isoconazol creme, recomenda-se conservar o produto em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C)²⁹.

Um dos efeitos que o estudo de degradação forçada inclui é a susceptibilidade à hidrólise por extensa variação dos valores de pH, que são condições típicas de degradação dos fármacos. Muitos fármacos são considerados como instáveis na água e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação³⁰. Para realizar o estudo de estresse, em condição de hidrólise ácida, utiliza-se

principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição³¹.

As reações de degradação química provocadas pela umidade são catalisadas pelas moléculas de água por duas vias. Primeiramente, a água pode participar do processo de degradação química por si só, como um reagente, induzindo a hidrólise, hidratação, isomerização ou outras reações químicas bimoleculares. Nestes casos, a velocidade de degradação é diretamente proporcional à concentração da água, do íon hidrônio ou hidróxido. A água também pode ser adsorvida na superfície do produto e formar uma camada de hidratação na qual a substância é dissolvida e degradada. A adsorção da água na superfície do produto farmacêutico pode alterar o seu estado físico e, conseqüentemente, afetar sua reatividade, exercendo, desta forma influência indireta na degradação do produto³².

A luz apresenta também papel relevante nas reações de degradação de fármacos e medicamentos. As radiações catalisam ruptura de ligações, oxidações, isomerizações, polimerizações, reordenamentos e racemizações. Compostos contendo grupos cromóforos tais como nitro, nitroso, cetona, sulfona, ligações duplas e triplas são mais sensíveis à radiação luminosa. A sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número destes cromóforos na molécula e especialmente se estiverem conjugados, permitindo a interação dos elétrons livres³³. O isoconazol apresenta grupos cromóforos em sua estrutura, além de elétrons livres devidos ao nitrogênio do anel imidazólico. Fármacos fotosensíveis podem ser afetados tanto pela luz natural solar, especialmente pela radiação ultravioleta, ou por fontes de luz artificial fluorescente. De acordo com o ICH²⁶ duas fontes de luz podem ser utilizadas em estudos de fotoestabilidade: i) fonte com emissão padrão similar ao D65/ID65 sendo o D65 equivalente à luz do dia externa, ISO10977: 1993 e o ID65 luz do dia indireta que pode ser obtida com lâmpadas fluorescentes combinadas a lâmpadas com emissão ultravioleta ou visível, xenônio ou metal – haletos, com filtros de vidro que permitam emissão ao redor de 320 nm; e ii) lâmpada fluorescente branca, similar a ISO 10977, e lâmpada UV fluorescente que possua distribuição espectral de 320 a 400 nm, com máximos de emissão entre 350 e 375 nm.

A degradação oxidativa é, também, uma das principais causas de instabilidade de fármacos. Dentre os mais conhecidos e estudados fármacos têm-se os esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação³⁴. O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30%. A estabilização de fármacos frente a condições oxidativas envolve a observação de um número de precauções durante a manufatura e estocagem. O oxigênio em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono. O contato com íons de metais pesados, que catalisam a oxidação, deve ser evitado e a estocagem deve ser a temperaturas reduzidas³⁴.

A temperatura é um importante fator ambiental envolvido na degradação de produtos farmacêuticos, uma vez que, na maioria dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura e não existe um acondicionamento capaz de protegê-los dos efeitos do calor³⁵.

Devido à falta de informações detalhadas com relação aos procedimentos a serem realizados na condução de ensaios de estresse, a realização do teste sofre variações extremas nos procedimentos utilizados pelas companhias farmacêuticas para a obtenção dos resultados, sendo observada a condução dos estudos sem respaldo científico, levando a resultados muitas vezes duvidosos, principalmente quando são aplicadas condições extremas em um curto intervalo de tempo^{36, 37}.

Não existem avaliações frente a condições de estresse, nem relatos de estudo de estabilidade para o nitrato de isoconazol, mas vários estudos vêm sendo realizados para obtenção de produtos de degradação de alguns fármacos antifúngicos utilizados na terapêutica, empregando diferentes métodos de obtenção e identificação. Na Tabela II estão demonstrados alguns fármacos antifúngicos e suas respectivas condições de estresse descritas nos trabalhos já publicados.

Tabela II: Condições empregadas em fármacos antifúngicos para avaliação de estudos de estresse.

Fármaco	Condições de estresse avaliadas	Comentários	Ref.
Miconazol	Produto submetido a condições naturais durante 18 meses	Eluição de picos secundários de baixa intensidade, mas com boa resolução em relação ao pico principal. A pureza de pico do miconazol foi mantida não apresentando interferentes.	38
Ornidazol	Hidrólise ácida: HCl 0,1M, 80°C, 72 horas; HCl 1M, 80°C, 12 horas e HCl 5M 12 horas; Hidrólise alcalina: NaOH 0,1M, 80°C, 8 horas e NaOH 1 M, 40°C, 8 horas; Meio Oxidativo: H ₂ O ₂ 3% 24 horas e H ₂ O ₂ 30% 48 horas; Fotólise: solução durante 30 dias na câmara de fotólise.	Hidrólise ácida: diminuição na intensidade do pico principal com o tempo e força do ácido. Não houve eluição de picos secundários; Hidrólise alcalina: degradação total e eluição de dois picos adicionais com valores de massa de 184 (epóxido) e 202 (diol); Oxidativa: degradação de 8 a 10% em H ₂ O ₂ 3%; Fotólise: degradação com formação de pico secundário.	39
Voriconazol	Hidrólise ácida: HCl 0,1M, 80°C, 2 horas; Hidrólise alcalina: NaOH 0,1M, temperatura ambiente, 30 minutos; Hidrólise neutra: solução da amostra em água sob refluxo por 4 horas; Meio Oxidante: KMnO ₄ 5%, temperatura ambiente, 48 horas; Estufa a 70°C, 48 horas; Estufa a 70°C, 80% de umidade relativa, 48 horas; Fotólise em lâmpada UV 352 nm, 22 horas.	Hidrólise ácida: decaimento do teor de aproximadamente 11%, com eluição de um pico adicional; Hidrólise alcalina: degradação (77%) com eluição de picos secundários; Hidrólise neutra: o fármaco manteve-se estável; Meio Oxidante: eluição de vários picos adicionais e degradação do ativo (17%); nas demais condições, manteve-se estável.	40
Clotrimazol	Solução do fármaco e seus dois produtos de degradação conhecidos: (o-clorofenil)difenilmetanol) e imidazol foram armazenados em acetone nitrila à temperatura ambiente (25°C) e em refrigerador refrigerador (4°C) por 24 h.	Na impureza (o-clorofenil)difenilmetanol) ocorreu variação acima de 1% no teor. As soluções do clotrimazol e da outra impureza não demonstraram interferência, podendo serem armazenadas a temperatura ambiente (25°C) ou em refrigerador (4°C).	41
Anfotericina	Solução da amostra em N, N - dimetilformamida irradiada em cabine de luz Chromato-Vue®, 302 nm, durante quatro semanas.	Através da análise do teor, verificou-se que não houve fotodegradação da amostra, tampouco foram observados picos adicionais no cromatograma.	42
Oxiconazol	Solução ácida (HCl 0,1M) e alcalina (NaOH 0,1M) em refluxo 4 horas; Solução oxidante: H ₂ O ₂ 30% durante 10 horas em condições ambientais e protegido da luz.	Em solução ácida o fármaco degradou 7,2% após 1 hora em refluxo e 13,8% após 4 horas em refluxo com eluição de dois picos adicionais; Em solução alcalina o fármaco degradou 52% e 63% após 1 e 4 horas, respectivamente, com eluição de dois picos adicionais de baixa intensidade; O fármaco em solução oxidante não apresentou degradação.	43
Secnidazol	Hidrólise ácida: HCl 0,1M, 80°C, 12 horas; Hidrólise alcalina: NaOH 0,1M, 80°C, 8 horas; Condições neutras: solução em água, com aquecimento de 80°C (5 dias); Meio Oxidativo: Inicialmente em H ₂ O ₂ 3%, (6 h) e subsequentemente em H ₂ O ₂ 30% (48 h); Fotólise: soluções da amostra em HCl 0,1M, água e tampão fosfato (pH 10) em câmaras de fotoestabilidade (8 dias); Condições térmicas: fármaco (sólido) exposto a temperatura de 50°C durante três meses.	Hidrólise ácida: 8-10% do fármaco degrada-se, mas sem formação de produtos de degradação, Hidrólise alcalina: ocorre degradação com eluição de picos secundários e formação de amônia e ácido acético; Condições neutras: 5-8% de degradação do fármaco; Oxidativa: fármaco estável em H ₂ O ₂ e 70% - 75% de degradação em H ₂ O ₂ 30%; Fotólise: degradação de aproximadamente 75% do fármaco sem eluição de picos adicionais; Condições térmicas: fármaco estável.	44

Conforme ilustrado na Tabela II, a literatura descreve a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos como a principal metodologia analítica para a quantificação em estudos de estresse de antifúngicos, sendo preconizado o uso de detectores acoplados com determinação por UV, DAD, além de outros tipos como detectores de espectrometria de massas. As fases móveis mais utilizadas são, geralmente, mistura de solventes orgânicos e tampões com sistema de separação através de coluna com fase reversa octadecilsilano (C₁₈), sistemas de eluição da fase móvel isocrático e detecção em comprimento de ondas que variam na faixa de 210 a 310 nm. Para o estudo da avaliação da degradação forçada verifica-se a utilização, principalmente, de condições de hidrólise alcalina e ácida, onde são utilizados soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico nas concentrações de 0,1 M e 1 M como reagente. Em condições oxidativas, o agente oxidativo mais comumente utilizado foi água oxigenada nas concentrações de 3% e 30%, embora tenha sido encontrado trabalhos nos quais empregou-se solução de permanganato de potássio 5% como agente oxidante⁴⁰. Em alguns trabalhos verifica-se acentuada degradação quando o fármaco é exposto em H₂O₂ 30% (por exemplo, o secnidazol), já em outros casos a exposição a elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio (30%), mesmo sob extremas condições não apresentou degradação significativa (por exemplo, o oxiconazol).

Na maioria dos trabalhos citados ocorre degradação significativa em condições de hidrólise alcalina onde se observa diminuição na área do pico do analito, conforme há acréscimo no tempo de análise (que varia entre 2 horas e 72 horas nas condições de estresse), mas sem o surgimento de picos adicionais ao cromatograma, o que pode indicar a presença de compostos não cromóforos. Para as demais condições empregadas (fotólise e hidrólise ácida), a redução no teor não ultrapassa 30%. Em nenhum trabalho citado acima houve estabelecimento de balanço de massa entre o fármaco decomposto e a formação do produto de degradação. Dos dados pesquisados, aproximadamente 60% identifica o produto de degradação majoritário com auxílio de espectrômetro de massas.

Nos trabalhos em que se realizaram sob condições neutras de estresse (utilizando água, em condições de refluxo) não houve degradação significativa. A

taxa lenta de decomposição em circunstâncias neutras é compreensível, porque as reações em pH neutro não são catalíticas e somente quando o fármaco é exposto sob longos períodos de tempo e em condições exageradas de temperatura pode haver algum tipo de degradação⁴⁵.

3.6 Validação de método analítico

O objetivo da validação de um método é fornecer informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, sendo considerado um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento.

Antes de ser realizada a validação propriamente dita, há necessidade de avaliação de alguns itens com elevado potencial de afetar os ensaios na validação⁴⁶:

- Qualificação do equipamento analítico: deve ser realizada rotineiramente, em intervalos de tempo predeterminados e após cada qualificação dos equipamentos para garantir que o sistema cromatográfico esteja apto a realizar a validação de metodologia. Durante os estágios da qualificação do equipamento, devem ser realizados testes como a qualificação de instalação (QI) que estabelece que o instrumento apresenta-se nas condições projetadas e especificadas e está devidamente instalado, a qualificação de operação (QO) que assegura que os módulos específicos do sistema estão operando de acordo com as especificações definidas para exatidão, linearidade e precisão, e a qualificação de performance (QP) que é baseada em testes com padrões que deverão estar dentro dos limites de aceitação definidos pelos fabricantes e pelos órgãos reguladores e fiscalizadores, para garantir os resultados apresentados.

- Estabilidade das soluções analíticas: para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, a estabilidade das soluções da amostra, padrões, reagentes e fase móvel devem ser determinados antes de iniciar a validação. Um critério de estabilidade para métodos de doseamento é que as soluções da amostra, padrão e fase móvel sejam estáveis por 24 horas sob condições de armazenamento definidas. A estabilidade aceitável é a variação de teor de, no máximo, 2% na resposta do padrão ou amostra.

- Adequação do sistema (*system suitability*): é a garantia de que tanto o equipamento quanto o método validado estão de acordo com os seus requisitos. Os parâmetros a serem medidos e os limites recomendáveis para adequação do sistema, de acordo com o FDA,⁴⁷ estão apresentados na Tabela III.

Tabela III: Parâmetros de adequação do sistema e recomendações⁴⁷.

Parâmetro	Recomendações
Fator de retenção (k')	O pico deve ser bem resolvido com relação a outros picos, geralmente $k' > 2$
Repetibilidade	$DPR \leq 1\%$ para número de amostras ≥ 5
Retenção relativa	Não essencial, desde que a resolução seja indicada
Resolução (R_s)	$R_s > 2$ entre os picos de interesse
Fator de cauda (T)	$T \leq 2$
Pratos Teóricos (N)	Em geral deverá ser maior que 2000

A validação surge com a necessidade de se avaliar se determinado método analítico proposto ou desenvolvido apresenta desempenho adequado para as condições nas quais será aplicado. Ela estabelece, por estudos sistemáticos realizados em laboratório, que o método atende ao seu propósito e às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonization (ICH), International Standard Organization (ISO), American Society for Testing and Materials (ASTM)⁴⁸. No nosso país existem duas agências responsáveis pela verificação da competência dos laboratórios de ensaio, ambas inspiradas em diretrizes do ICH e do grupo EURACHEM: a ANVISA com a resolução RE n° 899 de 29/05/2003⁵⁰ e o INMETRO com o documento DOQ-CGCRE-008 de 03/2003⁴⁹. A Tabela IV apresenta as figuras de mérito estipuladas pelos dois órgãos regulamentadores.

Tabela IV: Parâmetros de validação recomendados pelo INMETRO⁴⁹ e ANVISA⁵⁰.

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
-	Curva de calibração
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência (bias)	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade (precisão intra-corrída)
Precisão Intermediária	Precisão Intermediária (precisão inter-corrída)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza da medição	-

De acordo com a ANVISA, os testes necessários para a validação são classificados em quatro categorias conforme a Tabela V.

Tabela V: Classificação e finalidade dos testes para a validação de método⁵⁰.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

Para cada categoria é exigido um conjunto de testes, relacionadas na Tabela VI.

Tabela VI: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Caso houver comprovação de reprodutibilidade, não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

A seguir, passaremos a definição dos diversos parâmetros implicados em um processo de validação.

3.6.1 Especificidade/Seletividade

O aspecto mais importante a ser considerado durante a validação do método analítico é a especificidade, definida como habilidade de medir exatamente a concentração do analito na presença de outros componentes da amostra. Assegurar a especificidade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método, comprometendo assim a determinação dos parâmetros de exatidão, precisão e linearidade⁵¹. De fato, o termo específico refere-se a um parâmetro que produz uma resposta para um único analito, enquanto o termo seletivo refere-se a um método que fornece resposta a um grupo de entidades químicas que podem ou não serem distinguíveis umas das outras⁵². Neste caso adota-se o termo seletividade, desde que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância.

Existem diferentes critérios para avaliação da seletividade, dentre eles os mais utilizados referem-se à comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância, onde não poderá haver eluição de interferentes no tempo de retenção da substância de interesse; a avaliação da seletividade também pode ser realizada com a utilização de detectores como arranjo de diodos e espectrômetro de massas, através da comparação do espectro do pico obtido na amostra com o de um padrão, indicando a presença de composto puro.

3.6.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método, e depende do uso em questão. A ANVISA especifica um intervalo compreendido entre 80–120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos⁵⁰. Após visualização de relação linear do gráfico, os resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo coeficiente de correlação de Pearson, r , também conhecido como coeficiente de correlação produto-momento ou, simplesmente, r de Pearson. O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre -1 e 1 ($-1 \leq r \leq 1$) e indica o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático⁴⁹. Quanto mais próximo de 1 ou -1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais, ou seja, menor o erro em y. Nestas condições, o ajuste da função matemática escolhida para a curva analítica será máximo. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é de 0,99 para a ANVISA e 0,90 para o INMETRO.

3.6.3 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção é a mínima concentração do analito que pode ser detectada com segurança com um nível específico de confiança e limite de

quantificação é a mais baixa concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza⁵³.

Existem diferentes maneiras de definir como esses limites são calculados e interpretados. O caso mais direto de limite de detecção é quando um composto é detectado com uma resposta de cerca de três vezes o nível de resposta do ruído. Para o limite de quantificação, o valor é tomado geralmente como dez vezes o nível de resposta do ruído. Conseqüentemente, o LD e o LQ podem ser simplesmente determinados da quantidade conhecida de um analito que produza tais respostas quando o nível de ruído pode ser detectado facilmente⁵⁴. O ruído do sistema é a amplitude esperada em volts, amperes ou unidades de absorvância do envelope da linha de base, a qual inclui todas as variações randômicas do sinal de detector cuja frequência esteja na ordem de um ou mais ciclos por minuto⁵⁵. Um método alternativo é descrito pelo guia ICH⁵⁶ como: $LOD = 3,3 \sigma / \text{inclinação}$ e $LOQ = 10 \sigma / \text{inclinação}$, onde LOD e LOQ correspondem a limites de detecção e quantificação, respectivamente, σ corresponde ao desvio padrão e inclinação refere-se àquela da curva de calibração.

Os limites de detecção e quantificação também podem ser calculados pelos softwares que acompanham o equipamento. Por exemplo, o software da Shimadzu[®] LC-Solutions disponibiliza três maneiras de cálculo, através dos cromatogramas dos padrões utilizados para construir a curva de calibração para fazer os cálculos. O primeiro procedimento utiliza o valor da inclinação da reta da curva de calibração; o segundo procedimento utiliza o valor onde a reta da curva de calibração cruza o eixo y; e finalmente o terceiro procedimento utiliza o valor do ruído da linha de base do cromatograma dos pontos da reta da curva de calibração.

3.6.4 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre um resultado encontrado e o valor verdadeiro. Descreve o quão próximo é o resultado de uma medida em relação ao valor verdadeiro, incluindo conseqüentemente o efeito da precisão e viés (bias), conforme ilustrado na Figura 4⁵³.

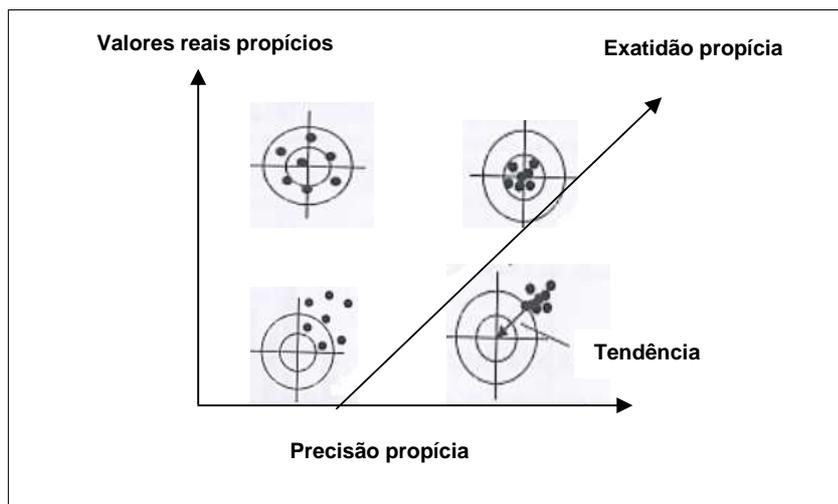


Figura 4: Diferença entre precisão, tendência e exatidão. Adaptada da referência 53.

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis⁵⁰: para o fármaco pode ser realizado através da aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) e/ou comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida; para a forma farmacêutica, a análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado); nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento; para as impurezas, análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco; no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A recuperação ou fator de recuperação é definido como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na amostra, recuperada por meio do método analítico. Reflete, portanto, a quantidade de determinado analito efetivamente quantificada em relação à quantidade “real”

presente na amostra. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre a média e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

3.6.5 Precisão

A precisão é a medida do grau de repetibilidade de um método analítico e é comumente expressada como desvio padrão (ou desvio padrão relativo) de um número estatisticamente significativo de amostras. As amostras deverão ser estáveis, suficientemente homogêneas e representativas em termos de matriz e concentração⁵³. Dois fatores devem ser considerados no estudo da precisão: O tipo de precisão exigido e os modelos experimentais para avaliação da precisão. No primeiro caso, a determinação da natureza da precisão obtida se dá através das condições nas quais as medidas em replicata são realizadas, que podem ser: (i) Repetibilidade - que é a precisão obtida de medidas em replicata em um único laboratório, por um mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo; (ii) Precisão Intermediária – refere-se à precisão obtida de medidas em replicata em um único laboratório, sob condições mais variáveis que as condições de repetibilidade, que devem ser espelhadas nas condições de rotina de uso do método (por exemplo, medidas realizadas em diferentes dias, por diferentes analistas, utilizando diferentes equipamentos) e (iii) Reprodutibilidade – definida pela ISO 3534 como a precisão obtida de medidas em replicata realizadas em diferentes laboratórios, por diferentes analistas, utilizando diferentes marcas de equipamentos.

O segundo fator a ser considerado no estudo da precisão é a utilização de modelos experimentais para avaliação da precisão, no qual, no caso mais simples, a precisão é expressa como desvio padrão (ou desvio padrão relativo) dos resultados. O número de replicatas deve ser suficiente para fornecer uma estimativa confiável do desvio padrão – com menos de seis replicatas o intervalo de confiança não se torna suficiente. Isto elucidado que desvio padrão de amostras baseado em um estreito conjunto de dados fornece uma estimativa incerta do desvio padrão da população⁵³.

3.6.6 Robustez

Robustez é uma medida da suscetibilidade do método frente a pequenas variações de determinados fatores a que o método pode estar sujeito como, por exemplo, temperatura, umidade, analista etc. O método é dito robusto quando não é afetado por essas pequenas variações⁴⁹. A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de processo em estudo. Nos testes de robustez são aplicados experimentos estatísticos que examinam, simultaneamente, os efeitos de alterações em diferentes variáveis do método⁵⁷. Para cromatografia líquida, os principais parâmetros que estão preconizados na Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 e que podem resultar em variação na resposta do método são os seguintes: variação do pH da fase móvel; variação da composição da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas; temperatura; fluxo da fase móvel.

Assim, uma vez adequada a validação de metodologia analítica buscando demonstrar a confiabilidade dos resultados das análises executadas, a execução de estudos forçados de degradação podem gerar dados valiosos e confiáveis para segurança e avaliação da potência de um produto. Nesse sentido, considerando o exposto, bem como o fato de, até o presente, o nitrato de isoconazol na forma farmacêutica creme não possuir monografia em nenhum código oficial e não terem sido encontrados estudos de degradação do produto na literatura consultada, torna-se imprescindível desenvolver e validar métodos utilizando condições forçadas de armazenamento, bem como avaliar o comportamento do fármaco frente a essas condições adversas. Além disso, em função da demanda de exigências com relação à utilização de métodos cromatográficos capazes de identificar e quantificar produtos de degradação estar cada vez maior e diante da publicação do Informe Técnico nº1/2008 pela ANVISA, urge avaliar a estabilidade do nitrato de isoconazol creme sob condições variadas.

4 METODOLOGIA ANALÍTICA

4 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1 Substância Química de Referência – SQR

A substância química de referência utilizada como padrão primário para o desenvolvimento da padronização da substância química de trabalho foi o nitrato de isoconazol lote 1, teor declarado de 100,00 % com certificado de autenticidade fornecido pela Farmacopéia Européia¹⁶ e adquirido pela empresa Las do Brasil.

4.2 Substância Química de Trabalho – SQT

Utilizou-se matéria-prima nitrato de isoconazol de lote interno 034033 proveniente do fabricante Formil Química Ltda – Brasil, fornecido pela Genix Indústria Farmacêutica Ltda. O teor declarado (100,09 %) e lote (07.07.005.355) encontram-se especificados no certificado de análise enviado pelo fornecedor. O isoconazol disponível na forma de nitrato possui monografia para análise de sua matéria-prima na Farmacopéia Européia 6.0, Farmacopéia Portuguesa⁶² e Farmacopéia Britânica⁶³.

4.2.1 Análise Qualitativa da Substância Química de Trabalho

Foi realizada sua identificação, conforme a monografia da Farmacopéia Européia, que utiliza um conjunto de análises complementares, a saber: determinação da faixa de fusão, método espectroscópico molecular (no infravermelho) e cromatográfico (camada delgada), além de teste qualitativo via úmida (determinação de nitrato) e titulação potenciométrica.

4.2.1.1 Determinação da faixa de fusão

A faixa de fusão do isoconazol foi determinada em triplicata através de um medidor automático de ponto de fusão, modelo Optimelt MPA 100 (Gehaka), que dispõe de bloco de aquecimento de alumínio mantido sob um restrito controle computadorizado de temperatura. A amostra foi inserida em triplicata dentro de tubos capilares de 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento, que por sua vez foram introduzidos no bloco de aquecimento. A faixa de fusão é determinada automaticamente no momento em que as amostras, iluminadas por fonte de luz, coalescem e fundem por completo, dando origem a um fluido transparente.

4.2.1.2 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro modelo Spectrum 100 FT-IR (marca Perkin Elmer, EUA) na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} . Para obtenção do espectro no infravermelho misturou-se 1,5 g da matéria-prima com 150 mg de brometo de potássio previamente seco em estufa a 105°C por duas horas. Em seguida, uma vez resfriado, a mistura foi transferida para pastilhador e a pastilha obtida foi destinada à análise espectroscópica.

4.2.1.3 Cromatografia em Camada Delgada

Para a solução teste, preparou-se uma solução metanólica de concentração 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da substância química de trabalho (SQT) descrita no item 4.2. A solução de referência **A** foi preparada na mesma concentração e no mesmo meio e diluente, utilizando-se a solução química de referência (SQR), conforme descrita no item 4.1 e, para o preparo da solução de referência **B**, foi utilizada a SQR de nitrato de isoconazol, descrita no item 4.1 e a SQR de nitrato de econazol (United States Pharmacopeia, Lote G1C346) em metanol, com concentração final de 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O eluente constituiu-se de uma mistura 20:40:40 (V/V/V) de solução de acetato de amônia: dioxano: metanol. A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas de sílica gel funcionalizadas com octadecilsilano (MERCK) com 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada absorvente.

A aplicação das soluções descritas acima ocorreu com o auxílio de tubos capilares de 5 μL , a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa. A migração cromatográfica percorreu 10 cm a partir do ponto de aplicação, sendo a placa cromatográfica disposta em cuba previamente saturada com o eluente. A visualização das manchas foi realizada após a evaporação do solvente residual a vapores de iodo.

4.2.1.4 Reação para determinação de nitratos

Em uma mistura de 0,1 mL de nitrobenzeno e 0,2 mL de H₂SO₄ colocou-se 10 mg da matéria-prima. A mistura foi reservada por 5 minutos e resfriada em banho de gelo. Após foi adicionado lentamente 5 mL de uma solução de NaOH 5 M e 5 mL de acetona.

4.2.2 Padronização da SQT

A determinação do teor da matéria-prima utilizada como padrão de trabalho foi obtido em potenciômetro digital da Metrohm, modelo 794, utilizando eletrodo de vidro através do método de titulação potenciométrica em ácido perclórico 0,1 M em meio acético, conforme Farmacopéia Européia 6.0¹⁶. Foram preparadas seis amostras, dissolvendo-se aproximadamente, para cada uma, 0,350 g em 75 mL de uma mistura de ácido acético anidro e metiletilcetona (1:7 V/V). Todos os cálculos e correções foram automaticamente adquiridos pelo potenciômetro, com adição prévia de fórmula e fator de correção, sabendo-se que a solução de ácido perclórico 0,1 M utilizada fora previamente padronizada por titulação potenciométrica apresentando um fator de correção de 1,0229, e que cada mL desta solução corresponde a 47,91 mg de nitrato de isoconazol.

4.3 Amostra de Nitrato de Isoconazol Creme

O produto utilizado foi nitrato de isoconazol creme 1% com lote 297/09 e validade 10/2011. Esse produto contém 10 mg de nitrato de isoconazol em cada grama de creme base e os excipientes utilizados pelo fabricante em sua formulação são: álcool cetosteárico^g, vaselina sólida e líquida, polisorbato 60^h, monoestearato de sorbitanoⁿ, nipagim e nipazol^o.

4.4 Validação de Metodologia Analítica

4.4.1 Material

^gÁlcool cetosteárico – utilizado como emoliente e emulsificante, aumentando a viscosidade do produto.

^hPolissorbato 60 – agente tensoativo não-iônico, emulsionante, solubilizante e umectante.

ⁱMonoestearato de sorbitano – surfactante não-iônico lipofílico utilizado como agente emulsificante.

^jNipagim e Nipazol – utilizados como preservativo antimicrobiano nas formulações farmacêuticas.

Foi analisada a amostra de nitrato de isoconazol descrita no item 4.3. Para o preparo das soluções foram utilizados solventes de grau analítico adequado para o método de CLAE (J.T. Baker[®] e Tedia[®]). A água ultrapura utilizada foi obtida em um sistema MilliQ[®] Millipore. O pH da solução tampão foi ajustado com ácido fosfórico (85,0%, Vetec[®]) e verificado em medidor de pH, marca Digimed[®], modelo DM-20. Na filtragem das amostras foi empregado filtro de Teflon (Macherey-Nagel[®]) de 0,45 µm de poro e na filtragem da fase móvel foram empregados filtros de nylon com 0,45 µm de poro (Millipore[®]).

Para a validação do método por CLAE, utilizou-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), provido de bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-20A, desgaseificador DGU-20A5 e controlador CBM-20A. Os dados foram obtidos e analisados com o auxílio do software LC Solution. Também foi utilizado o cromatógrafo a líquido Hitachi – Modelo Elite (MERCK), com detector de arranjo de diodos modelo LaChrom Elite L-2450, bomba com acessório de gradiente quaternário e desgaseificador L2130, forno de coluna L2130 e amostrador automático L2200.

A coluna cromatográfica Stable Bond Fenyl[®] (250 mm × 4,6 mm × 5 µm) (AGILENT), foi utilizada nas análises descritas neste estudo.

4.4.2 Método

4.4.2.1 Preparo da solução tampão

A solução tampão foi preparada a partir da transferência de 10 mL de trietilamina (teor de 99,5%, Tedia[®]) para balão volumétrico de 1000 mL, seguido de diluição com água ultrapurificada. O pH foi ajustado para $2,9 \pm 0,05$ com ácido fosfórico P.A..

4.4.2.2 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada pela mistura de solução tampão: metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano (4:3:2:2), seguido de filtração em suporte com membrana de 0,45 µm. Em seguida, a solução resultante foi sonicada por 5 minutos.

4.4.2.3 Preparo da solução padrão

A solução padrão foi preparada pela dissolução de 25 mg de nitrato de isoconazol padrão em balão volumétrico de 50,0 mL com 25 mL de fase móvel, posteriormente completada o volume com o mesmo diluente. Após, 1 mL foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com fase móvel. A solução foi homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon® (Macherey-Nagel, Alemanha) para vial. Todas as pesagens foram realizada em uma balança analítica, modelo AUW 220D (Shimadzu – Japão).

4.4.2.4 Preparo da solução amostra

Cerca de 500 mg de creme (equivalente a 5 mg de nitrato de isoconazol) foi pesado, transferido para Erlenmeyer com tampa ao qual foi adicionado cerca de 50 mL de fase móvel. A amostra foi sonicada em ultrassom a 40-45°C, até dissolução completa. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com a fase móvel. A solução foi homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial.

4.4.2.5 Condições cromatográficas

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido modelo Prominence DAD, marca Shimadzu, com detector de arranjo de diodos, modelo SPD 20A (marca Shimadzu, Japão), dotado de pré-coluna L1 (C18) 30 mm × 4,6 mm × 5 µm (Macherey-Nagel, Alemanha), coluna L11 (Fenil) 250 mm × 4,6 mm × 5 µm (Macherey-Nagel, Alemanha). Na injeção das amostras, foi utilizado filtro para seringa de Teflon® (Macherey-Nagel, Alemanha). A seleção das condições cromatográficas para o doseamento do isoconazol em creme foi realizada com base

na revisão bibliográfica, na seletividade em relação ao branco e nos parâmetros de conformidade do sistema⁵² conforme expressos na Tabela VII.

Tabela VII: Parâmetros de adequação e conformidade do sistema por CLAE⁵².

Parâmetro	Especificação	Cálculo
Resolução (Rs)	$R_s \geq 2$ entre o pico de interesse e o interferente mais próximo	$\frac{1,18 (t_2 - t_1)}{W_{0,5(1)} - W_{0,5(2)}}$
Fator de retenção (k')	$k' \geq 2$	$\frac{t_r - t_0}{t_0}$
Fator de cauda (T)	$0,8 \leq T \leq 1,2$	$\frac{W_{0,0,5}}{2f}$
Número de pratos (N)	$N \geq 2000$	$5,54(tr/W_{0,5})^2$

t_r = tempo de retenção do pico de interesse (minutos);

t_0 = tempo morto (minutos);

t_1 e t_2 = tempos de retenção do primeiro e do segundo pico adjacentes;

$W_{0,05}$ = largura do pico medida a 5% da altura;

$W_{0,5}$ = largura do pico medida a meia altura;

$W_{0,5(1)}$ e $W_{0,5(2)}$ = largura a meia altura do primeiro e segundo pico adjacentes;

f = medida entre a linha que une o máximo do pico com a linha de base e o extremo anterior do pico a 5% da altura.

As condições cromatográficas que foram utilizadas estão apresentados na Tabela VIII.

Tabela VIII: Condições cromatográficas da análise de nitrato de isoconazol creme.

Condições cromatográficas	
Pré-coluna	C18 Symmetry
Coluna	Fenil 250 mm x 4,6 mm x 5 µm
Fluxo	1,0 mL min ⁻¹
Temperatura do forno	45°C
Comprimento de onda	225 nm
Concentração do padrão	50 µg mL ⁻¹
Volume de injeção	10 µL

4.4.3 Parâmetros de validação

4.4.3.1 Especificidade

A especificidade do método do nitrato de isoconazol em creme por CLAE foi avaliada em relação aos principais excipientes. Preparou-se o branco a partir da mistura homogênea dos componentes da formulação simulada (Tabela IX), na

ausência do princípio ativo. As quantidades de excipiente presentes na formulação simulada foram definidas com base nas especificações percentuais descritas de acordo com a fórmula do produto.

Tabela IX: Formulação simulada para creme de nitrato de isoconazol.

Componente	Concentração (%)
Nitrato de isoconazol	1
Álcool cetosteárico	7
Vaselina sólida	3
Vaselina líquida	5
Polissorbato 60	5
Monoestearato de sorbitano	4
Nipagim	0,18
Nipazol	0,06
Água Purificada	74,8

4.4.3.1.1 Teste de doseamento (quantitativo)

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes do creme na determinação quantitativa do isoconazol, através da comparação da matriz isenta da substância de interesse, preparado com o branco^k do produto conforme método descrito no item 4.4.2.4, com a solução padrão, conforme preparo descrito no item 4.4.2.3. A seletividade também foi avaliada através de detector de arranjo de diodos, que comparou o espectro do pico obtido na separação com o do padrão.

Para que método seja considerado específico o mesmo não pode apresentar interferentes significativos na análise de quantificação dos ativos. Por determinação interna permite-se interferência máxima de 2,0% às amostras contaminadas e a análise de pureza do pico deve ser superior a 0,99.

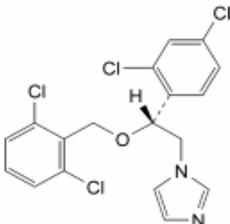
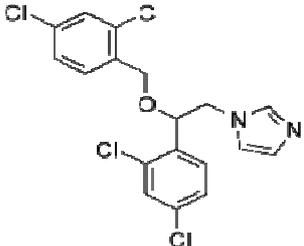
4.4.3.1.2 Teste qualitativo

O método de identificação para nitrato de isoconazol foi avaliado utilizando-se o composto miconazol como contaminante estruturalmente semelhante. As

^kNo presente manuscrito, branco refere-se à preparação isenta do nitrato de isoconazol. Essa preparação é muitas vezes denominada na literatura de placebo. Evitamos essa terminologia por entender que há um contexto de administração ao paciente implícito no conceito de placebo.

estruturas químicas destes compostos e suas semelhanças encontram-se na Tabela X. O isoconazol possui em sua estrutura um anel imidazol unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. Ambos possuem estruturas muito semelhantes com diferença na posição do átomo de cloro no anel aromático.

Tabela X: Semelhanças entre os compostos em estudo.

Composto em estudo	Composto estruturalmente semelhante
Isoconazol	Miconazol
	

As amostras utilizadas para a avaliação deste parâmetro estão listadas na Tabela XI e foram preparadas conforme descrito a seguir.

Tabela XI: Amostras a serem avaliadas na análise de especificidade qualitativa.

Amostra	Fármaco	Composto semelhante (Miconazol)	Branco
1	Sim	-	-
2	-	Sim	-
3	Sim	Sim	-
4	Sim	Sim	Sim
5	-	-	Sim
6	-	-	-

4.4.3.1.2.1 Preparo das amostras

Amostra 1 – Solução padrão de fármaco: A solução padrão de nitrato de isoconazol foi preparada conforme item 4.4.2.3.

Amostra 2 – Solução padrão de composto semelhante: Transferiu-se exatamente cerca de 25,0 mg de padrão de miconazol para balão volumétrico de 50 mL com 25 mL de fase móvel, posteriormente completado o volume com o mesmo diluente. Após, transferido para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com fase móvel. A solução foi homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon®.

Amostra 3 – Solução do fármaco + composto semelhante: Transferiu-se exatamente cerca de 25,0 mg de padrão de miconazol e 25 mg de padrão de isoconazol para balão volumétrico de 50 mL com 25 mL de fase móvel, posteriormente completada o volume com o mesmo diluente. Após, 1 mL foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com fase móvel. A solução foi homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon®.

Amostra 4 – Solução do fármaco + composto semelhante + branco: Cerca de 500 mg de branco, matriz isenta de isoconazol, equivalente a 5 mg de nitrato de isoconazol foi pesado, transferido para Erlenmeyer com tampa, juntamente com 5 mg de isoconazol e 5 mg de miconazol, ao qual foi adicionado cerca de 50 mL de fase móvel. A amostra foi sonicada em ultrassom a 40-45°C, até dissolução completa. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com a fase móvel, homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial.

Amostra 5 – Solução do branco: Cerca de 500 mg de branco, matriz isenta de isoconazol, equivalente a 5 mg de nitrato de isoconazol foi pesado, transferido para Erlenmeyer com tampa ao qual foi adicionado cerca de 50 mL de fase móvel. A amostra foi sonicada em ultrassom a 40-45°C, até di ssolução completa. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com a fase móvel, homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial.

Amostra 6 – Diluente: O diluente foi filtrado para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial.

As amostras foram submetidas à análise cromatográfica, utilizando as condições descritas na Tabela II e os cálculos posteriores conforme método para doseamento.

O tempo de retenção do pico obtido no cromatograma da solução padrão de isoconazol deve ser diferente do tempo de retenção obtido no cromatograma da solução do miconazol. Os picos referentes ao isoconazol e miconazol, obtidos com a solução da amostra 3 devem apresentar uma resolução mínima de 2,0 e os cromatogramas obtidos com as soluções branco e diluente não devem apresentar picos que interfiram na análise dos compostos de interesse.

4.4.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas padrão, desenvolvidas no mesmo dia, contendo dez níveis de concentrações em cada uma delas.

A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de nitrato de isoconazol SQT de 50 µg mL⁻¹ preparada através da dissolução de 25 mg de nitrato de isoconazol padrão em balão volumétrico de 50,0 mL com 25 mL de fase móvel, posteriormente completado o volume com o mesmo diluente. Posteriormente transferiram-se, com auxílio de micropipetador, alíquotas de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3 e 1,5 mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com a fase móvel (solução tampão TEA: MeOH: ACN: THF) (4:3:2:2), obtendo-se soluções com concentração de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 75 µg mL⁻¹. As soluções foram homogeneizadas e filtradas para vial com seringa 0,45 µm de Teflon®.

A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear que estabelece a relação entre a resposta instrumental através da área da banda cromatográfica e a concentração do analito. Foi realizada a determinação de resíduos da curva de calibração da SQT NI. A linearidade foi obtida pela análise de 10 concentrações diferentes (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %).

130 % e 150 %), com verificação da significância estatística da equação de regressão através de testes como ajuste do modelo linear, validade da regressão, eficiência e eficiência máxima. Foram utilizados métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo.

A análise de regressão linear deve fornecer um coeficiente de correlação superior a 0,99⁵⁰.

4.4.3.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LQ e LD foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, utilizando a seguinte equação (ICH, 1996):

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC} \quad (\text{eq. 1})$$

$$LD = \frac{10 \sigma}{IC} \quad (\text{eq. 2})$$

Onde:

σ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

Os resultados foram avaliados através do software LC solution, disponível no equipamento.

4.4.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação, analisado a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações distintas⁵⁰: um ponto inferior, um ponto superior e ponto médio da curva analítica. As amostras correspondentes aos três níveis de fortificação foram preparadas em triplicata e o método foi considerado exato quando o resultado médio obtido para recuperação esteve compreendido entre 95 e 105 % do valor teórico e o desvio padrão relativo entre as amostras apresentou-se menor que 5,0 %, em cada um dos três níveis de concentração.

A exatidão foi avaliada pelo percentual de recuperação do analito, pelo desvio padrão e pelo coeficiente de variação entre as triplicatas, através do método de adição de padrão na solução do creme de nitrato de isoconazol. Para tanto, foi preparada uma solução de nitrato de isoconazol SQR na concentração de 2,5 mg mL⁻¹. O preparo das amostras de nitrato de isoconazol creme foi realizado em triplicata, para cada concentração (80%, 100% e 120%), com adição de 495 mg do branco em balão volumétrico de 50,0 mL. Alíquotas de 0,8 mL, 1,0 mL e 1,2 mL da solução de nitrato de isoconazol SQR foram transferidas, através de micropipetador para os balões das concentrações de 80%, 100% e 120%, respectivamente. As soluções foram diluídas com a fase móvel e, com isto, foram obtidas soluções com concentrações finais equivalentes a 40, 50 e 60 µg mL⁻¹.

As percentagens de recuperação R obtidas para o nitrato de isoconazol SQT foram calculadas através da equação:

$$R = (C_{ME}/C_T) \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

Onde:

C_{ME} = concentração média experimental;

C_T = concentração teórica.

4.4.3.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação percentual obtidos durante a determinação do nitrato de isoconazol em creme nos testes de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Na repetibilidade, as análises foram realizadas em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, considerando seis determinações (n=6) sobre as amostras na diluição correspondente à concentração de 100% da curva analítica, conforme preparo descrito no item 4.4.2.4, e preparo do padrão conforme item 4.4.2.3. O critério de aceitação foi que o coeficiente de variação (CV %) fosse inferior ou igual a cinco¹⁵. Na precisão intermediária, as amostras e o padrão foram preparados de maneira semelhante à repetibilidade, mas em dias diferentes, por analista diferente e em diferente equipamento.

A determinação do teor de NI no creme foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ NI} = \frac{A_a \times C_{\text{SQR}} \times 100}{A_{\text{SQR}} \times C_a} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde:

A_a = área média da solução amostra (média de 2 injeções)

C_{SQR} = concentração da solução SQR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

A_{SQR} = área média da solução SQR (média de 2 injeções)

C_a = concentração teórica da solução amostra

4.4.3.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da verificação do seu desempenho após pequenas variações. Foram aplicadas ao método de doseamento variáveis de preparo da amostra (diferentes tipos de filtros para seringa e estabilidade das amostras em 24 horas) e variáveis nas condições cromatográficas (variação de fluxo da fase móvel, proporção da fase móvel, diferentes lotes de coluna e temperatura do forno). O método deve ser robusto e qualquer alteração que for considerada crítica para a análise deverá ter precauções inseridas na metodologia.

A) Diferentes tipos de filtros para seringa

Filtros de membrana para seringas são recomendados para remover material particulado das amostras. A filtração das amostras reduz os entupimentos e os desgastes das peças do cromatógrafo, aumenta a vida útil da coluna e minimiza as paradas para manutenção.

A solução de nitrato de isoconazol SQT e a solução obtida com o creme de nitrato de isoconazol foram preparadas de acordo com o descrito no item 4.4.2.3 e 4.4.2.4, respectivamente, com a utilização de diferentes tipos de filtros para seringa como celulose regenerada, nylon, teflon, poliestireno, fluoreto polivinidileno e polietersulfônico.

B) Estabilidade da solução da amostra

Preparou-se amostra na concentração usual de análise ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a mesma foi analisada no tempo zero e 24 horas após o preparo, a qual foi mantida em temperatura ambiente, ao abrigo ou exposta à luz. As soluções foram consideradas estáveis caso não houvesse mudanças significativas entre as áreas absolutas da mesma solução avaliada em dias diferentes (DPR inferior a 2%).

C) Modificações na fase móvel

O sistema de bombeamento de fase móvel é crítico em cromatografia líquida de alta eficiência, visto que as análises estão intimamente ligadas ao perfeito funcionamento da bomba. Desta forma, foi avaliado o método alterando-se os parâmetros de fluxo e percentual de fase orgânica da fase móvel, para verificar se o mesmo apresenta-se robusto quando ocorreram tais variações. O fluxo da fase móvel foi alterado em uma (1) unidade de fluxo acima e abaixo do fluxo original ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$). O percentual de fase orgânica foi alterado para um acréscimo de 5 % de MeOH.

D) Diferente lote de coluna

Em técnicas por cromatografia líquida, diferentes colunas cromatográficas do mesmo fabricante são uma fonte comum de variabilidade⁵⁸. Por isso foi testada a capacidade do método em reproduzir os resultados no momento em que se alterou o lote da coluna cromatográfica, utilizando diferentes lotes de colunas cromatográficas do mesmo tipo (o mesmo material de enchimento, mas com fases estacionárias de lotes diferentes).

E) Temperatura do forno

Como modificações cromatográficas no parâmetro robustez também foram avaliadas as condições de temperatura do forno da coluna cromatográfica de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.3.7 Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi verificada durante a validação do método, através dos seguintes parâmetros: Fator de cauda (T), pratos teóricos (N), fator de retenção (k') e precisão instrumental (repetibilidade das injeções).

4.5 Estudo de Estabilidade

As etapas preliminares para realização de estudos de estresse ocorrem com a seleção dos fatores de degradação que devem ser utilizados para os ensaios. Essa escolha teve como objetivo principal avaliar o teor residual de fármaco presente nas amostras após a degradação acelerada.

De um modo geral, esses objetivos são atingidos em estudos de degradação forçada, devendo ser conduzida, na maioria dos casos, em condições que induzam à decomposição alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica⁵⁹. A Tabela XII apresenta as condições iniciais nas quais nitrato de isoconazol creme foi submetido a diversas condições potenciais de degradação, a fim de se avaliar a influência de alguns fatores capazes de causar alterações físicas e químicas no produto.

Tabela XII: Ensaios realizados para degradação do produto, matéria-prima e branco.

Tipo de degradação	Tempo e Temperatura	Concentração
Fotólise	72 horas	-
Oxidativa	24 horas à temperatura ambiente em H ₂ O ₂	3% (V:V)
Hidrólise ácida	6 horas em HCl à temperatura de 50°C	0,1 M
Hidrólise alcalina	6 horas em NaOH à temperatura de 50°C	0,1 M

O acompanhamento da degradação das amostras foi realizado por CLAE em cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU, com bomba modelo LC20 AT, auto-injetor modelo SIL-20A e software LC Solution. Um forno modelo CT0-20 A foi utilizado para manter a temperatura a 45°C. A coluna cromatográfica utilizada foi a Stable Bond Fenyl® (250 mm x 4,6 mm x 5µm) (AGILENT). A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão trietilamina (1% (V/V) pH 2,9), metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano, na proporção de 4:3:2:2.

4.5.1 Fotólise

Este estudo tem como objetivo verificar a estabilidade do NI matéria-prima e na sua forma farmacêutica sob exposição à luz, de modo a demonstrar que a influência da mesma possa resultar em possíveis alterações significativas no produto.

4.5.1.1 Condições

Inicialmente, a amostra de NI creme foi submetida à fotólise por 72 horas em câmara climática em sua embalagem primária original (bisnaga de alumínio esmaltada). O branco e matéria-prima de nitrato de isoconazol creme foram expostos em vidro de relógio. Após, o preparo da solução amostra foi realizado de acordo com o item 4.4.2.4.

Como a forma farmacêutica creme é suscetível a perdas na sua formulação, devido principalmente à grande quantidade de água utilizada na manipulação, foi realizado um estudo no qual as amostras foram expostas no interior da câmara de fotoestabilidade em solução (diluyente) que permite uma maior penetrabilidade da luz e comparação à substância no estado sólido⁷. As amostras também foram envoltas em papel alumínio como amostras controle. Todas as amostras foram dispostas lado a lado, de modo a não formar sombra entre as mesmas.

4.5.1.1.1 Amostras em solução

Foram preparadas cinco amostras, no qual para cada uma, pesou-se 500 mg de creme (equivalente a 5 mg de nitrato de isoconazol) em Erlenmeyer com tampa ao qual foi adicionado cerca de 50 mL de diluyente. As amostras foram sonicadas em ultrassom a 40-45°C, até dissolução completa. Após, foram transferidas do Erlenmeyer para balão volumétrico de 100 mL. As soluções foram resfriadas à temperatura ambiente e então expostas em câmara de fotoestabilidade nos tempos 12, 24, 36, 48 e 60 horas, sendo que após os respectivos intervalos de tempo, completou-se o volume com o diluyente. A solução foi homogeneizada e filtrada para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial, obtendo-se concentração final de 50 µg mL⁻¹. Matéria-prima de NI e o branco foram preparados de maneira similar.

Amostras não armazenadas na câmara foram consideradas como tempo zero de exposição à fotólise, e submetidas ao mesmo tratamento das demais coletas de amostra. A solução padrão de NI SQT foi preparada na concentração de 50 µg mL⁻¹, conforme descrito no item 4.4.2.3.

A análise quantitativa das amostras de NI foi realizada através de CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 1, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de produtos de degradação.

A câmara de fotoestabilidade (TAG 429/CF – Nova Ética) foi devidamente qualificada (certificado NE 10/09) quanto ao seu desempenho, de modo que mantém um controle apropriado de temperatura a fim de minimizar os efeitos de alterações relacionadas a este fator. A câmara é dotada de duas fontes de luz: lâmpada branca fluorescente fria (similar à ISO 10977-1993) e lâmpada fluorescente ultravioleta (com espectro entre 320 – 400 nm). A duração da exposição recomendada pela ANVISA⁵ é de 43 horas, garantindo a incidência de luz sob o produto a não menos que 1,2 milhões de lux h⁻¹ e energia ultravioleta não menos que 200 W. h. m⁻².

4.5.2 Oxidativa

A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação³⁴.

4.5.2.1 Condições

4.5.2.1.1 Preparo da amostra de NI creme e branco

Transferiu-se exatamente cerca de 1000 mg de creme (equivalente a 10 mg de nitrato de isoconazol) para Erlenmeyer com tampa e foi adicionado cerca de 25 mL de diluente (fase móvel). A amostra foi sonicada em ultrassom a 40-45 °C, até dissolução completa. Resfriou-se a solução a temperatura ambiente e transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 100 mL com auxílio de 25 mL de fase móvel. Adicionou-se volumetricamente 50 mL de peróxido de hidrogênio 3% (V/V). A solução foi homogeneizada e a solução permaneceu em repouso por 24 horas à

temperatura ambiente, nas condições laboratoriais. Após, transferiu-se volumetricamente 5 mL para balão de 10 mL, completando-se o volume com diluente (fase móvel) e filtrando-se com filtro para seringa 0,45 µm de Teflon para vial, obtendo-se uma concentração final de 50 µg mL⁻¹ de nitrato de isoconazol. O branco foi preparado de maneira similar.

4.5.2.1.1 Preparo da matéria-prima NI

Transferiram-se exatamente cerca de 25 mg de nitrato de isoconazol para Erlenmeyer com tampa e foi adicionado cerca de 25 mL de diluente (fase móvel). A amostra foi sonicada em ultrassom até dissolução completa. Adicionou-se volumetricamente 25 mL de peróxido de hidrogênio 3% (V/V). A solução foi homogeneizada e a solução permaneceu em repouso por 24 horas à temperatura ambiente, nas condições laboratoriais. Após, transferiu-se volumetricamente 1 mL para balão de 10 mL, completando-se o volume com diluente (fase móvel) e filtrando-se com filtro para seringa 0,45 µm de Teflon[®] para vial, obtendo-se uma concentração final de 50 µg mL⁻¹ de nitrato de isoconazol.

A solução padrão de NI SQT foi preparada na concentração de 50 µg mL⁻¹, conforme descrito no item 4.4.2.4. A análise quantitativa das amostras de NI foi realizada através de CLAE, utilizando o sistema cromatográfico descrito na Tabela 1, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de produtos de degradação.

4.5.3 Hidrólise

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação. Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e sua estabilidade e da forma farmacêutica final não sejam comprometidas. Para avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação³⁰.

4.5.3.1 Hidrólise ácida

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida utilizou-se ácido clorídrico na concentração de 0,1 M.

4.5.3.1.1 Condições

4.5.3.1.1.1 Preparo da amostra de NI creme

A solução amostra de nitrato de isoconazol creme foi preparada em concentração de 50 µg mL⁻¹: cerca de 2500 mg de creme (equivalente a 25 mg de nitrato de isoconazol) foram pesados e transferidos para Erlenmeyer com tampa, seguido da adição de 20 mL de diluente (fase móvel). A amostra foi sonicada em ultrassom a 40-45 °C, até dissolução completa. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e foram adicionados volumetricamente 30 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M. Após 6 horas em refluxo a 50°C, a solução da amostra foi resfriada e transferida para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 15 mL de diluente (fase móvel). Em seguida, a solução foi neutralizada com adição volumétrica de 30 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, completando o volume com a fase móvel. Após homogeneização, 2 mL desta solução foram pipetados para balão de 10 mL, seguido de filtração com filtro para seringa 0,45 µm de Teflon[®] para vial. A amostra foi injetada em sistema HPLC. O branco foi preparado de maneira similar.

4.5.3.1.1.2 Preparo da matéria-prima de NI

Para o preparo da solução de NI matéria-prima, foram pesados cerca de 25 mg da SQT e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, seguido da adição de 15 mL de diluente (fase móvel). A amostra foi sonicada em ultrassom até dissolução completa. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, e foram adicionados volumetricamente 15 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M. Após 6 horas sob refluxo a temperatura de 50°C, a solução foi neutralizada com adição volumétrica de 15 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, completando o volume com a fase móvel. Após homogeneização, 1 mL desta solução foi pipetado para balão de 10 mL, seguido de filtração com filtro para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial, obtendo-se concentração final de 50 µg mL⁻¹ de NI. A amostra foi injetada em sistema HPLC.

Os resultados foram comparados com os da solução SQT não submetida à degradação, injetadas no sistema cromatográfico da mesma maneira. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico de NI. Os cromatogramas foram avaliados a fim de se detectar possíveis interferentes.

4.5.3.2 Hidrólise alcalina

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise alcalina utilizou-se hidróxido de sódio na concentração de 0,1 M.

4.5.3.2.1 Condições

4.5.3.2.1.1 Preparo da amostra de NI creme

A solução amostra de nitrato de isoconazol creme foi preparada em concentração de 50 µg mL⁻¹: cerca de 2500 mg de creme (equivalente a 25 mg de nitrato de isoconazol) foram pesados e transferidos para Erlenmeyer com tampa, seguido da adição de 20 mL de diluente (fase móvel). A amostra foi sonicada em ultrassom a 40-45 °C, até dissolução completa. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, e foram adicionados volumetricamente 30 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Após 6 horas em refluxo a 50°C, a solução da amostra foi resfriada e transferida para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 15 mL de diluente

(fase móvel) a solução foi neutralizada com adição volumétrica de 30 mL de ácido clorídrico 0,1 M, completando o volume com a fase. Após homogeneização, 2 mL desta solução foram pipetados para balão de 10 mL, seguido de filtração com filtro para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial. A amostra foi injetada em sistema HPLC. O branco foi preparado de maneira similar.

4.5.3.1.1.2 Preparo da matéria-prima de NI

Para o preparo da solução de NI matéria-prima, foram pesados cerca de 25 mg da SQT e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, seguido da adição de 15 mL de diluente (fase móvel). A amostra foi sonicada em ultrassom até dissolução completa. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, e foram adicionados volumetricamente 15 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Após 6 horas em refluxo a temperatura de 50°C, a solução foi resfriada e neutralizada com adição volumétrica de 15 mL de ácido clorídrico 0,1 M, completando o volume com a fase móvel. Após homogeneização, 1 mL desta solução foi pipetado para balão de 10 mL, seguido de filtração com filtro para seringa 0,45 µm de Teflon® para vial, obtendo-se concentração final de 50 µg mL⁻¹ de NI. A amostra foi injetada em sistema HPLC.

4.5.3.2.1.3 Preparo da amostra para controle de decaimento de teor

O estudo de estresse do fármaco em meio alcalino também foi realizado com cinco amostras preparadas conforme item 4.4.3.2.1.1 e analisadas por CLAE nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após armazenamento da solução amostra de NI creme em hidróxido de sódio 1 M, pois devido à instabilidade do fármaco neste meio, realizou-se um controle de decaimento de teor iniciando-se o estudo com condições mais amenas (menores tempos de reação), mas com a utilização de um meio reacional mais forte.

4.5.3.2.1.4 Determinação do ponto isobéptico

Com o objetivo de avaliar a possibilidade do surgimento de espécies interconvertíveis, foi realizada a leitura (espectrofotômetro ultravioleta na faixa de 200 a 800 nm) da amostra em condições normais de pH variando-se o pH em ambos sentidos (no intervalo de pH 1,0 a 12,0).

4.5.3.2.1.5 Avaliação da reversibilidade da solução amostra de nitrato de isoconazol creme

Foi realizada a análise da amostra de NI creme, com controle de pH da solução. A amostra preparada em condições conforme descrito no item 4.4.2.3 e de concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou pH de 4,4. Paralelamente foi preparada uma amostra e submetida à hidrólise alcalina, sendo então armazenada em NaOH 1 M durante o tempo de 6 horas. Posteriormente ao armazenamento, a solução foi neutralizada com HCl 1 M e apresentou pH de 6,6. Esta amostra foi, então, acidificada com H_3PO_4 até o valor de pH da amostra sem o degradante (pH 4,4), seguido de filtração com filtro para seringa $0,45 \mu\text{m}$ de Teflon® para vial, obtendo-se uma concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NI. A amostra foi injetada em sistema HPLC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise Qualitativa da SQT

5.1.1 Determinação da faixa de fusão

A determinação da faixa e do ponto de fusão são testes físico-químicos que auxiliam a identificação dos fármacos sem, contudo permitirem a conclusão definitiva da identidade dos compostos pesquisados. De acordo com a Farmacopéia Brasileira, estas análises fornecem informações do grau de pureza do produto em ensaio, sendo possível a constatação da presença de contaminantes através de alteração no valor obtido.

A faixa de fusão do nitrato de isoconazol foi determinada mediante a passagem de luz através do tubo capilar no momento em que iniciou e em que terminou a fusão do sólido. A Tabela XIII apresenta os valores das determinações da faixa de fusão (realizada em triplicata).

Tabela XIII: Valores obtidos na determinação da faixa de fusão do isoconazol.

Amostra	Faixa de Fusão (°C)
1	178,3 – 181,8
2	178,1 – 181,6
3	178,0 – 181,9
Média	178,1 – 181,7

Os valores obtidos encontram-se em acordo com a faixa de fusão de 178 – 182 °C estabelecida pela Farmacopéia Européia ¹⁶.

5.1.2 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho

O espectro de infravermelho permite determinar características estruturais da molécula através da análise das bandas características dos grupamentos químicos determinados no espectro. Certamente, a identificação de uma substância torna-se mais simples quando se compara o espectro da amostra em análise com o da substância de referência, uma vez que uma simples molécula pode originar um

complexo espectro.⁶⁰ As Figuras 5 e 6 apresentam o espectro na região do infravermelho da matéria prima e a sobreposição desta com a SQR, respectivamente.

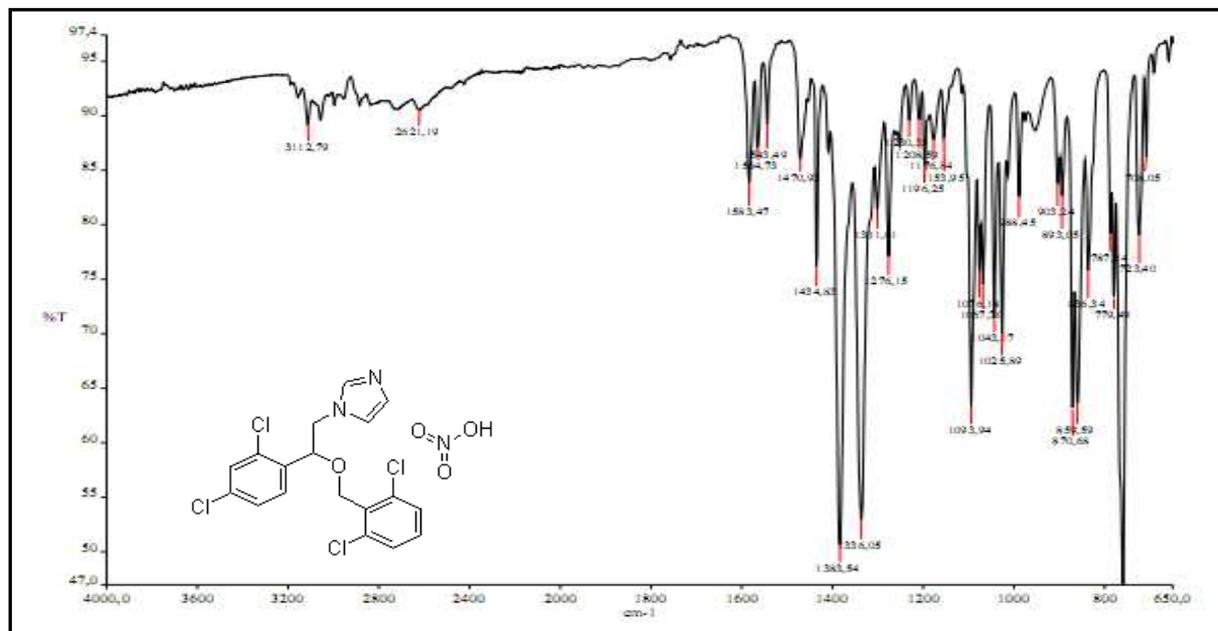


Figura 5: Espectro na região do infravermelho do nitrato de isoconazol SQT. Amostra pastilhada com KBr. Resolução: 4 cm^{-1} .

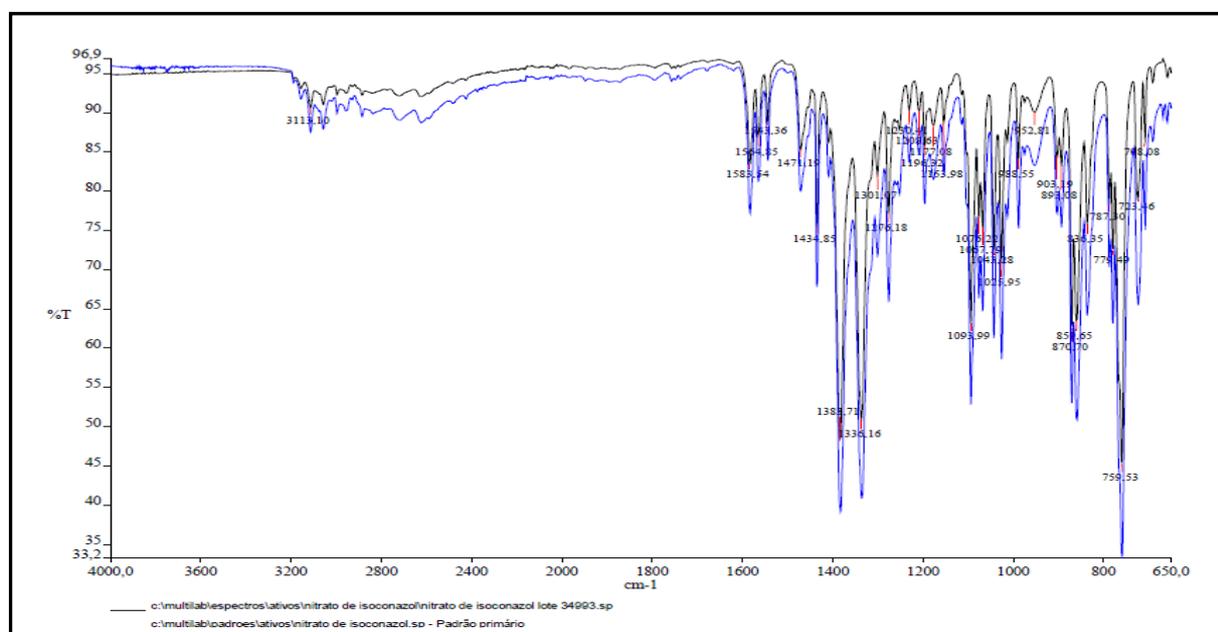


Figura 6: Sobreposição dos espectros da matéria prima (preto) e do nitrato de isoconazol SQR (azul) na região do infravermelho. Amostra pastilhada com KBr. Resolução: 4 cm^{-1} .

As atribuições das bandas características foram baseadas na literatura.^{11,12} A banda fraca na região de 3113 cm^{-1} refere-se aos estiramentos $\nu_{(\text{C-H})}$ de compostos aromáticos, enquanto as bandas de intensidade média na região de 1600 a 1400 cm^{-1} podem ser atribuídas às deformações axiais de $\delta_{(\text{C-C})}$ do anel aromático. As bandas de forte intensidade na região de 1330 cm^{-1} podem ser referentes à absorção de aminas aromáticas. O grupamento C-O-C dá origem às bandas de média intensidade na região de 1275 a 1020 cm^{-1} . Na faixa de 903 a 700 cm^{-1} encontram-se as deformações angulares atribuídas ao radical -CH fora do plano do anel aromático.

5.1.3 Cromatografia em Camada Delgada

Observou-se, conforme Figura 7, que a principal mancha no cromatograma obtido com a solução teste (solução metanólica 30 mg mL^{-1}) de nitrato de isoconazol (SQT) é similar em posição, cor e tamanho àquela mancha principal obtida com a solução referência A (solução metanólica 30 mg mL^{-1}) de nitrato de isoconazol (SQR). Conforme a especificação descrita na monografia, o teste só é válido se a solução referência B (solução metanólica 30 mg mL^{-1} de nitrato de isoconazol SQR e 30 mg mL^{-1} de econazol SQR) apresentar 2 manchas separadas (indicando a separação do isoconazol e econazol).

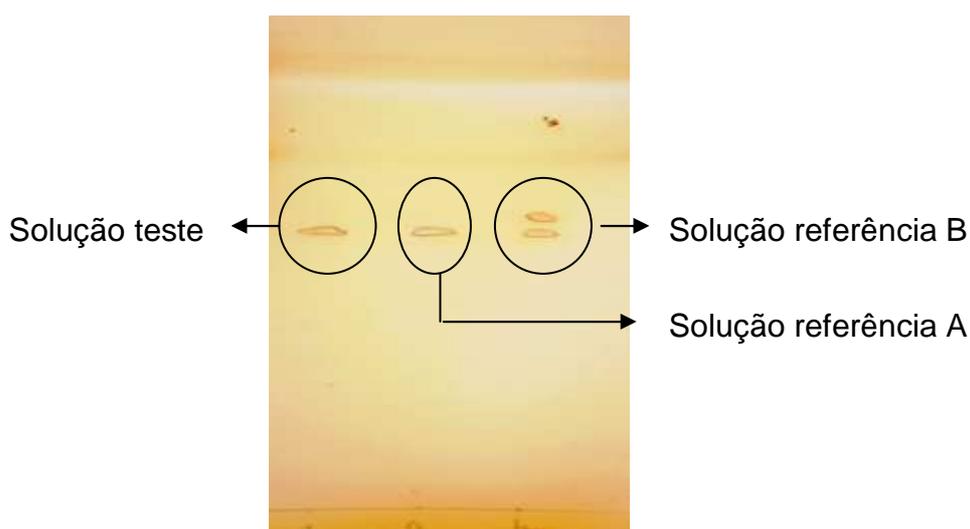


Figura 7: Imagem da cromatoplaca de sílica gel funcionalizadas com octadecilsilano com aplicação das soluções de referência A, B e solução teste.

5.1.4 Reação para determinação de nitratos

A identificação da presença de nitratos foi realizada a partir de reações com nitrobenzeno, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio e acetona, que resultam em complexos de cor violeta quando positivo. O inconveniente do teste é que qualquer substância simples que contenha o ânion nitrato interfere no resultado.

Na mistura de 0,1 mL de nitrobenzeno e 0,2 mL de H₂SO₄ colocou-se 10 mg de nitrato de isoconazol. A mistura foi reservada por 5 minutos e resfriada em banho de gelo. Após foi adicionado lentamente 5 mL de uma solução de NaOH 5 M e 5 mL de acetona. A camada superior após um tempo tornou-se violácea, indicando qualitativamente a presença de nitratos.

5.2 Análise Quantitativa da SQT

A Tabela XIV apresenta os valores encontrados na análise quantitativa do nitrato de isoconazol por potenciometria.

Tabela XIV: Valores obtidos na determinação do teor do nitrato de isoconazol SQT por potenciometria.

Amostra	Teor de isoconazol (%)
1	100,8
2	99,7
3	100,2
4	100,4
5	100,9
6	100,2
Média (%)	100,4
Desvio Padrão Relativo (%)	0,44

Os resultados encontraram-se dentro da especificação da farmacopéica, a qual permite uma variação entre 99,0 e 101,0%.

5.3 Validação de metodologia analítica para forma farmacêutica creme

5.3.1 Especificidade

A especificidade do método cromatográfico foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos, o que permite avaliar a possível interferência dos excipientes na determinação do nitrato de isoconazol (NI). A pureza de pico, determinada através da análise de uma amostra do creme, demonstrou estar dentro do limite aceitável, já que nenhuma impureza foi detectada e o índice de pureza obtido foi de 1,00, conforme Figura 8. As Figuras 9 a 11 apresentam os cromatogramas do padrão de trabalho utilizado na concentração de 100% do alvo estipulado, da amostra na matriz creme e do branco, respectivamente.

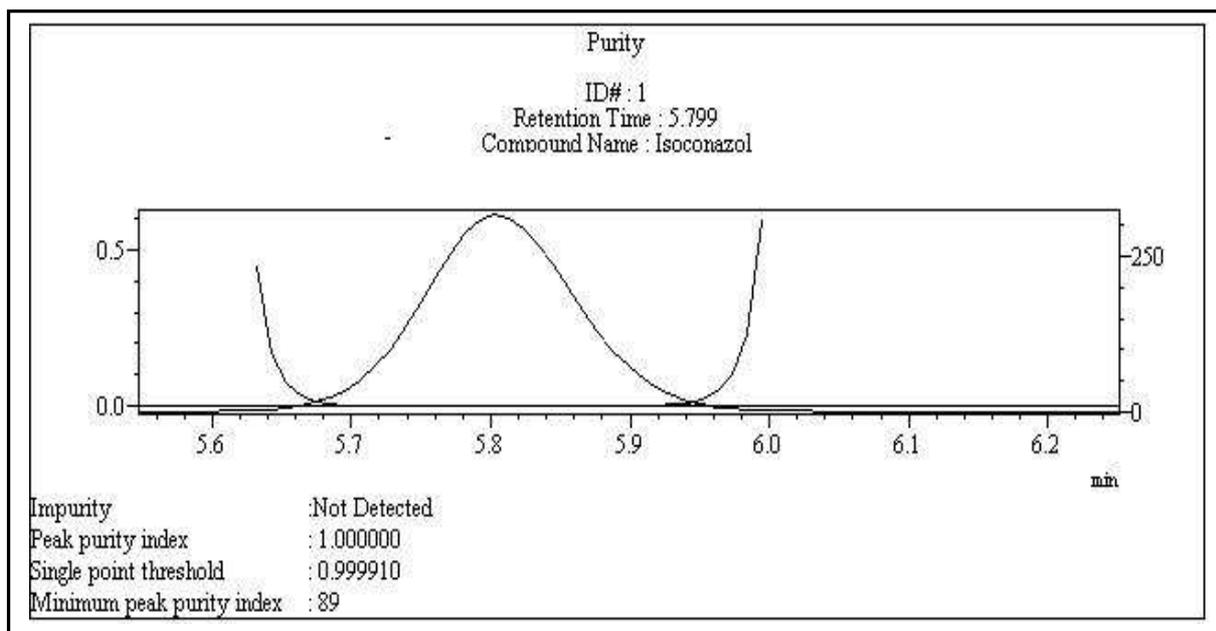


Figura 8: Pureza de pico referente à amostra do creme de nitrato de isoconazol

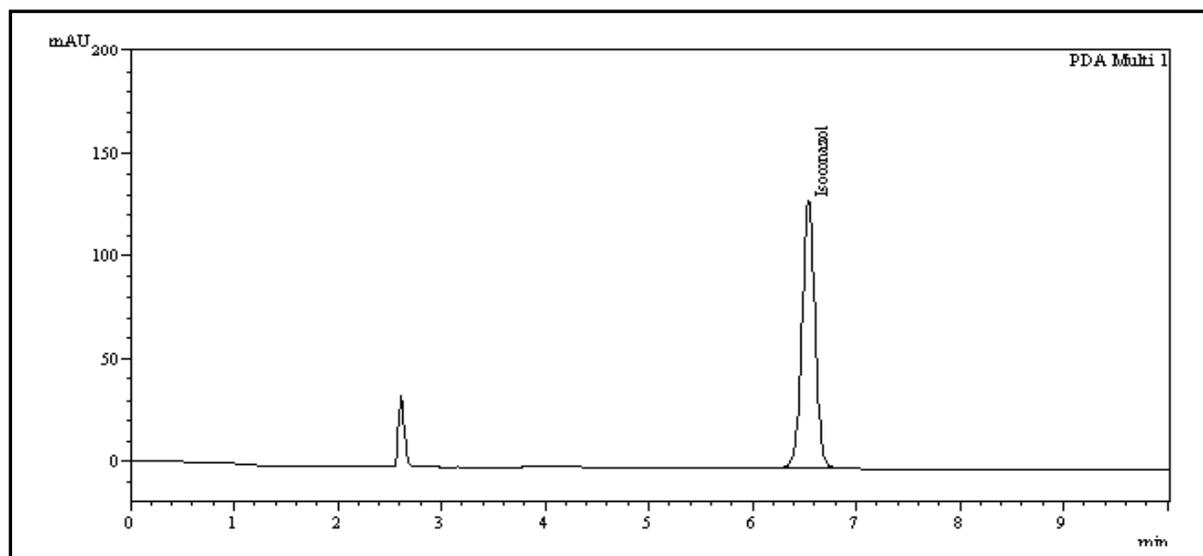


Figura 9: Cromatograma obtido da solução da SQT (dilúente fase móvel) de nitrato de isoconazol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) 250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm ; fase móvel: trietilamina 1% (V/V) (pH ajustado a 2,9 com H_3PO_4): metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo 1,0 mL min^{-1} ; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C.

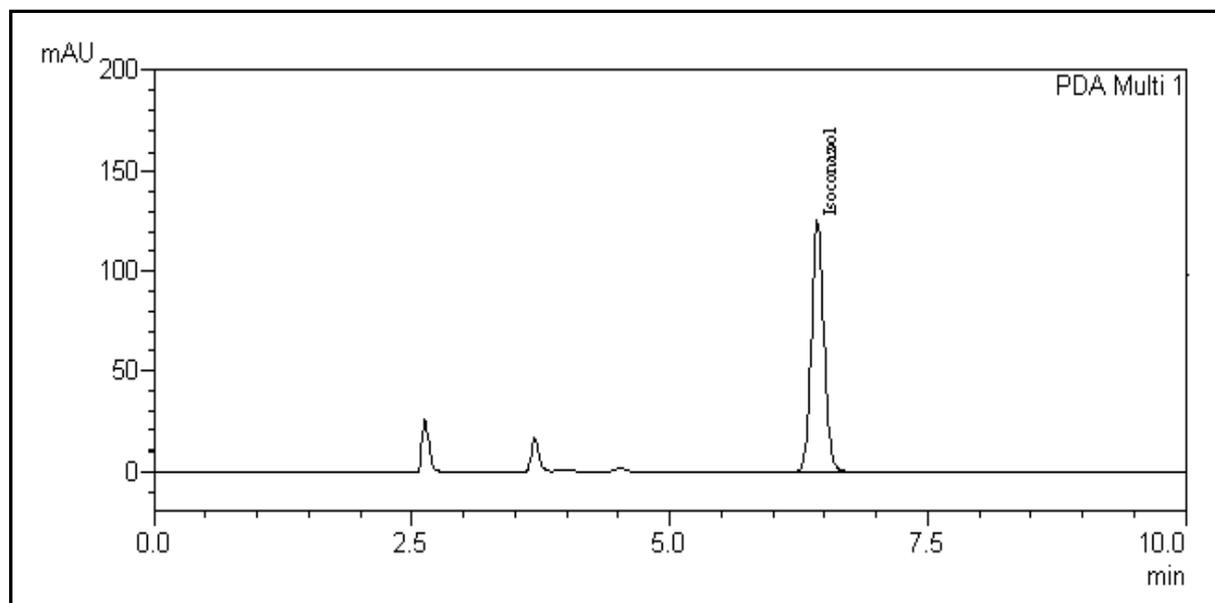


Figura 10: Cromatograma obtido da solução (dilúente fase móvel) amostra na forma farmacêutica creme ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NI). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) 250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm ; fase móvel: trietilamina 1% (V/V) pH

ajustado a 2,9 com H₃PO₄): metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo 1,0 mL min⁻¹; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C.

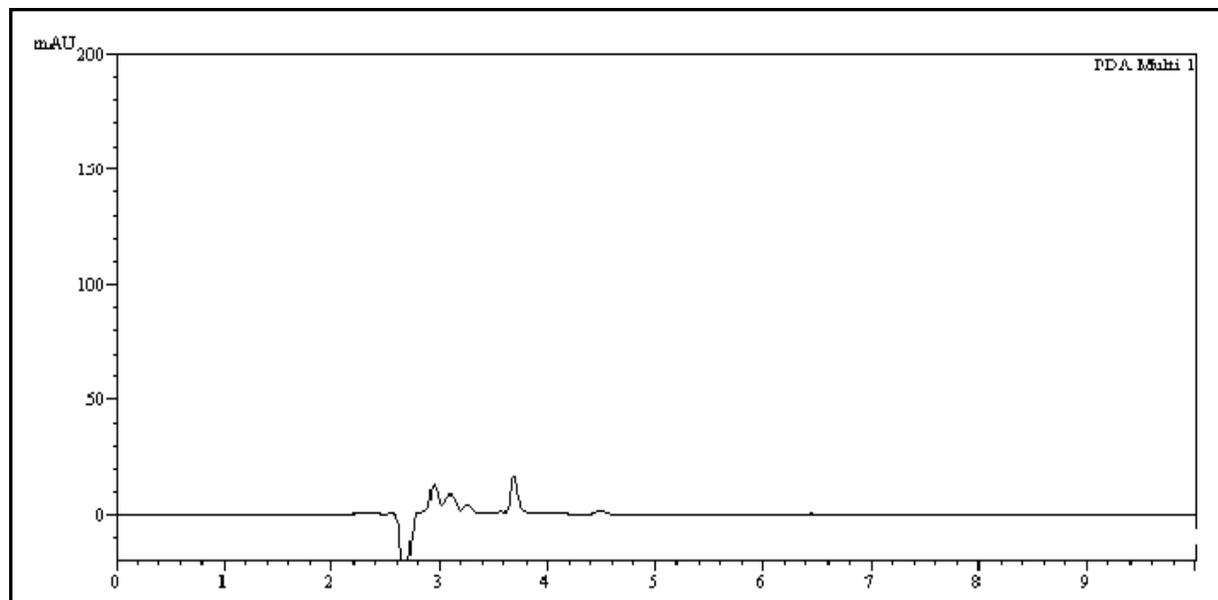


Figura 11: Cromatograma obtido da solução do branco (diluyente fase móvel) na forma farmacêutica creme (50 µg mL⁻¹ de NI). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) 250 mm x 4,6 mm x 5 µm; fase móvel: trietilamina 1% (V/V) (pH ajustado a 2,9 com H₃PO₄): metanol acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo 1,0 mL min⁻¹; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C.

Através da análise dos cromatogramas das soluções de SQT e da amostra simulada de excipientes, observou-se que o método proposto apresenta especificidade, já que não sofre interferência dos excipientes junto ao sinal do NI. A análise da pureza de pico do nitrato de isoconazol, realizada pelo detector de arranjo de diodos foi de 1,000 (Figura 8), indicando que não há outros compostos coeluinto com o fármaco. O conjunto de resultados apresentado permitiu inferir a especificidade do método desenvolvido.

No teste de especificidade qualitativo foram preparadas soluções (conforme descrito em 4.4.3.1.2.1) de fármacos com estruturas relacionadas e características físico-químicas similares ao nitrato de isoconazol (ex. miconazol, clotrimazol, cetoconazol), para demonstrar a capacidade de seleção do método. Conforme apresentado na Figura 12, o composto miconazol, da família dos imidazóis que

possui estrutura mais semelhante, eluiu em tempo de retenção diferente do obtido com a análise da solução de isoconazol, obtendo-se valor de resolução de 5, quando o critério de aceitação para adequação e conformidade do sistema por CLAE é de no mínimo 2.

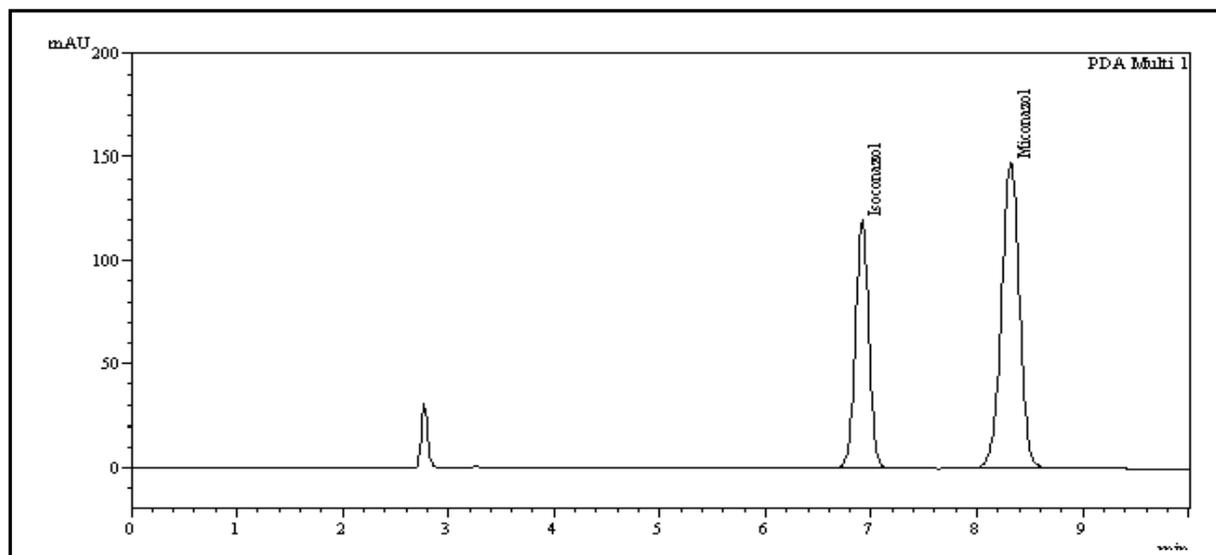


Figura 12: Cromatograma obtido da solução (diluído fase móvel) SQT de isoconazol e miconazol ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna HPLC SB fenil (USP L11) 250 mm x 4,6 mm x 5 μm ; fase móvel: trietilamina 1% (V/V) pH ajustado a 2,9 com H_3PO_4 ; metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4); fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; detecção UV 225 nm; temperatura do forno: 45°C .

5.3.2 Linearidade: Curva de calibração

A Tabela XV apresenta os resultados das áreas dos sinais cromatográficos (HPLC) para as concentrações de 25,0 a $75,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ da concentração usual de análise do padrão sintético avaliado, faixa que corresponde a 50 a 150 % de nitrato de isoconazol. A representação gráfica da curva padrão do nitrato de isoconazol SQT, obtida pela técnica de CLAE, encontra-se na Figura 13.

Tabela XV: Dados analíticos para curva de calibração do doseamento de NI.

Intervalo (%)	Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Média das Áreas (u.a.)	DPR (%)
50	25	502856	0,51
60	30	603460	1,11
70	35	696487	0,10
80	40	810419	0,47
90	45	899034	0,39
100	50	993659	0,71
110	55	1098174	0,09
120	60	1204940	0,33
130	65	1317975	1,74
150	75	1494289	0,52

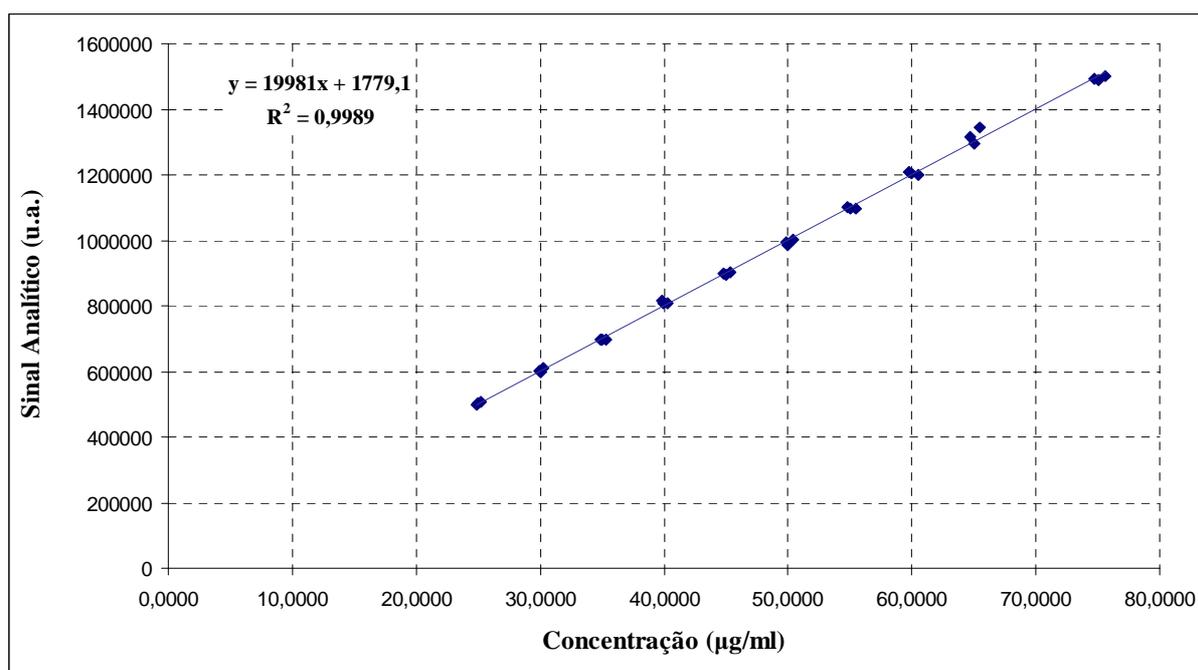


Figura 13: Representação gráfica da regressão linear do método de doseamento obtida na análise de linearidade da SQT através do software LC Solution – Shimadzu

A Figura 14 representa a distribuição dos resíduos associados às concentrações empregadas para a obtenção da curva de calibração. A diferença entre a reta ajustada e a observação realizada corresponde ao resíduo. De acordo

com a Figura 14, a distribuição de resíduos encontra-se bem dispersa entre os valores de concentração, sugerido que é fenômeno de alavancagem⁵³ pode ser descartado.

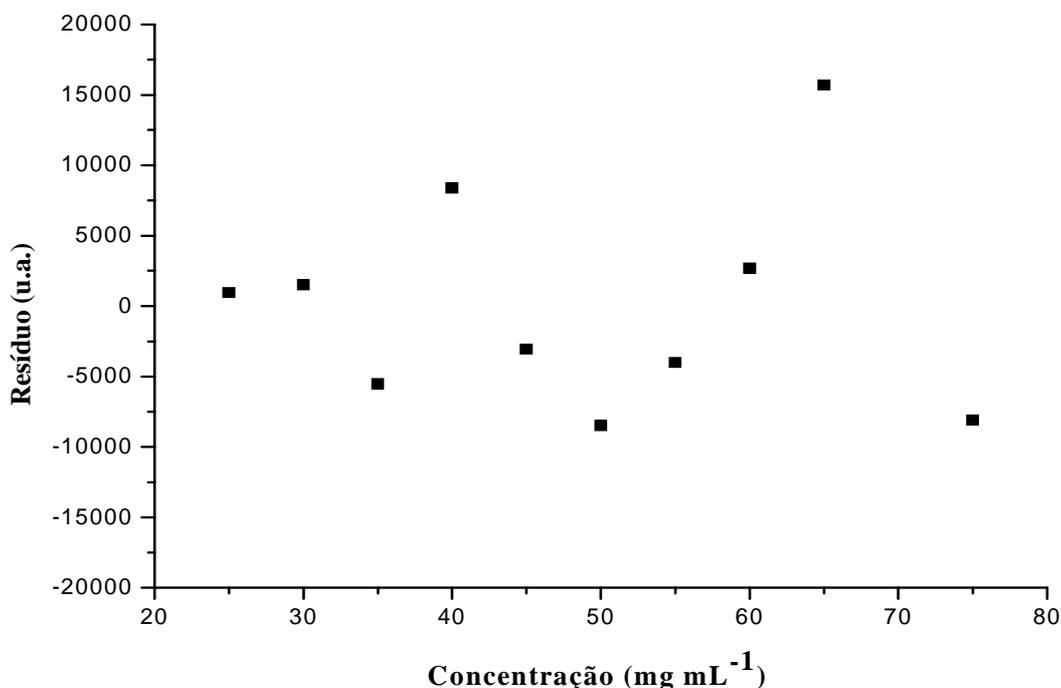


Figura 14: Representação gráfica dos resíduos na faixa de concentração empregada no método de doseamento obtida na análise de linearidade da SQT através do software LC Solution – Shimadzu.

5.3.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados pelas equações descritas no item 4.4.3.3, com os dados da linearidade. Para o cálculo foram utilizados o coeficiente de correlação (ou regressão) linear e o desvio padrão do intercepto, ambos obtidos da curva padrão média. Então, considerando-se esses dados, estimou-se que: LD = 3,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e LQ = 11,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.3.4 Exatidão: Teste de recuperação

De acordo com o ICH⁵⁶, a exatidão para produto acabado pode ser expressa como percentual de recuperação. Tais dados foram obtidos pelo doseamento de soluções da amostra creme adicionadas de quantidades conhecidas da SQT. A Tabela XVI mostra os valores de recuperação obtidos a partir da relação entre a concentração declarada (nominal) e a concentração real obtida para doseamento de isoconazol creme. A recuperação média obtida foi de 102,08 %, demonstrando que o método desenvolvido por CLAE é exato para a determinação do teor do fármaco em creme.

Tabela XVI: Percentual de recuperação obtida nas diferentes concentrações – Doseamento de isoconazol creme.

Concentração (%)	Conc. Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Area média (u.a.)	Conc. recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
80	40,80	906951	40,2	98,03
80	40,80	962348	42,5	103,76
80	40,80	938609	41,5	101,23
100	51,00	1188174	52,1	101,68
100	51,00	1218531	53,4	104,19
100	51,00	1201022	52,6	102,74
120	61,20	1421353	61,9	100,80
120	61,20	1467640	63,9	103,99
120	61,20	1443445	62,9	102,32
Média				
Recuperação (%)		102,08		
*DP		1,95		
*DPR (%)		1,91		

*DP: desvio padrão **DPR: desvio padrão relativo

Observou-se que o método desenvolvido apresenta exatidão, visto que o valor de DPR obtido foi de 1,91 % para o teor.

5.3.5 Precisão (Repetibilidade)

A repetibilidade foi avaliada pelo desvio-padrão relativo (DPR) entre as seis amostras analisadas no mesmo dia, com o mesmo equipamento, mesmo analista e mesmas condições ambientais, sendo também utilizados como critério de aceitação os desvios-padrão relativos entre as triplicatas e o teor de recuperação entre 90 e 110 %. Os resultados da repetibilidade são mostrados na Tabela XVII.

Tabela XVII: Doseamento de seis preparações de creme de isoconazol e seus desvios (Equipamento 1: HPLC Shimadzu Proeminence DAD).

Preparações	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Area média (u.a.)	Resultado (%)
1	52,70	1153507	101,51
2	49,50	1084881	100,03
3	49,60	1087570	100,25
4	51,00	1116148	100,63
5	51,00	1117981	101,57
6	52,30	1144885	101,52
Média	51,00	1117495	100,92
*DP	0,64	-	-
**DPR (%)	0,63	-	-

*DP: desvio padrão **DPR: desvio padrão relativo

O método proposto para análise do produto na matriz creme apresenta repetibilidade, visto que o desvio padrão relativo (DPR) das concentrações médias de isoconazol foi de 0,63 % para a amostra, quando o critério de aceitação é de $\leq 5,0$ %.

5.3.6 Precisão Intermediária

Os resultados da precisão intermediária são mostrados na Tabela XVIII.

Tabela XVIII: Doseamento de 6 (seis) preparações de creme dermatológico de isoconazol e seus desvios (Equipamento 2: HPLC Hitachi DAD Elite LaChrom).

Preparações	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Area média (u.a.)	Resultado (%)
1	49,4	4490260	100,72
2	52,2	4743484	100,66
3	51,8	4682647	103,79
4	51,7	4628408	99,17
5	52,1	4679922	103,75
6	51,3	4644439	102,96
Média	51,4	4644860	101,84
*DP	1,76	-	-
*DPR (%)	1,72	-	-

*DP: desvio padrão **DPR: desvio padrão relativo

Na Tabela XIX está apresentada a diferença entre as análises obtidas entre dias, com diferentes equipamentos.

Tabela XIX: Comparação das análises (entre dias e diferentes equipamentos)

Equipamento	Resultado (%) entre dias
1 HPLC Shimadzu	100,92
2 HPLC LaChrom Elite	100,48
Média	100,70
DP	1,03
DPR (%)	1,02

*DP: desvio padrão **DPR: desvio padrão relativo

De acordo com a Tabela XIX, observa-se diferença significativa entre os valores de área obtidos nos dois diferentes equipamentos (Shimadzu e Elite LaChrom). Isso pode ser atribuído às diferenças entre lâmpadas, conexões, tubulação, etc. No entanto, não houve diferença significativa entre os tempos de retenção (LaChrom aproximadamente 5,4 minutos e Shimadzu aproximadamente 5,8 minutos).

Os resultados da Precisão Intermediária estão de acordo com a RE n° 899 da ANVISA, uma vez que o desvio padrão relativo (1,72 e 1,19 %) foi inferior ao valor estabelecido pela respectiva norma, que deve ser no máximo de 5 %. O desvio padrão relativo entre dias e equipamentos foi de 1,02 %.

5.3.7 Robustez

Verificou-se que em todas as condições empregadas os parâmetros cromatográficos estiveram de acordo com as recomendações vigentes e que não houve discrepância entre os teores observados.

Os resultados estão apresentados nas Tabelas XX, XXI e XXII.

Tabela XX: Avaliação da estabilidade das amostras

Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média (u.a.)	Teor (%)
Nitrato de isoconazol creme tempo 0 horas	50,3	1235576	101,60
Nitrato de isoconazol creme tempo 24 horas	50,3	1204922	101,20

A solução de nitrato de isoconazol creme manteve-se estável após armazenamento durante 24 horas em temperatura e luz ambiente e não foram evidenciados picos secundários.

Tabela XXI: Análise quanto ao uso de diferentes filtros

Filtro	Area média (u.a.)	Teor (%)
Nylon [®]	4443536	105,40
Celulose Regenerada	4493858	106,34
Teflon [®]	4430045	104,82
Poliestireno	4414552	104,45
PVDF (fluoreto polivinidileno)	4459106	105,51
Polietersulfônico	4384889	103,74

Conforme os resultados obtidos, não houve discrepância nos teores, comparados àquele obtido com a amostra filtrada em celulose regenerada. Foi utilizada a membrana de politetrafluoretileno (PTFE), de nome comercial Teflon[®], por apresentar características quimicamente estáveis e inertes e indicadas para aplicação em filtrações que envolvam solventes orgânicos agressivos.

Tabela XXII: Variações nos parâmetros cromatográficos para determinação de robustez.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Area média (u.a.)	Teor (%)
Sem alteração *	51,3	1166550	105,40
Fluxo 0,9 mL min ⁻¹	51,3	1233528	106,34
Fluxo 1,1 mL min ⁻¹	51,3	1012714	104,82
Adição de 5 % de metanol na fase móvel	51,3	1115615	104,45
Temperatura do forno (40°C)	51,3	1119833	105,51
Diferente lote de Coluna **	51,3	1148177	103,74

* Fase móvel tampão: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4), fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura do forno de 45 °C e comprimento de onda de 225 nm, volume de injeção de 10 μL e coluna Sb-Fenil Stable Bond 4,6 x 250 mm x 5 μm , Agilent, lote B08048; ** Coluna Sb-Fenil Stable Bond 4,6 x 250 mm x 5 μm , Agilent, Lote B08084.

Verificou-se estatisticamente através da análise de variância ANOVA que não há diferença significativa entre os resultados. O método apresentou-se robusto, não existindo, em nível de 95% de confiança variação estatisticamente significativa quanto às modificações.

5.3.8 Adequabilidade do sistema

Na Tabela XXIII estão apresentados os resultados dos parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico, bem como os valores preconizados pelo FDA.

Tabela XXIII: Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos

Parâmetro	Recomendação	NI (HPLC Shimadzu)	NI (HPLC LaChrom Elite)
Fator de retenção (k)	k > 2	2,62	2,50
Assimetria (T)	T ≤ 2	0,96	1,06
Pratos teóricos (N)	N > 2000	7890	8560

Todos os parâmetros testados, conforme mostrado na Tabela XXIII apresentaram valores de acordo com o recomendado.

O método desenvolvido, através da cromatografia líquida com detecção por absorção em 225 nm, utilizando a fase móvel como diluente, mostrou-se sensível, linear, preciso e exato para análise quantitativa de nitrato de isoconazol creme. A presença dos excipientes contidos na formulação testada não interfere com o pico de interesse, o que foi indicado pela pureza do pico do fármaco. Neste aspecto, o detector de arranjo de diodos foi de fundamental importância, pois permitiu verificar se compostos de polaridade semelhante não estariam coeluinto com o fármaco.

A análise de regressão linear forneceu a equação de reta $Y = 20009,71x + 1662,99$, com coeficiente de correlação de 0,9998.

O método mostrou-se exato e preciso, uma vez que seu percentual de recuperação médio foi de 102,08% e os valores de DPR foram de aproximadamente 1,80%.

Em acordo com o apresentado, concluiu-se que a validação da metodologia analítica do nitrato de isoconazol creme é aplicável para qualquer fabricante de medicamento que queira assegurar seus resultados, garantida a eficácia do princípio ativo que é largamente utilizado em processos antifúngicos.

A técnica analítica apresentou parâmetros de validação condizentes com recomendações internacionais e com a legislação sanitária vigente no país⁵⁰.

5.4 Estudo de Estabilidade

5.4.1 Fotólise

A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética. A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade das drogas utilizadas como medicamentos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes⁶¹.

5.4.1.1 Exposição das amostras acondicionadas na embalagem original

Na decomposição fotolítica, a percentagem residual do fármaco presente nas amostras do creme, armazenadas em câmara climática por 72 horas, manteve-se constante no final do tempo especificado para a amostra, matéria-prima e branco de NI, considerando a faixa de recuperação da amostra que abrange valores de 90% a 110% do fármaco. A Tabela XXIV descreve as concentrações do fármaco obtidas para as amostras testadas.

Tabela XXIV: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetida à fotólise durante 72 horas.

Amostra	Concentração Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resultado
Padrão NI SQT 100%	51,00	-
Amostra NI creme	54,75	101,14 %
Matéria-prima	51,96	96,87 %

Os cromatogramas encontram-se representados nas Figuras 15 a 17.

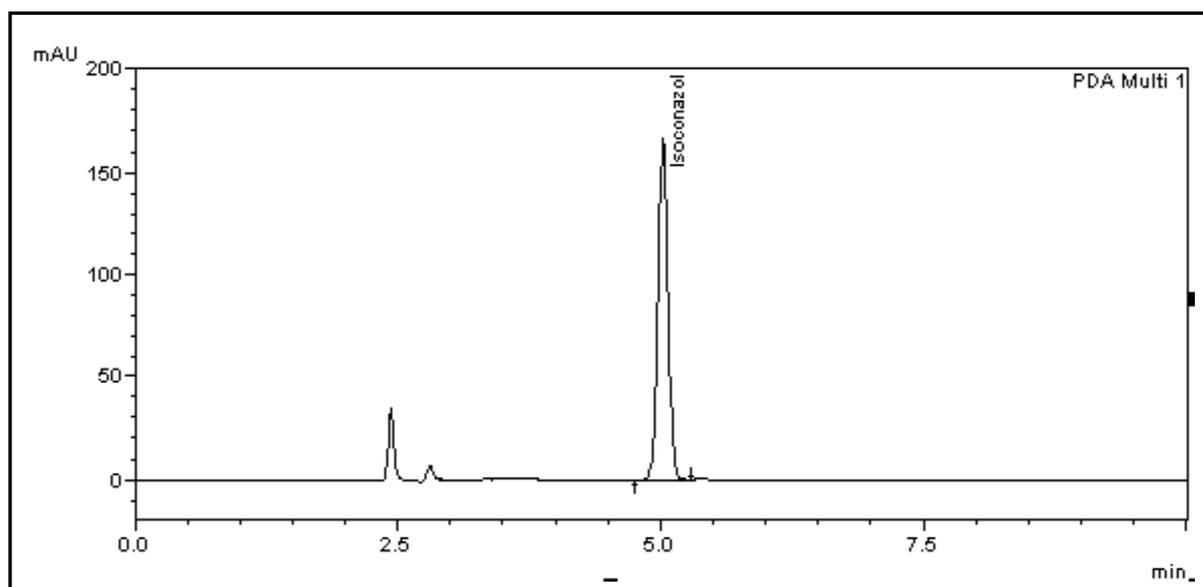


Figura 15: Cromatograma obtido através da análise do padrão de nitrato de isoconazol. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de 1,0 mL min^{-1} , coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 μm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 μL , temperatura de análise: 45 $^{\circ}\text{C}$.

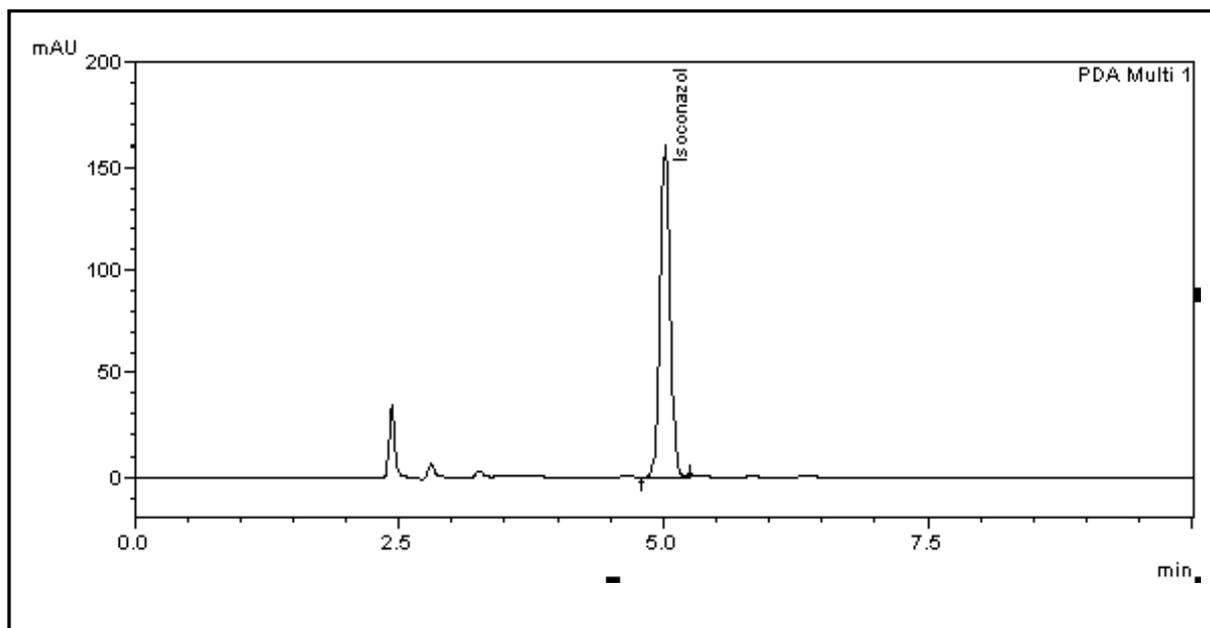


Figura 16: Cromatograma obtido através da análise da amostra de nitrato de isoconazol creme após fotólise. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 μm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 μL , temperatura de análise: 45°C.

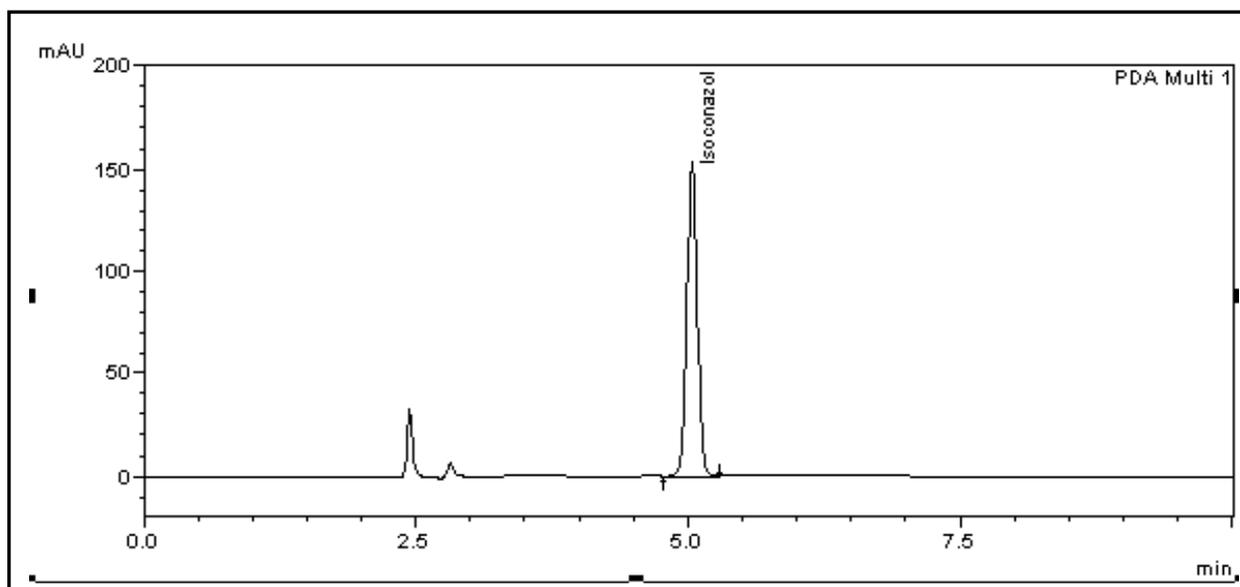


Figura 17: Cromatograma obtido através da análise da matéria-prima nitrato de isoconazol após fotólise. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 μm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 μL , temperatura de análise: 45 °C.

5.4.1.2 Condições empregadas na fotólise

Para o estudo da fotólise as amostras foram mantidas em câmara de fotoestabilidade sob uma lâmpada branca fluorescente fria e uma lâmpada fluorescente ultravioleta, da seguinte forma: pesadas previamente e dissolvidas no diluente, sendo após seus respectivos tempos de análise, completadas ao volume com diluente, obtendo-se a concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras também foram envoltas em papel alumínio como amostras controle.

O teor de NI em quantidades conhecidas da amostra, amostra controle, matéria-prima e branco em solução (diluente) após exposição e ao final de cada tempo foi determinado por CLAE. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas XXV, XXVI e XXVII.

Tabela XXV: Valores experimentais obtidos no estudo de fotólise das soluções de NI creme, obtidas por CLAE.

Tempo (horas)	Teor (%)*	DPR
0	98,91	0,13
12	98,67	0,20
24	98,81	0,37
36	98,41	0,12
48	98,72	0,26
60	97,70	0,33

* Cada valor representa a média de duas determinações

Tabela XXVI: Valores experimentais obtidos no estudo de fotólise das soluções de matéria-prima de NI, obtidas por CLAE.

Tempo (horas)	Teor (%)*	DPR
0	100,33	0,27
12	100,40	0,39
24	100,56	0,19
36	99,78	0,42
48	99,33	0,29
60	86,53	0,36

* Cada valor representa a média de duas determinações

Tabela XXVII: Valores experimentais obtidos no estudo de fotólise das soluções da amostra controle de NI creme, obtidas por CLAE.

Tempo (horas)	Teor (%)*	DPR
0	99,02	0,25
12	98,82	0,36
24	98,90	0,58
36	98,67	0,63
48	98,66	0,52
60	98,99	0,63

* Cada valor representa a média de duas determinações

Os resultados obtidos mostraram que as amostras de NI em solução diluente testadas sob exposição às lâmpadas branca fluorescente fria e fluorescente ultravioleta não apresentaram significativo decaimento de teor (menor que 2,0 %) em 60 horas, o qual equivale a um tempo superior ao prazo de validade da amostra, que corresponde a 43 horas (equivalente a dois anos). A comparação das concentrações obtidas entre as amostras referentes ao tempo zero (amostra não submetida à radiação) e a que foi submetida a 60 horas de luz, sugere estabilidade da amostra frente às condições de fotólise. A Figura 18 mostra o cromatograma após 60 horas de exposição à radiação.

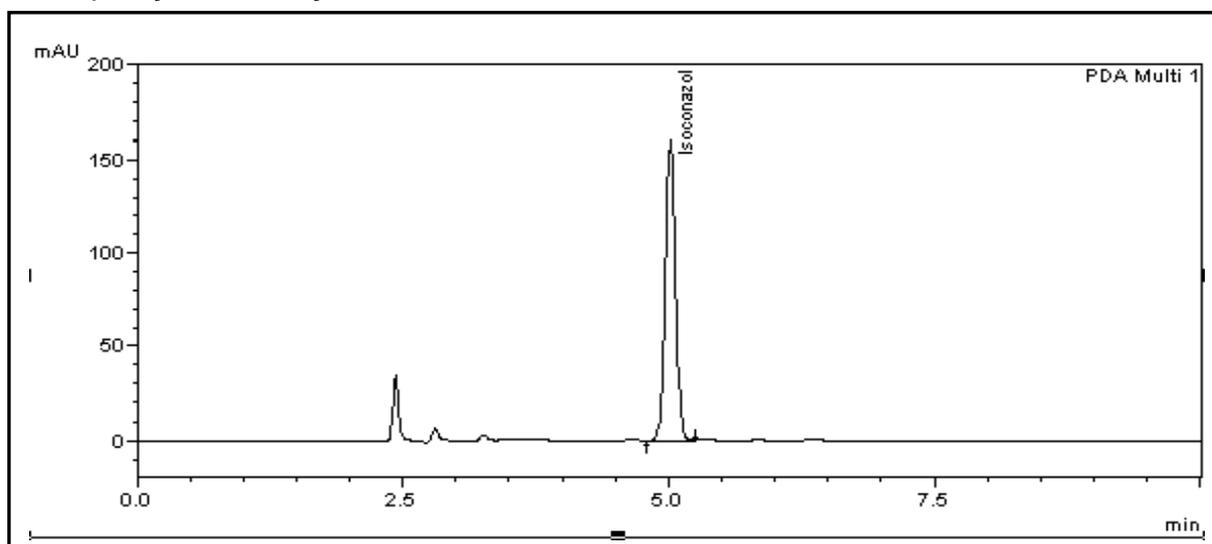


Figura 18: Cromatograma obtido através da análise da amostra nitrato de isoconazol creme após fotólise durante período de 60 horas. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9; metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de 1,0 mL min⁻¹, coluna Agilent®

Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45 °C

Na análise da pureza dos picos (Figura 19) verificou-se que a amostra exposta durante o tempo máximo testado (60 horas) possui o mesmo espectro de absorção na faixa de 200 a 800 nm da amostra que não sofreu hidrólise, pois em toda a extensão de um pico, vários espectros de UV/visível são adquiridos, conforme indica a Figura 20, que demonstra, através do software do detector de arranjo de diodos, o espectro em diferentes posições do pico e permite compará-lo com outras posições, confirmando a presença de um único componente, pois os espectros são similares, bem como apresentar pureza de pico de 0,999995, indicando ser um pico cromatográfico puro.

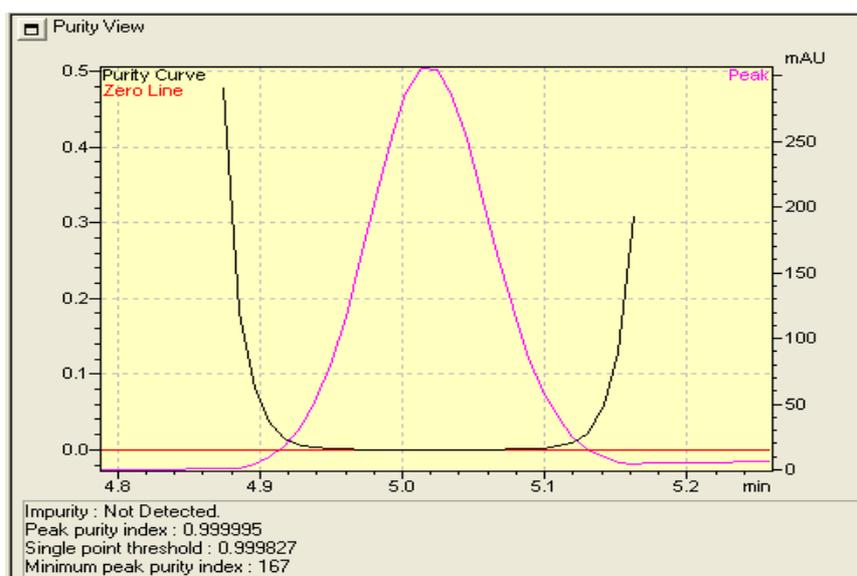


Figura 19: Gráfico de pureza de pico referente ao pico de nitrato de isoconazol solução amostra após fotólise.

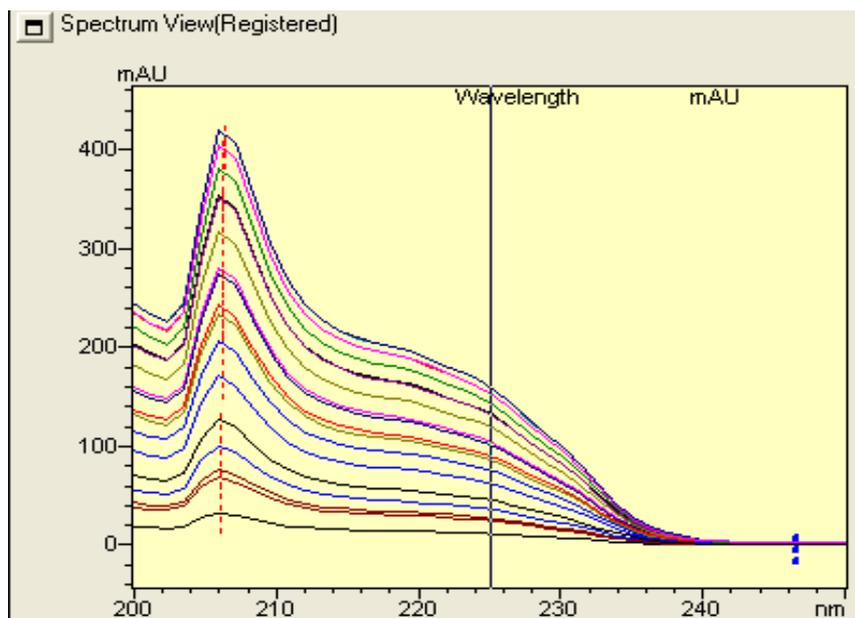


Figura 20: Gráfico de pureza de pico referente ao pico de nitrato de isoconazol solução amostra após fotólise.

5.4.2 Oxidativa

A estabilização de fármacos frente a condições oxidativas envolve a observação de um número de precauções durante a manufatura e estocagem. O oxigênio em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono; assim como o contato com íons de metais pesados, que catalisam a oxidação deve ser evitado e a estocagem deve ser a temperaturas reduzidas³⁴.

A Tabela XXVIII apresenta os resultados do estudo realizado com o armazenamento do produto NI na forma de creme e da matéria-prima de NI em peróxido de hidrogênio 3% por 24 horas. O cromatograma referente à amostra de NI degradada está representado na Figura 21.

Tabela XXVIII: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetido à hidrólise oxidativa durante 24 horas

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resultado (%)
Padrão 100%	51,00	-
Matéria-prima de NI	53,10	101,63 %
Amostra de NI creme	52,20	96,88 %

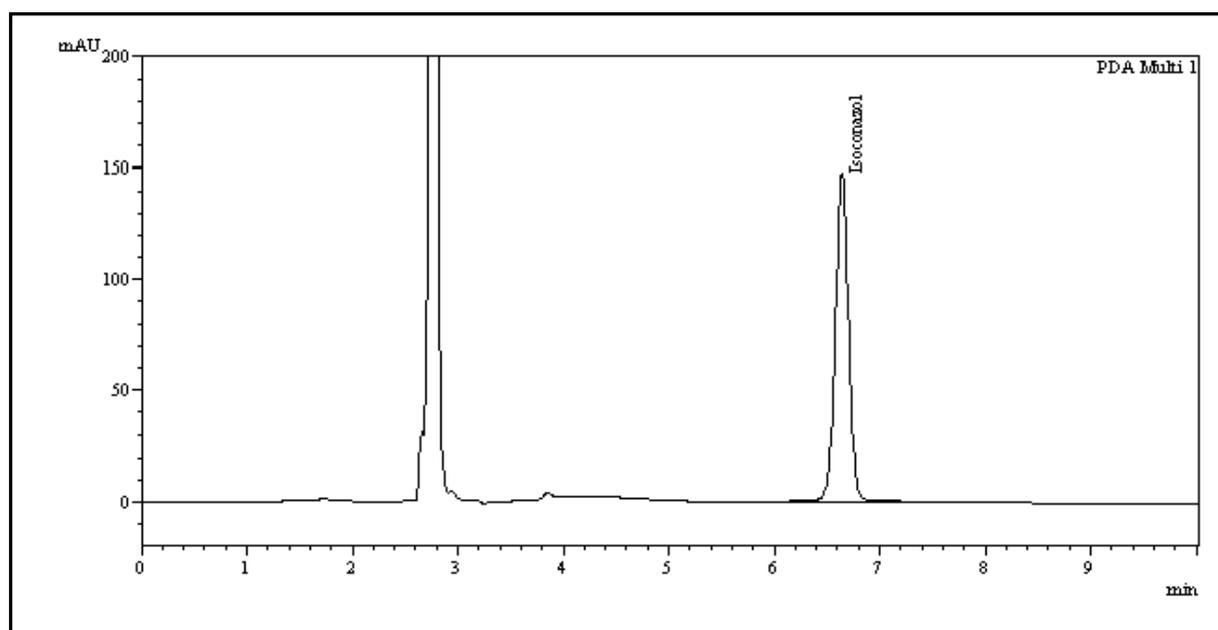


Figura- 21: Cromatograma obtido através da análise da amostra de NI na forma creme após hidrólise oxidativa. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (v/v) pH 2,9; metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 x 4,6 mm x 5 μm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 μL , temperatura de análise: 45°C.

No tempo de retenção de aproximadamente 2,5 minutos é observado um pico com elevada absorção, o qual é atribuído ao conservante utilizado no peróxido de hidrogênio. Após 24 horas de reação oxidativa, o teor da amostra de NI creme foi reduzido para cerca de 97 %. Não foi observado, porém, o aparecimento de picos secundários correspondentes a produtos de degradação. No entanto, para a matéria-prima de NI, o teor obtido foi de 101,63%, não apresentando, portanto, redução de teor após 24 horas de reação.

5.4.3 Hidrólise ácida

O fármaco e a forma farmacêutica creme, submetidos ao meio ácido durante 6 horas, não apresentaram picos sugestivos de degradação (Figuras 22 e 23). Além disso, não foi observada redução do teor do fármaco em SQT e em creme. A Tabela XXIX apresenta os resultados.

Tabela XXIX: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetidos à hidrólise ácida durante 6 horas.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resultado (%)
Padrão 100%	51,00	-
Matéria-prima de NI	52,00	100,39
Amostra de NI creme	50,65	101,52

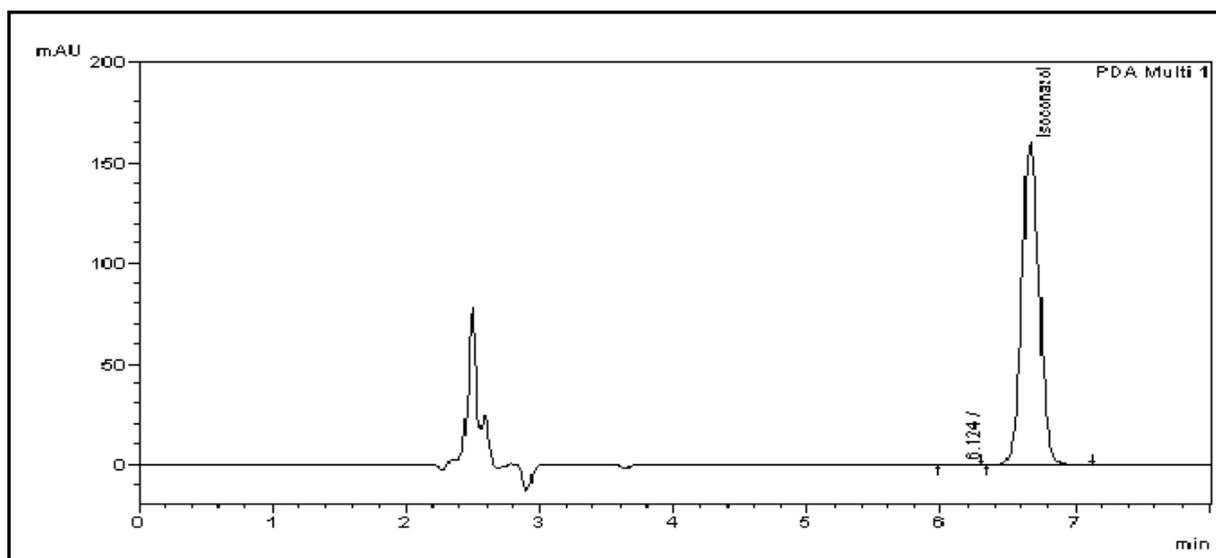


Figura- 22: Cromatograma obtido através da análise da amostra na forma creme após hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9 metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 x 4,6 mm x 5 μm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 μL , temperatura de análise: 45 $^{\circ}\text{C}$.

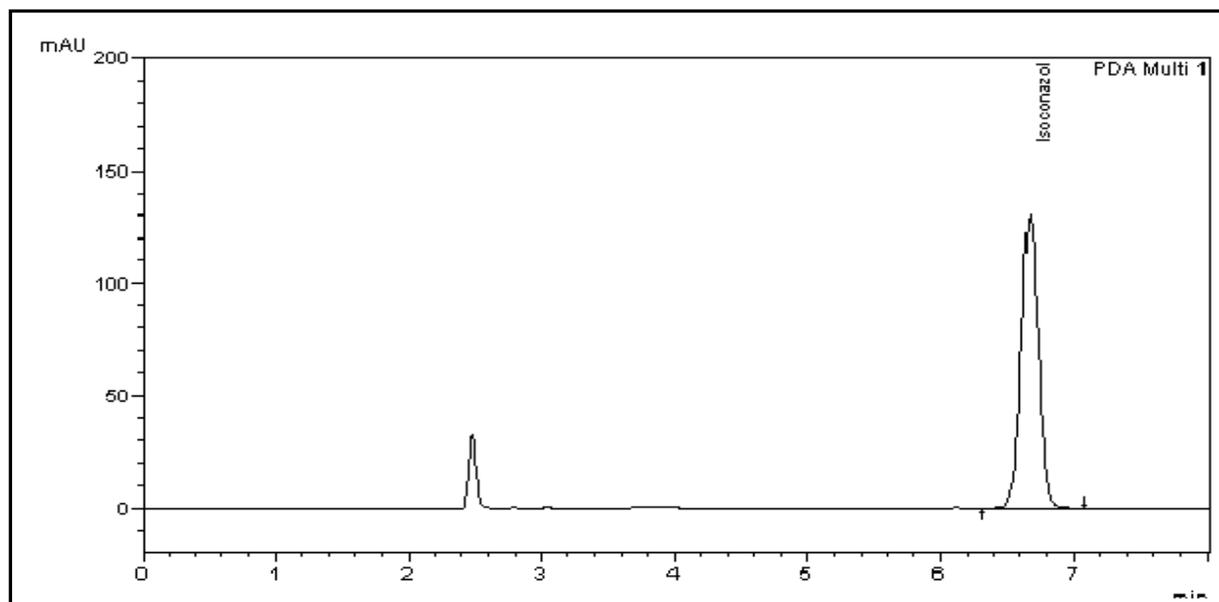


Figura- 23: Cromatograma obtido através da análise da matéria-prima de NI após hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9 metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de 1,0 mL min⁻¹, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm x 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µl, temperatura de análise: 45°C.

5.4.4 Hidrólise alcalina

O estudo de estresse do fármaco em meio alcalino com armazenamento do NI na forma creme e da matéria-prima em hidróxido de sódio 0,1 M após um período de 6 horas foi possível observar o decaimento do teor do fármaco para ambas as amostras: produto na forma creme e matéria-prima, conforme apresenta a Tabela XXX. As Figuras 24 e 25 apresentam, respectivamente, os cromatogramas da solução amostra de NI creme e da solução da matéria-prima de NI.

Tabela XXX: Valores do teor de NI na matéria-prima e produto na forma de creme submetidos à hidrólise alcalina durante 6 horas.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resultado (%)
Padrão 100%	51,00	-
Matéria-prima de NI	51,36	42,57
Amostra de NI creme	51,12	69,78

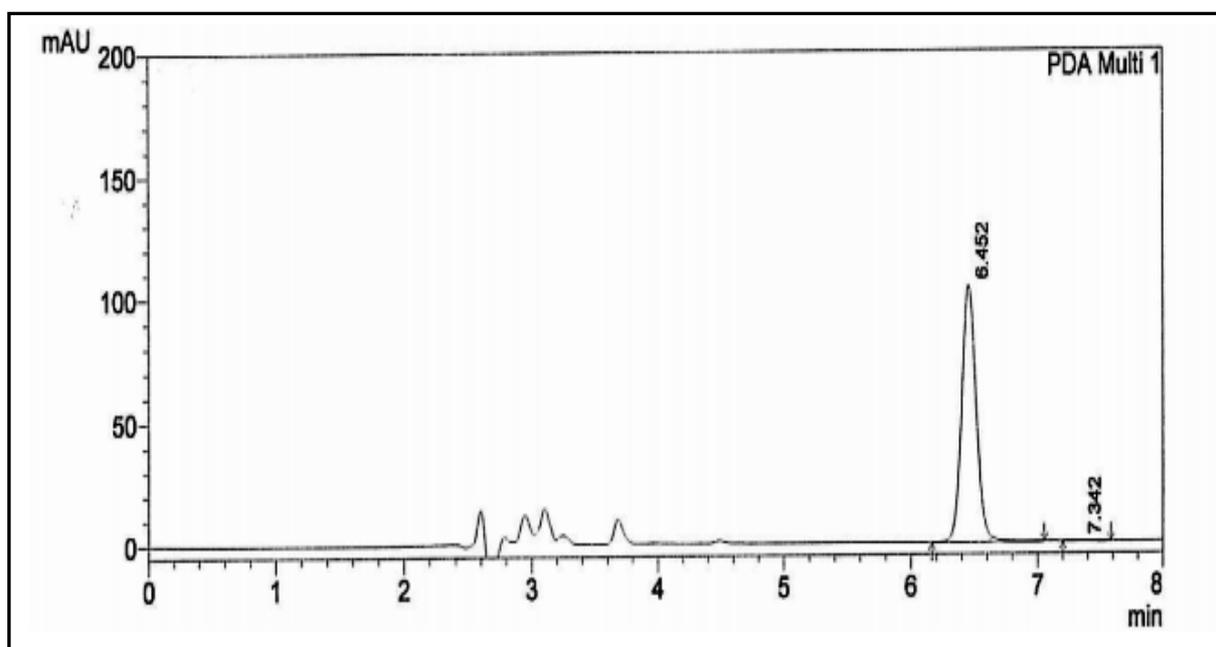


Figura 24: Cromatograma obtido através da análise da amostra na forma creme após hidrólise alcalina. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, coluna Agilent® Stable Bond Fenil ($250 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção $10 \mu\text{L}$, temperatura de análise: 45°C .

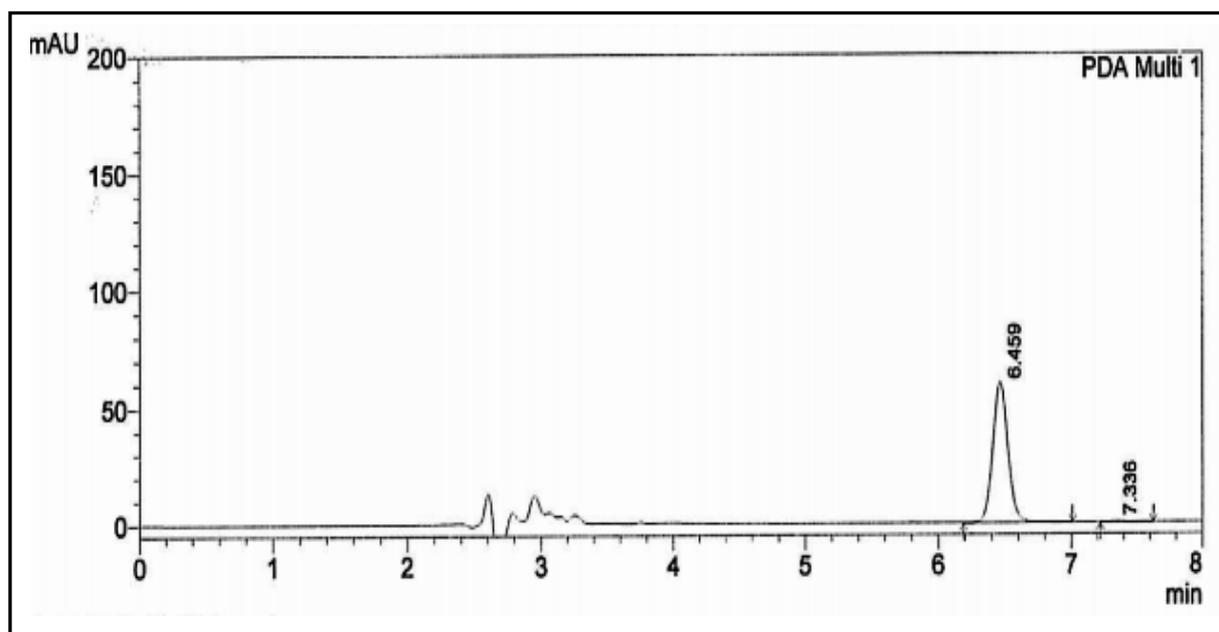


Figura 25: Cromatograma obtido através da análise da matéria-prima após hidrólise alcalina. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de tampão TEA 1% (V/V) pH 2,9: metanol: acetonitrila: tetrahydrofurano (8:6:4:4 V/V), fluxo de 1,0 mL min⁻¹, coluna Agilent® Stable Bond Fenil (250 × 4,6 mm × 5 µm), detecção em λ de 225 nm, volume de injeção 10 µL, temperatura de análise: 45°C.

As amostras preparadas e analisadas em condições menores de tempo de exposição armazenadas em hidróxido de sódio 1 M nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas também apresentaram gradativamente decréscimo de teor, conforme indicado na Tabela XXXI.

Tabela XXXI: Resultados da análise do produto em condições alcalinas – NaOH 1 M

Amostra	Concentração teórica (µg mL ⁻¹)	Resultado (%)
Padrão 100%	49,80	-
Amostra não submetida à hidrólise	50,40	100,86
Amostra hidrólise alcalina - 1 hora	51,04	12,58
Amostra hidrólise alcalina - 2 horas	50,79	10,87
Amostra hidrólise alcalina - 3 horas	50,79	9,44
Amostra hidrólise alcalina - 4 horas	50,27	8,57

Os resultados obtidos demonstraram uma forte queda no teor residual do fármaco com a utilização de uma condição mais forte de base e que reduziu gradativamente conforme o tempo de exposição. Em todas as amostras foi determinada a pureza de pico cromatográfico no tempo de retenção do fármaco em estudo comprovando a inexistência de impurezas que poderiam estar coeluído com o NI.

No entanto, na análise dos cromatogramas não foi observada a formação de produtos de degradação no espectro de absorção na faixa de 200 a 800 nm, verificado através do DAD. Com isso, foi avaliada a possibilidade do surgimento de espécies interconvertíveis, realizando-se a leitura (espectrofotômetro ultravioleta na faixa de 200 a 800 nm) da amostra em condições normais de pH, variando-se o pH em ambos sentidos (de pH 1,0 a 12,0). O espectro com a sobreposição das leituras de diferentes pHs identificou um ponto isobéstico em aproximadamente 275 nm, conforme apresentado na Figura 26. A realização do ensaio comprova indícios indicando que o estudo de degradação realizado não acarretará em degradação da amostra – reação irreversível (em condições alcalinas), e sim em uma reação reversível.

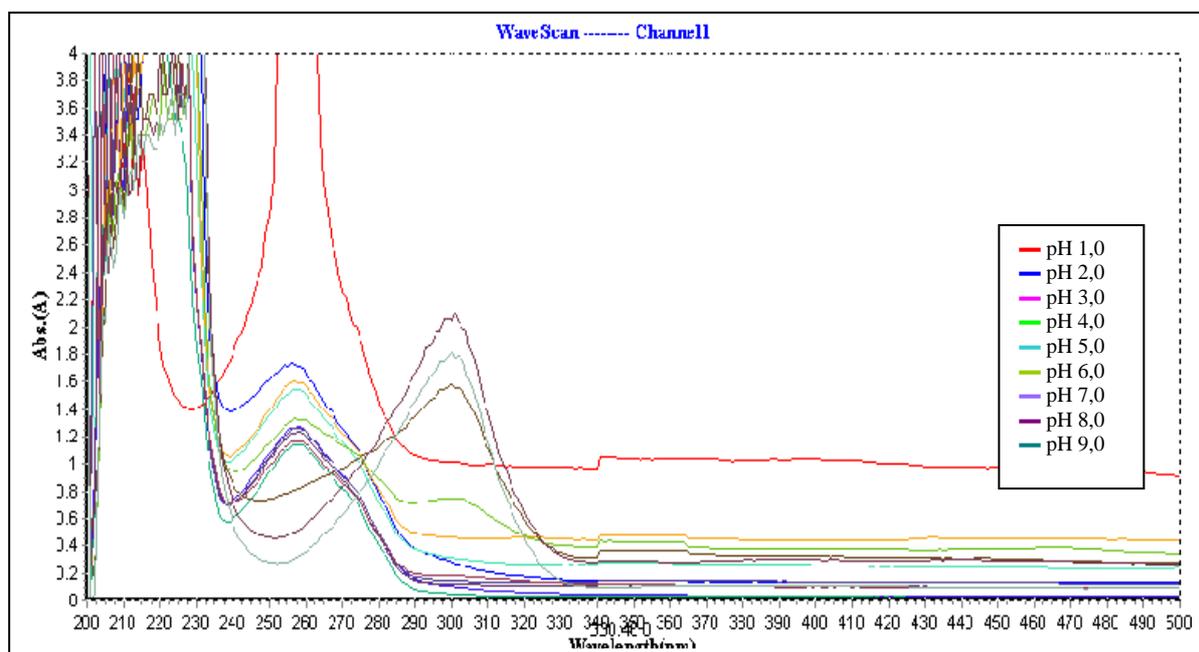


Figura- 26: Sobreposição das leituras dos espectros das amostras de nitrato de isoconazol creme em diferentes valores de pH.

Na análise de três diferentes soluções de amostras de NI creme, com controle de pH destas soluções, pode-se verificar, conforme resultado apresentado na Tabela XXXII que, comparando-se as soluções preparadas com o degradante e posteriormente neutralizadas até o valor de pH da amostra sem o degradante (pH 4,4) com a solução amostra de NI creme preparada em condições nas quais não é submetida a hidrólise (pH 4,4), ambas apresentam teor de recuperação do fármaco.

Tabela XXXII: Resultados da análise do produto em condições alcalinas – avaliação da reversibilidade da reação.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resultado (%)
Padrão 100%	49,80	99,59
Amostra em condições normais	50,40	100,86
Amostra hidrólise alcalina NaOH 1M neutralizada e condição pH da amostra original	50,04	101,40
Amostra hidrólise alcalina NaOH 1M - condição pH da amostra original com H_3PO_4	51,03	101,10

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A determinação qualitativa da matéria-prima nitrato de isoconazol apresentou conformidade com a técnica descrita na monografia, bem como sua determinação quantitativa, garantindo sua utilização como padrão de trabalho (SQT), critério de fundamental importância para dar partida à validação da metodologia analítica do NI creme, demonstrando-se a confiabilidade dos resultados das análises executadas.

Nas condições experimentais estabelecidas, o método cromatográfico desenvolvido para a determinação quantitativa de nitrato de isoconazol na forma farmacêutica creme foi seletivo e cumpriu com os requisitos de linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A validação da metodologia analítica, realizada de acordo com o disposto na RE 899/03 da ANVISA apresentou-se particularmente eficiente, permitindo resultados coerentes com os limites estabelecidos pela legislação vigente, lembrando que métodos analíticos validados constituem-se em exigência dos órgãos reguladores para obtenção de registro de medicamentos.

O estudo de degradação forçada no nitrato de isoconazol SQT e forma farmacêutica creme demonstraram susceptibilidade do fármaco frente às condições de hidrólise alcalina, apresentando redução drástica no teor, principalmente quando submetido a condições mais fortes de meio alcalino, contudo não foi observada a presença de produtos de degradação. Através da análise da amostra em espectrofotômetro ultravioleta na faixa de 200 a 800 nm foi observado o ponto isobéptico em aproximadamente 275 nm, o que indica que nas condições de hidrólise alcalina, trata-se de uma reação reversível, o qual foi comprovado através do ajuste de pH da solução da amostra hidrolisada alcalinamente às condições iniciais da solução.

Frente às demais condições de estresse testada no fármaco não foi verificada diferenças significativas na concentração do fármaco. Através da análise do fármaco no detector de arranjo de diodos, frente às condições de estresse, não foi observada a presença de impurezas no pico do fármaco, sendo, portanto, um método indicador de estabilidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avendaño Lopez, M.C. *Introducción a la química farmacéutica*. Madrid: McGraw-Hill, 1993.
2. Singh, S., Bakshi, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. *Pharmaceutical Technology On-Line*, p.1-14, 2000.
3. Silva, P. *Farmacologia*, ed. Guanabara/ Koogan, Quarta Edição, 1994, p. 1178-1179.
4. Nobre, M.O., Nascente, P.S. et al. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, UFSM, 2002, v.32.
5. Lacaz, C.S., Negro, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C. *Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*, São Paulo: Savier, 1991, Cap.38, p.616-651.
6. Alves, S.H., Lopes, J.O., Cury, A.E. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: porque, quando e como realizar. Disponível em <http://www.newslab.com.br/antifung.htm>
7. Arenas, R. *Micologia medica ilustrada*, México: Nueva Editorial Interamericana, 1993. Cap.34., Antimicoticos; p.359-376.
8. Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2006, v.32, n5.
9. Richardson, M.D., Warnock, D.W. Fungal infection – Diagnosis and management. London : Blackwell, 1993, Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.
10. Perfect, J.R., Marr, K.A., Walsh, T., Greenberg, R.N., DuPont, B., de la Torre-Cisneros, J., et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections, *Clinical Infection Diseases*, 2003, v.36 (9), 1122-31.

11. Sande, M.A.; Mandell, G.L., Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: Goodman, L.; Gilman, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro : Guanabara, 1987. Cap.54. p.799-807.
12. Guyton, Arthur C. & Hall, John E. Tratado de Fisiologia Médica. 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1997. 1014 p.
13. Wilkinson, G.R. Pharmacokinetics. In: Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 10th. ed, Cap.1, p. 22, 2001.
14. Strasinger, Susan, K. Uroanálise e Fluidos Biológicos, São Paulo, SP: Editorial Médica Panamericana, 2^a edição, 1991.
15. MedlinePlus – Medical Encyclopédia. Disponível em www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001326.htm. Acesso em 21/02/2011.
16. European Pharmacopeia. 6 ed. Strasbourg: Ed. Council of Europe, 2008.
17. Schering do Brasil, Química e Farmacêutica Ltda. Disponível em www.schering.com.br . Acesso em 15/01/2011.
18. Korolkovas, A., França, F.F.A.C. Dicionário Terapêutico Guanabara – 2001/2002.
19. Couto, S. G. D., Queirós, W. P., Organização e Composição Molecular do estrato Córneo. Biblioteca Digital de Ciências. Disponível em <http://www.ib.unicamp.br/ite/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=1135>. Acesso em 07/03/2011.
20. Imran, A., Hassan, Y., Gaitonde, V.D. et al. Chiral Separations of Imidazole Antifungal Drugs on AmyCoat RP Column in HPLC. *Chromatographia*, 2009, v.70, 223-227.

21. Karacan, E., Mehmet, G., Ismail, M.P., Feyyaz, O. Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Determination of Diflucortolone Valerate and Isoconazole Nitrate in Creams, *Journal of AOAC International*, v.94, 2011, 128-135.
22. Di Pietra, A.M., Cavrini, V., Andrisano, V., Gatti, R. HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1992, v.10, 873-879.
23. Thunberg, L., Andersson, S., Allenmark, S., Vessman, J. Preparative resolution of drug racemates to study the chiroptical properties of their enantiomers, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, v.27, 431-439.
24. Waterman, C. K., Adami, C. R. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics* v.293, 2005, 101-125.
25. Reynolds, D.W., Facchine, K. L., Mullaney, F.J., Alsante, K.M., Hatajik, T.D., Michel, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*, 2002, v.26(2), 48-56.
26. ICH Guideline, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, 2006.
27. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005*. Autoriza *ad referendum*, a publicação do guia para realização dos estudos de estabilidade. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 de agosto de 2005.
28. Tonnesen, H.H. Formulation and stability of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.225, p.1-14, 2001.
29. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B26246-1-0%5D.PDF.

30. Ansel, H.C., Popovich, N.G., Allen-Jr L.V. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. 8ª edição. Porto Alegre: Artmed; 2007. p.775.
31. Singh, S., Bakshi, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology*, 2000, v.24, 1-14.
32. Yoshioka, S., Stella, V. S. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York. Kluwer Academic, 2000, 268 p.
33. Nudelman, N.E.S. *Estabilidad de medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.
34. Florence, A.T., Attwood, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3.ed. São Paulo: Edusp, 2003. p.711.
35. Kommanaboyna, B., Rhodes, C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution na Storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.25, nº, 857-868, 1999.
36. Alsante, K., Martin, L., Baertschi, S. W. A stress testing benchmarking study, *Pharmaceutical Technology*, 2003, v.27, 60–72.
37. Klick, S., Muijselaar, P.G., Waterval, J., Eichinger, T., Korn, C., Gerding, et al. Towards a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*, 2005, v.29, 48-66.
38. Zan, M. M., Cámara, M. S., Robles, J. C., Kergaravat, S. V., Gicoechea, H. C. Development and validation of a simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations, *Talanta*, 2009, v.79, 762-767.
39. Bakshi, M., Singh, A., Singh, S. The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability-indicating assay, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.26, 2001, 891-897.

40. Adams, A.I.H. Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do voriconazol. [Tese] Porto Alegre: Faculdade de Ciências Farmacêuticas UFRGS; 2007.
41. Hájková, R., Sklenářová, H.A., et al. Development and validation of HPLC method of determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation, *Talanta*, v.73, 2007, 483-489.
42. Wilkinson, J.M., McDonald, C., Parkin, J.E., Sunderland, V.B. A high-performance liquid-chromatographic for amphotericin B in a hydrophilic colloidal paste base. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.17 1998, 751-755.
43. Milano, J., Morsch, L.M., Cardoso, S.G. LC method for the analysis of Oxiconazole in pharmaceuticals formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.30, 2002, 175-178.
44. Bakshi, M., Singh, S. ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.36, 2004, 769-775.
45. Singh, S., Bakshi, M. Guidance of conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharmaceutical Technology on-line*, 04/2010.
46. Shabir, G.A. Validation of high-performance liquid chromatographic methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, v.987, 2003, 57-66.
47. Food and Drug Administration – FDA. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.
48. Valderrama, P., Braga J.W.B., Poppi R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, v.32, nº5, 1278-1287, 2009.

49. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DQO-CGRE-008, 2003.
50. Brasil – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos através da revogação do RE-nº 475 publicada no D.O.U. 19 de março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho, 2003.
51. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. Practical HPLC Method Development, 2nd ed.: John Wiley & Sons, 1997, 765 p.
52. Huber, L., Good Laboratory practice: a primer for high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV-visible spectroscopy. Hewlett Packard, USA, 1993.
53. Ellison, S.L.R., Barwick, V.J., Farrant T.J.D. Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide, 2nd Edition, 2009.
54. Bretnall, A. E., Clarke, G. S. Validation of analytical test methods, *Separation Science and Technology*, v.10, 2011, Cap II, p. 429-457.
55. IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. Analytical Chemistry Division. Commission of chromatography and other analytical separations. *Appl. Chem.*, v.65, p. 975-990, 1991.
56. ICH – Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
57. Nijhuis, A., Knapp, H.C.M., Jong S., Vandeginste, B.G.M. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation, *Analytical Chimica Acta*, v.391, p. 187-202, 1999.

58. Bressole, F, Bromet-Petit, Audram M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal Chromatogr B Biom Sci Appl*, 1996; v.686: 3-10.
59. Reynolds, D.W., Facchine, K.L., Mullaney, F.J., Alsante, K.M., Hatajik, T.D., Michel, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*, 2002, v.57: 833-43.
60. Silverstein, R. M. *Identificação Espectroscópica de Compostos Orgânicos*, 6. ed., John Wiley & Sons Ltd, 2000.
61. Moriwaki, C., Brescansin, E.G., Hioka, N., Maionchi, F., Matioli, G. *Acta Science*, 2001; v.23(3): 651-4.
62. Farmacopéia Portuguesa VII: edição oficial 2002. Lisboa: Imprensa Nacional de Lisboa, 2002.
63. BP 2007. *British Pharmacopoeia*. Pharmacopoeia Commission British. London: The Stationery Office, 2007.
-