

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

**METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA AO CONTROLE DE
QUALIDADE DO ANTIFÚNGICO CLORIDRATO DE
BUTENAFINA NA FORMA DE CREME E À AVALIAÇÃO DA
SUA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO***

ALINE BERGESCH BARTH

Porto Alegre, 2010.

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

**METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA AO CONTROLE DE
QUALIDADE DO ANTIFÚNGICO CLORIDRATO DE
BUTENAFINA NA FORMA DE CREME E À AVALIAÇÃO DA
SUA PENETRAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO***

Dissertação apresentada por **ALINE
BERGESCH BARTH** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Nadia Maria Volpato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21.05.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Cássia Virginia Garcia
Universidade Federal do Pampa (Unipampa)

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

B284m Barth, Aline Bergesch

Metodologia analítica aplicada ao controle de qualidade do antifúngico cloridrato de butenafina na forma de creme e à avaliação da sua penetração cutânea in vitro / Aline Bergesch Barth – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xx, 117 p. : il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Cloridrato de butenafina. 2. Antifúngicos. 3. Controle de qualidade de medicamentos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Validação: métodos de análise de fármacos. 6. Estabilidade. 7. Eletroforese capilar. 8. Penetração cutânea. I. Volpato, Nadia Maria. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecárias responsáveis:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480
Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com bolsa de estudos financiada pelo CNPq.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Nadia Maria Volpato pela orientação e pela imensa dedicação oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Elfrides E. S. Schapoval pelo exemplo de vida e profissionalismo, essenciais para minha formação profissional.

Aos professores Tércio Oppe e Célia Chaves pela disponibilidade e auxílios prestados, em especial ao Prof. Martin Steppe pela amizade e pelo incentivo.

Aos colegas do LEPCQ: Amanda, Bárbara, Cássia, Fernanda, Franciele, Gabriela, Heloísa, Jamila, Jéferson, Marcelo, Mariana, Nathalie, Patrícia e Vanessa.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico: Alianise, Leila, Lorena, Rose e Viviane.

Ao Clésio Paim pela amizade, convívio e auxílio ao longo deste trabalho.

À amiga Rúbia Pereira pelo carinho e pelos momentos de descontração entre estudos, aulas e experimentos.

Às colegas Alini e Letícia pela amizade e, principalmente, pelo incentivo.

Ao Vítor, Maximiliano e Diogo pela amizade e pela colaboração nos experimentos de eletroforese capilar.

À amiga Bethânia Vargas pela colaboração nos experimentos de permeação/penetração cutânea.

À Cooperativa dos Suinocultores do Caí Superior pela doação das orelhas para os estudos de penetração/permeação cutânea.

Ao Programa de Pós-Graduação, à Faculdade de Farmácia da UFRGS e a todos os professores e funcionários dessa instituição.

À família Andres pela carinhosa acolhida e em especial ao Natan pelo amor, amizade, compreensão e paciência no decorrer desta caminhada.

Aos meus pais, Pedro e Lélia, e ao meu irmão Mateus, pela compreensão e principalmente pelo apoio incondicional na busca de meus sonhos.

RESUMO

Objetivos: os objetivos gerais deste trabalho foram desenvolver, validar e comparar métodos indicativos de estabilidade para a análise do cloridrato de butenafina (BTF), matéria-prima e forma farmacêutica, bem como determinar a cinética de degradação do fármaco em condição de estresse. Adicionalmente, o trabalho visou à validação de método para avaliar e comparar a penetração/permeação cutânea da BTF de diferentes formulações. **Métodos:** Um método indicativo de estabilidade para análise da BTF por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado, conforme normas do ICH. A cinética de degradação do fármaco (matéria-prima e creme) frente à luz UVC foi determinada. Testes para o desenvolvimento de método quantitativo por eletroforese capilar para a análise do fármaco isoladamente e presente na formulação foram realizados. O método analítico cromatográfico previamente desenvolvido para a formulação semi-sólida foi validado para a quantificação de BTF na pele suína. Em seguida, as penetrações/permeações cutâneas do fármaco utilizando células de Franz foram analisadas visando à comparação de duas formulações comerciais (uma delas brasileira e a outra americana). **Resultados e Conclusões:** O método de CLAE indicativo de estabilidade desenvolvido demonstrou ser adequado para a determinação da substância ativa na formulação mesmo na presença de produtos de degradação, bem como para a quantificação do fármaco na pele suína e no fluido receptor. Os principais fatores extrínsecos que promovem a degradação do fármaco foram estabelecidos: luz, oxidação e meio básico (este último somente na presença de excipientes). A determinação da cinética de fotodegradação como sendo de primeira ordem demonstra que o processo é dependente da concentração do fármaco, reforçando a necessidade de proteção frente à luz. Já o método por eletroforese capilar mostrou-se não específico frente à formulação placebo simulado, inviabilizando seu uso para o creme. Na avaliação da permeação cutânea das formulações brasileira e americana não foi detectada presença considerável do fármaco no fluido receptor para ambos os produtos. Já na verificação da penetração, não houve diferença significativa na retenção do fármaco na epiderme, entretanto, na derme a diferença foi estatisticamente significativa, com maior concentração retida na análise da formulação americana ($\alpha = 0,05$).

Unitermos: cloridrato de butenafina, cromatografia líquida de alta eficiência, validação, estabilidade, eletroforese capilar, pele suína e célula de Franz.

ABSTRACT

Analytical Methodology Applied to the Quality Control of the Antifungal Butenafine Hydrochloride in Cream Formulation and to the Analysis of its Penetration In Vitro.

Objectives: The aim of the present work was to develop, validate and compare stability indicating methods to quantify butenafine hydrochloride (BTF), raw material and commercial cream, as well as to establish the degradation kinetics of the drug in a stress condition. Also, the study had the goal of validating a method to assess and compare the cutaneous permeation/penetration of two different formulations.

Methods: A stability-indicating method for the analysis of BTF by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated according to the ICH guidelines. The degradation kinetics of the drug (raw material and cream) under the UVC light was determined. Analyzes to develop and validate an analytical method by capillary electrophoresis, to quantify the drug by itself and in the cream, were performed. The chromatographic method previously developed for the semi-solid product was validated to quantify the drug in porcine skin. Then, the cutaneous permeation/penetration of BTF, through the Franz-type cell, was analyzed to compare two different commercial formulations (one of them is Brazilian and the other is American). **Results and Conclusions:** The developed stability-indicating method was adequate to determine the active substance in the formulation even in the presence of the degradation products, as well as to quantify the drug in porcine skin and in the receptor fluid. The main extrinsic factors that promote the drug degradation were established: light, oxidative and basic media (the last in the presence of the excipient ingredients). The photodegradation kinetics was determined as first order showing that the process is dependent on the drug concentration, reaffirming the necessity of protection against light. The method by capillary electrophoresis was not specific considering the placebo formulation, hindering its use to the cream. During the cutaneous permeation analysis, no drug was found in the receptor media of both the Brazilian and the American formulations. No difference was verified to the epidermis, although to the dermis there was a statistical distinction as the concentration of retained drug from the American formulation was higher ($\alpha = 0,05$).

Keywords: butenafine hydrochloride, high performance liquid chromatography, validation, stability, capillary electrophoresis, porcine skin and Franz cell.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA:

Figura 1. Via de síntese do ergosterol e pontos de atuação de agentes antifúngicos..	13
Figura 2. Estrutura química do cloridrato de butenafina.	16
Figura 3. A pele com suas três camadas: epiderme, derme e hipoderme.....	22
Figura 4. Representação esquemática da pele mostrando as diferentes rotas de penetração.....	24
Figura 5. Célula de difusão de Franz.....	25

Capítulo I. Caracterização do padrão, desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para análise do cloridrato de butenafina em forma farmacêutica semi-sólida e estudo de estabilidade

Figura 1.1. Curva de aquecimento obtida por DSC para a BTF SQR.....	39
Figura 1.2. Espectro no IV da BTF SQR em pastilhas de KBr.....	40
Figura 1.3. Estrutura química da butenafina e de terbinafina.	41
Figura 1.4. Cromatograma e valores de Rf obtidos por CCD na análise de BTF SQR, BTF extraída do creme dermatológico e terbinafina	42

Artigo submetido: *Stability-indicating LC assay for butenafine hydrochloride in creams using an experimental design for robustness evaluation and photodegradation kinetics study*

Figure 1. Chemical structure of BTF.	51
Figure 2. Representative chromatograms obtained for BTF reference standard for the placebo after forced degradation studies with the BTF standard and with the commercial cream	62
Figure 3. Chromatogram from the BTF reference standard exposed to UV light for 2 h. and overlapping of the UV spectra from the indicated peaks.....	63
Figure 4. Half-normal probability plot for the effects of Table 5 with identification of the critical effects ME and SME.	66

Figure 5. First-order reaction plots of remaining BTF from the standard and from the cream versus time, after photodegradation with UV-C light. 68

Capítulo II. Estudos para o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar para a análise de cloridrato de butenafina presente na formulação semi-sólida

Figura 2.1. Diagrama esquemático do sistema de EC.....76

Figura 2.2. Formação e sentido do fluxo eletrosmótico.76

Figura 2.3. Eletroferograma de BTF SQR. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mM, pH 5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.80

Figura 2.4. Eletroferograma de BTF SQR. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50mM, pH 5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.80

Figura 2.5. Eletroferograma de BTF SQR. Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM, pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.82

Figura 2.6. Eletroferograma de BTF SQR exposta à luz UVC por uma hora. Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM em pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.....83

Figura 2.7. Eletroferograma de: Rosiglitazona e BTF SQR. Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM em pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.84

Figura 2.8. Eletroferograma de BTF obtida do creme, com alargamento de sua base e eletroferograma do placebo simulado com sinal no mesmo tempo de migração do fármaco.....84

Capítulo III. Validação de metodologia para a quantificação do cloridrato de butenafina em segmento de pele e estudo comparativo de retenção cutânea de duas formulações presentes no mercado.

Artigo a ser submetido: *A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations.*

Figure 1. Chemical structure of BTF.94

Figure 2. Chromatograms from: extraction solution from epidermis in contact with formulation T and with excipients from formulations T and L	104
Figure 3. Chromatograms from: extraction solution from dermis in contact with formulation L and with excipients from formulations T and L	104
Figure 4. Plots of the mean concentration of formulations L and T in the epidermis with the respective standard deviations.	106
Figure 5. Plots of the mean concentration of formulations L and T in the dermis with the respective standard deviations.	106

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA:

Tabela 1. Ensaios necessários para a validação de método analítico.20

Capítulo I. Caracterização do padrão, desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para análise do cloridrato de butenafina em forma farmacêutica semi-sólida e estudo de estabilidade

Tabela 1.1. Determinação da solubilidade da BTF SQR38

Tabela 1.2. Atribuição das principais bandas do espectro da BTF na região do IV...40

Tabela 1.3. Determinação quantitativa da BTF SQR por titulação potenciométrica em meio não aquoso.44

Artigo submetido: *Stability-indicating LC assay for butenafine hydrochloride in creams using an experimental design for robustness evaluation and photodegradation kinetics study*

Table 1. Factors and levels applied to the robustness test by LC method.....57

Table 2. BTF Precision study by LC method.61

Table 3. BTF accuracy study by LC method.....61

Table 4. Plackett-Burman design factors and the obtained response to each experiment.65

Table 5. Effects from the seven-factor Plackett-Burman design for two wavelengths66

Table 6. Determination coefficients from the photodegradation kinetics of BTF68

Capítulo III. Validação de metodologia para a quantificação do cloridrato de butenafina em segmento de pele e estudo comparativo de retenção cutânea de duas formulações presentes no mercado.

Artigo a ser submetido: *A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations.*

Table 1. Precision and Accuracy from the analytical method: BTF extracted from Epidermis and Dermis.103

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	7
1. Micoses superficiais.....	9
2. Fármacos Antifúngicos	12
2.1. Cloridrato de Butenafina	16
3. Validação de métodos analíticos	18
4. Estabilidade de fármacos e medicamentos	21
5. Quantificação de fármacos na pele - testes <i>in vitro</i>	22
6. Referências	25
CAPÍTULO I. Caracterização do padrão, desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para análise do cloridrato de butenafina em forma farmacêutica semi-sólida e estudo de estabilidade	33
1. Introdução	35
2. Produtos Farmacêuticos e Material de Referência.....	36
<i>Produtos Farmacêuticos</i>	36
<i>Material de Referência</i>	37
2.1 Caracterização do cloridrato de butenafina - substância química de referência (SQR):	37
2.1.1 Análise Qualitativa.....	37
<i>Solubilidade</i>	37
<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	38
<i>Espectrofotometria na Região do Infravermelho</i>	39
<i>Cromatografia em Camada Delgada</i>	41
2.1.2 Análise Quantitativa	43
<i>Titulação Potenciométrica em meio não-aquoso</i>	43
3. Conclusão	44
4. Referências	45
Manuscrito submetido ao <i>Journal of Chromatographic Science</i>.....	47
Abstract	50
Introduction.....	51
Materials and Methods	52
Materials.....	52
Chromatographic system.....	53
Sample preparation for LC analysis	53

Validation procedure	54
BTF photodegradation kinetics	58
Results and Discussion	59
Selection and optimization of the chromatographic conditions	59
Validation of LC methods	60
BTF Photodegradation kinetics	67
Conclusion	68
References	70

CAPÍTULO II. Estudos para o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar para a análise de cloridrato de butenafina presente na formulação semi-sólida

1. Introdução	75
2. Metodologia	78
2.1. Solventes e reagentes	78
2.2. Sistema de Eletroforese Capilar	78
2.3. Desenvolvimento de Método Analítico	78
<i>Utilização de tampão fosfato</i>	79
<i>Utilização de tampão citrato</i>	81
<i>Utilização de tampão acetato</i>	81
<i>Utilização de tampão TRIS com SDS</i>	81
<i>Seleção do padrão interno</i>	83
<i>Utilização de tampões Borato e Tetraborato com SDS</i>	85
3. Conclusões	86
4. Referências	86

CAPÍTULO III. Validação de metodologia para a quantificação do cloridrato de butenafina em segmento de pele e estudo comparativo de retenção cutânea de duas formulações presentes no mercado.

Manuscrito a ser submetido ao <i>Biomedical Chromatography</i>	92
Abstract	93
Introduction	94
Materials and Methods	96
Materials	96
Chromatographic system	97
Calibration Standards	97
Skin Preparation	98
Butenafine Hydrochloride Extraction Procedure	98
Method Validation	99

Application of the Method to in vitro Skin Penetration Studies	100
Results and Discussion	101
Butenafine Hydrochloride Extraction Procedure.....	101
Method Validation.....	102
Method Application in a comparative cutaneous retention study.....	105
Conclusion	107
References	109
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS	113

Infecções fúngicas superficiais estão entre as doenças infecciosas mais comuns. As dermatofitoses que geralmente causam somente infecções superficiais da pele são classificadas em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. A ocorrência de dermatofitoses nos pés é certamente a mais comum infecção fúngica, sendo que *Trichophyton rubrum* é o usual agente causador. *Tinea cruris* é a segunda infecção mais comum, sendo causada por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ou *Epidermophyton floccosum*. Essas infecções tendem a ser crônicas e geralmente ocorrem recidivas após o tratamento (ODOM, 1997).

O cloridrato de butenafina (BTF) é um fármaco derivado da benzilamina, com estrutura e modo de ação similar às alilaminas. O fármaco possui ação fungicida, inibindo a epoxidação do esqualeno, sem interferir em enzimas dependentes do citocromo P450. A ação do fármaco é de amplo espectro, com altas taxas de cura micológica e clínica (ODOM, 1997; SINGAL, 2008). De acordo com Singal (2008), a BTF apresenta excelente penetração na epiderme e um tempo de retenção prolongado na mesma, conferindo atividade terapêutica residual após o final do tratamento.

Comercialmente, o fármaco é encontrado no mercado brasileiro desde 2007 na forma de creme a 1% (*p/p*), com o nome comercial de Tefin, marca da Mantecorp. No mercado americano existem dois produtos disponíveis: Mentax[®] da Bertek Pharmaceuticals e Lotrimin Ultra[®] da Schering-Plough, ambos na mesma concentração da formulação brasileira.

Apesar de sua utilização, não existe descrição de um método analítico indicativo de estabilidade para matéria-prima e forma farmacêutica, objetivando quantificar o fármaco em presença de seus produtos de degradação e estudar características relativas à estabilidade da substância ativa isolada e na presença de componentes da formulação semi-sólida.

Para uma completa avaliação de formulações de liberação tópica é importante conhecer o perfil de penetração do fármaco no tecido cutâneo, incluindo a quantidade de substância ativa presente nas diferentes camadas da pele e o fluxo através dela para a circulação sistêmica. Para formulações de uso tópico, é desejado o acúmulo na pele com mínima permeação e para a ação sistêmica, o comportamento oposto é desejado (TOUITOU *et al*, 1998). No caso das infecções

por dermatófitos espera-se que o fármaco se concentre na camada mais externa, já que a infecção é de caráter superficial (ODOM, 1997; SINGAL, 2008).

Entre os poucos estudos que quantificam o fármaco na pele, dois deles são estudos em animais (ARIKA *et al*, 1990; ARIKA *et al*, 1993) e um em humanos (TANUMA *et al*, 2001), e somente um quantifica o fármaco em diferentes camadas da pele (ARIKA *et al*, 1993). Os estudos desenvolvidos não geraram modelos aplicáveis na análise da liberação de fármacos em diferentes camadas para a rotina de pesquisa e controle de qualidade de formulações, já que os modelos disponíveis na literatura são complexos, caros, longos e necessitam do uso de animais/humanos. Considerando o caráter superficial das infecções por dermatófitos e o uso estritamente tópico da BTF, associado à carência de literatura quanto à sua toxicidade sistêmica, é de alta relevância o desenvolvimento de um método para análise da retenção e da permeação do fármaco. Atualmente, o uso de pele suína para estas análises vem sendo amplamente difundido em virtude de sua similaridade com a pele humana (TOUITOU *et al*, 1998; MOSER *et al*, 2001; SCHMOOK *et al*, 2001; SCCP, 2006, JACOBI *et al*, 2007; MEYER *et al*, 2007; BARBERO & FRASCH, 2009) e o modelo célula de difusão (Célula de Franz) tem sido considerado padrão para os estudos de quantificação *in vitro*.

Considerando o exposto, os objetivos gerais desta dissertação foram:

- Desenvolver e validar métodos quantitativos para análise do cloridrato de butenafina na forma farmacêutica semi-sólida;
- Avaliar a aplicabilidade da metodologia desenvolvida em estudos de estabilidade do fármaco e estudar a cinética de degradação do cloridrato de butenafina em condições forçadas ou de estresse;
- Desenvolver e validar método para avaliar a penetração e eventual permeação cutânea do fármaco em pele suína *in vitro*, bem como aplicar a metodologia para comparar duas formulações.

Como objetivos específicos foram estipulados:

- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise quantitativa do cloridrato de butenafina na forma farmacêutica semi-sólida;
- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar (EC) para análise quantitativa do cloridrato de butenafina matéria-prima e forma farmacêutica semi-sólida;
- Avaliar a especificidade e sensibilidade da metodologia desenvolvida na determinação do fármaco quando submetido a condições forçadas de degradação, como meio fortemente ácido, fortemente básico, com agente oxidante e sob luz ultravioleta;
- Identificar os principais fatores extrínsecos que promovem decomposição do cloridrato de butenafina, de modo a fornecer subsídios científicos para o desenvolvimento de produtos com garantia de eficácia e segurança;
- Avaliar a aplicabilidade de CLAE como metodologia analítica para determinação do cloridrato de butenafina na epiderme e na derme suína, visando à aplicação em estudos de penetração cutânea, bem como desenvolver método de extração de fármaco dos tecidos cutâneos;
- Determinar e comparar a penetração cutânea do cloridrato de butenafina presente em duas formulações diferentes, na epiderme e na derme, após a aplicação do produto sobre a pele suína *in vitro*, bem como a eventual permeação do fármaco através da mesma.

1. Micoses superficiais

Micoses são infecções causadas por microfungos parasitas e ocupam lugar de destaque na patologia tropical. Muitos fungos apresentam potencial patogênico para os humanos. De acordo com os tecidos e órgãos afetados, as micoses são classificadas em micoses superficiais - da pele, unhas e pêlos; micoses subcutâneas e micoses sistêmicas ou profundas.

A pele seca na camada mais externa desencoraja a colonização por microrganismos e a perda de células da epiderme mantém os mesmos afastados. Entretanto, os mecanismos de defesa da pele podem falhar devido a uma série de fatores, tais como trauma, irritação ou maceração. Além disso, a oclusão da pele com materiais não porosos pode interferir em sua função de barreira pelo aumento da temperatura local e pela hidratação. Com a inibição ou falha dos mecanismos de proteção da pele, infecções cutâneas podem ocorrer (HAINER, 2003).

Micoses superficiais são doenças produzidas por fungos que se localizam preferencialmente na epiderme e/ou seus anexos, podendo, em raríssimos casos, invadir a derme e, até mesmo, órgãos internos. O contágio inter-humano (agentes antropofílicos) é freqüente, mas pode ocorrer também a partir de animais (agentes zoofílicos) e do solo (agentes geofílicos) (AZULAY & AZULAY, 1999; HAINER, 2003; VERMOUT *et al*, 2008).

As infecções fúngicas superficiais podem ser divididas em dermatofitoses e candidíase. Na candidíase superficial, a levedura infecta as mucosas da boca (infecção conhecida popularmente como sapinho) ou da vagina ou da pele (RANG *et al*, 2001). As dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos que, em regime parasitário, alimentam-se da queratina da pele, unhas e pêlos. Os microrganismos secretam proteases chamadas queratinases que quebram a rede de queratina em oligopeptídeos ou aminoácidos, facilmente assimiláveis. Existe relação direta entre queratinases e patogenicidade. Pouca informação encontra-se disponível sobre outras hidrolases como lipases e ceramidases, também secretadas por estes fungos (VERMOUT *et al*, 2008). As infecções por dermatófitos induzem uma resposta imune específica, com componentes humorais e celulares. Uma resposta eficiente e protetora contra os dermatófitos é mediada por células de

hipersensibilidade tardia, caracterizadas pela ação de macrófagos como células efectoras e por algumas citosinas chaves como interferon γ . Entretanto, o grau de resposta imune desenvolvida, especialmente o nível de inflamação varia de acordo com a espécie de dermatófito e de hospedeiro, bem como do estado patofisiológico do hospedeiro (GUPTA *et al*, 1998; VERMOUT *et al*, 2008).

Agrupam-se sob essa denominação fungos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, cujas características morfológicas, fisiológicas e antigênicas relacionam-se entre si. As dermatofitoses representam a infecção fúngica mais comum no homem, mas, por requererem queratina, não atingem as mucosas. Dermatofitoses são também designadas como infecções por “*Tinea*” e nomeadas de acordo com o local do corpo atingido: *Tinea capitis*, *Tinea corporis*, *Tinea pedis*, *Tinea unguium* (GUPTA *et al*, 1998; AZULAY & AZULAY, 1999; WEINSTEIN & BERMAN, 2002, HAINER, 2003; NEWTON & POPOVICH, 2004; HAY, 2005).

A resposta inflamatória é caracterizada por um grau elevado de vermelhidão e escamação na borda da região afetada ou por formação de bolhas. Uma região clara central pode estar presente e diferencia as dermatofitoses de outras doenças (HAINER, 2003). O risco de adquirir dermatofitoses durante a vida está estimado entre 10 e 20 % (WEINSTEIN & BERMAN, 2002).

Tinea pedis, conhecida popularmente como pé de atleta, é uma das formas mais comuns de dermatofitoses e pode manifestar-se de três formas: interdigital, mocassim e vesicular (GUPTA, 2005; GUPTA & TU, 2006). A forma interdigital é a mais comum, caracterizada por fissuras, escamação e maceração das áreas interdigitais, particularmente entre o quarto e o quinto dedo. *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* são os microrganismos geralmente responsáveis pelas infecções. Devido à perda da função barreira da pele pela ação dos dermatófitos a ocorrência de infecções bacterianas secundárias é comum, podendo resultar em inflamação e maceração na região (GUPTA, 2005). A infecção tipo mocassim é caracterizada por coloração rósea subjacente à pele vermelha, afetando a sola, o calcanhar e os lados dos pés, sendo causada principalmente pelo *T. rubrum*. É caracterizada por pele seca, hiperqueratolítica, sendo de característica suave, porém esteticamente desinteressante. Formas moderadas a grave apresentam pele rachada a inflamada, com eritema e odor, podendo incluir infecções nas unhas (GUPTA, 2005). A forma

de *Tinea pedis* vesicular é a forma menos comum e ao mesmo tempo mais severa, sendo caracterizada pela presença de bolhas ou vesículas inflamadas. *T. mentagrophytes* é o microrganismo predominantemente causador da doença. A forma mais branda da doença inclui a presença de vesículas com líquido claro de tamanho pequeno e isoladas que podem se romper, ocorrendo cura espontânea. Formas mais severas são caracterizadas por coalescência das vesículas em uma grande bolha erosiva caracterizada por prurido, ulceração e por seu espalhamento (GUPTA, 2005).

A *Tinea corporis* é caracterizada por infecções cutâneas do corpo, geralmente envolvendo o tronco, ombros ou membros e, ocasionalmente, o rosto (excluindo a área da barba em homens) e pode ser causada por qualquer dermatófito. A infecção pode manifestar-se de forma suave a severa, caracterizando-se por lesão única ou múltipla, anular e escamosa com o centro claro e borda elevada e avermelhada com marginação fina (abrupta transição de pele anormal a normal). A borda das lesões pode conter pústulas ou pápulas foliculares (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995; HAINER, 2003). Cada lesão pode ter um ou mais anéis concêntricos com pápulas vermelhas ou placas centrais. Com a progressão da lesão, o centro se torna limpo com uma hiperpigmentação ou hipopigmentação pós-inflamatória (WEINSTEIN & BERMAN, 2002).

A *Tinea cruris* é uma infecção da região da virilha, perianal e perineal, bem como ocasionalmente na parte superior das coxas, sendo mais comum em homens do que mulheres. *T. rubrum* e *T. floccosum* são os agentes etiológicos mais comuns. As lesões são eritematosas podendo desenvolver tom amarelo tostado a marrom (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995). A lesão é geralmente bilateral e assimétrica na parte interna da coxa exibindo uma borda elevada e finamente marginada, podendo ser vermelha e com textura escamosa, sendo frequentemente preenchida com pequenas vesículas (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995; HAINER, 2003). Muitas pessoas infectadas com *Tinea cruris* também são infectadas por *Tinea pedis* e tem sido postulado que a *Tinea cruris* é disseminada pela mão a partir da *Tinea pedis* (WEINSTEIN & BERMAN, 2002; HAINER, 2003).

A manifestação clínica é a evidência mais importante para diagnóstico e tratamento corretos (WEINSTEIN & BERMAN, 2002). Os métodos de diagnóstico para infecções por dermatófitos incluem: exame microscópico direto (material colhido

é tratado com hidróxido de potássio, que atua como clarificante) que possibilita a visualização de hifas; exame com lâmpada ultravioleta (lâmpada de Woods) que tem uso limitado já que muitos dermatófitos não fluorescem; cultura de fungos e biópsia de pele (HAINER, 2003).

2. Fármacos Antifúngicos

Antifúngicos de uso sistêmico são geralmente administrados para o tratamento de onicomicosis, cândida superficial ou sistêmica e para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas invasivas. Anfotericina B, flucitosina, itraconazol e cetoconazol têm sido os principais agentes antifúngicos por muitos anos, entretanto sua toxicidade, a emergência de cepas resistentes e a baixa eficácia tem restringindo seu uso. Nos últimos 20 anos alguns agentes antifúngicos vêm demonstrando boa absorção e eficácia com significativo potencial terapêutico. Voriconazol, micafungina, caspofungina e formulações lipídicas de anfotericina B estão sendo utilizadas no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (ZHANG *et al*, 2007).

As principais classes de antifúngicos tópicos incluem os polienos, azóis e as alilaminas/benzilaminas. Outros agentes tópicos antifúngicos incluem o ciclopirox, a hidroxipiridona, o tiocarbonato, a haloproquina e o sulfeto de selênio (GUPTA *et al*, 1998; ZHANG *et al*, 2007). Geralmente o agente antifúngico encontra-se disponível na forma de creme, algumas vezes para o uso intravaginal. Muitos destes agentes possuem amplo espectro de atividade contra dermatófitos, leveduras e *Malassezia furfur*. Para o tratamento de *Tinea corporis* e *Tinea cruris* é necessária aplicação uma a duas vezes por dia num período de duas a quatro semanas. Para o tratamento de *Tinea pedis* a duração do tratamento varia entre 4 a 6 semanas (GUPTA *et al*, 1998).

Os agentes antifúngicos da classe dos polienos possuem alta afinidade pelo ergosterol da membrana fúngica, ligando-se irreversivelmente a ela e alterando sua permeabilidade, tendo como consequência a criação de poro e o extravasamento de

componentes intracelulares, destruindo assim a célula fúngica. A nistatina e a anfotericina B são os principais antimicrobianos da classe, porém são inefetivos contra dermatófitos (GIMENO-CARPIO, 2006; ZHANG *et al*, 2007). Na Figura 1 pode ser visualizada a rota de síntese do ergosterol da membrana fúngica e os principais alvos para a ação de fármacos.

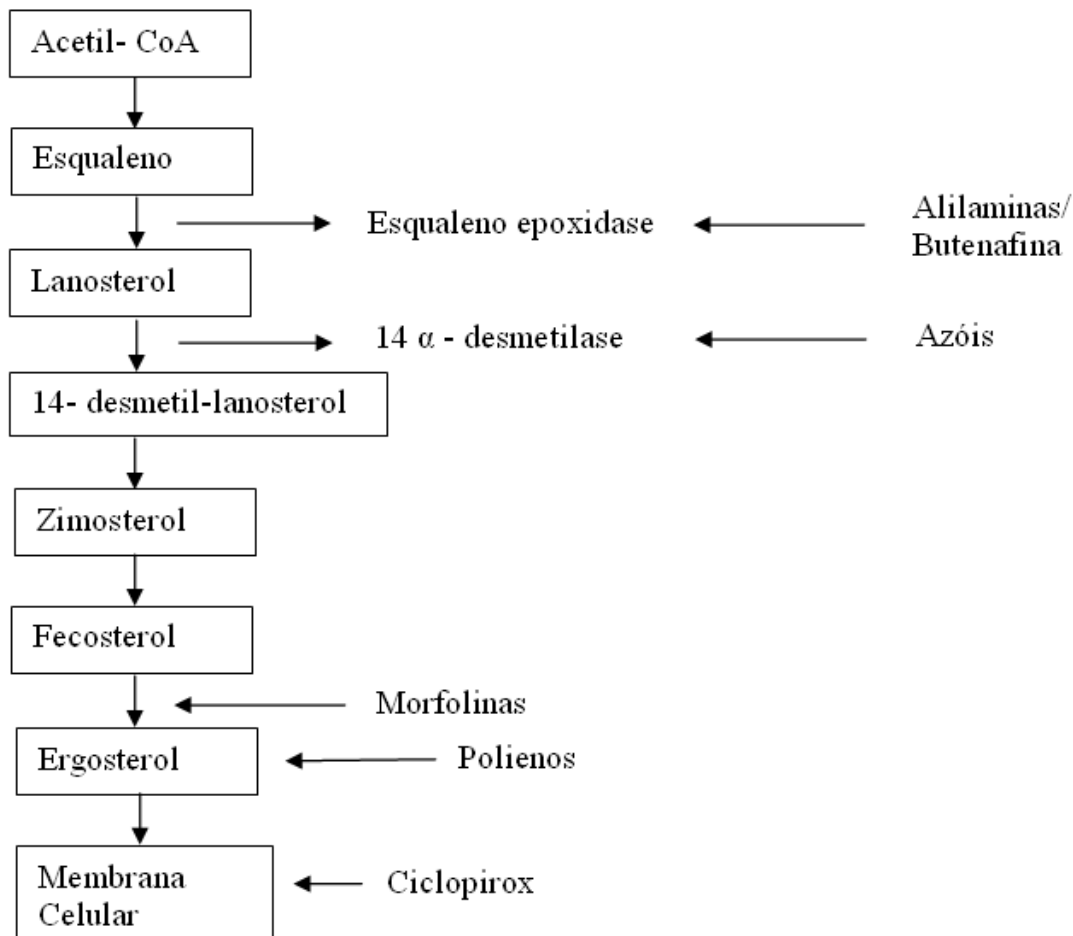


Figura 1. Via de síntese do ergosterol e pontos de atuação de agentes antifúngicos. Adaptado de GIMENO-CARPIO, 2006.

Os antimicrobianos azóis são compostos de triazóis e imidazóis. São fungistáticos e não fungicidas, exceto em concentrações muito altas. Esses agentes inibem a síntese do ergosterol pela interação com a enzima 14- α lanosterol desmetilase, uma enzima dependente do citocromo P450 (catalisa a reação), que converte o lanosterol a 14 desmetil-lanosterol, interrompendo a síntese do ergosterol, inibindo assim, o crescimento fúngico e a replicação. Fluconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol são utilizados para

tratamentos sistêmicos (ZHANG *et al*, 2007). O cetoconazol foi o primeiro azol a ser administrado por via oral no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. O fármaco possui alta afinidade pela queratina e é transportado ao estrato córneo através do suor. Seu principal risco é hepatotoxicidade, que é rara, mas pode se tornar fatal. Outras reações adversas estão relacionadas com distúrbios gastrintestinais. O cetoconazol também está disponível para terapia tópica na forma de creme 2% (RANG *et al.*, 2001).

O ciclopirox é uma hidroxipiridona sintética derivada que possui propriedades antifúngicas, antibacterianas e antiinflamatórias e tem sido amplamente utilizado como tratamento tópico de infecções superficiais fúngicas. Seu mecanismo de ação relaciona-se com sua alta afinidade por Fe^{3+} e Al^{3+} . Pela formação de um grande cátion polivalente através de quelação, o fármaco inibe enzimas essenciais, incluindo citocromos e interferindo no transporte de elétrons mitocondrial e na produção de energia. Em altas concentrações o ciclopirox também inibe a recaptação celular de compostos essenciais e desequilibra a integridade da célula fúngica. O fármaco também desequilibra o processo de respiração celular. Sua propriedade antiinflamatória é majoritariamente devido à inibição da 5-lipoxigenase e cicloxigenase e inibição de prostaglandinas e leucotrienos (ZHANG *et al*, 2007).

A griseofulvina é um dos agentes antifúngicos clássicos que tem sido usado no tratamento de dermatofitoses nos últimos 40 anos. Seu mecanismo de ação é incerto, porém estima-se que o fármaco iniba a mitose celular e a síntese de ácido nucléico e que também tem interferência na função de eixo e nos microtúbulos citoplasmáticos pela ligação às tubulinas alfa e beta (ZHANG *et al*, 2007). A griseofulvina é administrada por via oral. Pode ser utilizada para o tratamento das infecções da pele ou unhas, porém devido à sua baixa afinidade por queratina, o tratamento precisa ser muito prolongado (RANG *et al.*, 2001).

As alilaminas exibem um amplo espectro de atividade antifúngica contra dermatófitos como *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurcanis* e *Epidermophyton floccosum*. A classe também tem ação fungistática contra *Candida* spp. Os fármacos agem pela inibição da esqualeno epoxidase que é uma enzima essencial na síntese do ergosterol. As alilaminas são seletivas, tendo pequeno efeito no colesterol humano. Os principais fármacos representantes do grupo são a

naftifina e a terbinafina (ZHANG *et al*, 2007). A categoria apresenta ação fungicida contra dermatófitos, sem registro de desencadeamento de resistência fúngica, e é bem tolerada, sendo relatados efeitos adversos do tipo vermelhidão e sensação de queimadura em 2 a 3% dos pacientes (ODOM, 1997). As benzilaminas são outra classe de antifúngicos, estruturalmente similares às alilaminas (ZHANG *et al*, 2007). O representante desta classe é o cloridrato de butenafina, cujas informações detalhadas estão no item 2.1.

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. São efetivos contra várias espécies de *Candida* spp e de *Aspergillus* spp. Sua ação ocorre através da inibição não competitiva da síntese de 1,3- β -glicanos, um componente essencial na parede celular fúngica. Alguns componentes deste grupo são a caspofungina e a micafungina (ZHANG *et al*, 2007).

Os agentes antifúngicos tópicos em geral se acumulam na pele, que em alguns casos, bloqueia a transferência desses para a circulação sanguínea quase completamente. Portanto, a aplicação tópica é considerada um excelente método de administração de agentes antifúngicos, do ponto de vista de segurança, sendo que sua eficácia terapêutica irá depender de sua concentração no sítio infectado. O tratamento antifúngico tópico é geralmente preferível em relação à terapia sistêmica devido à menor incidência de reações adversas (RANG *et al.*, 2001).

Um agente tópico ideal para infecções fúngicas superficiais deve ter um amplo espectro de atividade, ser eficaz em baixas concentrações, possibilitar esquemas de dosagens convenientes, possuir mais atividade fungicida do que fungistática, ter alta afinidade pelo estrato córneo, ser bem tolerado, não ser sensibilizante, apresentar baixa incidência de recidivas, evitar o desenvolvimento de resistência fúngica e ter baixo custo (ODOM, 1997).

Para a maioria das infecções por *Tinea* algumas medidas podem ser tomadas para evitar reinfecção. A reinfecção por *Tinea cruris* pode ser reduzida pelo uso de roupas íntimas largas de algodão. Redução de peso, limpeza e secagem da área afetada e uso de pó absorvente podem ajudar na redução da probabilidade de reinfecção. Nas infecções por *Tinea pedis*, os pés devem ser limpos regularmente e completamente secos antes do uso de meias e sapatos. As unhas devem ser mantidas curtas e limpas (GUPTA *et al*, 1998).

2.1. Cloridrato de Butenafina

O cloridrato de butenafina exibe atividade antifúngica de amplo espectro, particularmente contra dermatófitos, *Aspergillus*, fungos dimórficos e fungos dematiáceos. O fármaco foi introduzido na terapêutica no Japão nos anos 90 para o tratamento de *Tinea pedis*, *Tinea cruris*, *Tinea corporis* e *Tinea vesicolor*, bem como para infecções cutâneas por *Candida*. Testes clínicos conduzidos no Japão, em mais de 300 pacientes, demonstraram a alta eficácia associada à baixa incidência de efeitos adversos. O fármaco foi aprovado para o uso no mercado americano em 1997. O uso de BTF tópica a 1% tem sido eficaz para *Tinea pedis*, *Tinea corporis* e *Tinea cruris* em testes clínicos randomizados, quando administrada por curta duração. Sua eficácia contra *Pityriasis versicolor*, dermatite seborréica e como agente anti-*Candida* ainda não foi completamente estabelecida (SINGAL, 2008).

O cloridrato de butenafina é quimicamente designado como N-4-terc-butilbenzil-N-metil-1-naftalenemetilamina cloridrato. Sua estrutura química é semelhante à da classe das alilaminas, porém um grupamento butilbenzil substitui o grupamento alilamina. Essa modificação reduz a tensão superficial na molécula e contribui para uma melhor atividade antimicótica em relação à naftifina e à terbinafina (SINGAL, 2008). O composto possui fórmula molecular $C_{23}H_{27}N.HCl$, com peso molecular de 353,93 g/mol e estrutura química apresentada na Figura 2. Apresenta-se sob forma de pó cristalino branco e inodoro. É livremente solúvel em metanol, etanol e clorofórmio e esparsamente solúvel em água (BUDAVARI, 1996; DRUG LABEL SECTIONS, 2007). Na DCB atual possui registro como base sob n. 2241.01-3 (DCB, 2006).

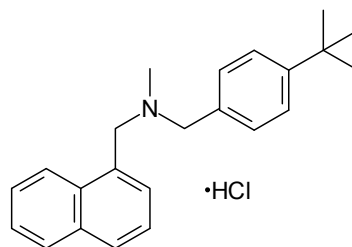


Figura 2. Estrutura química do cloridrato de butenafina.

O cloridrato de butenafina é um derivado benzilamina e seu modo de ação é semelhante ao dos demais fármacos antifúngicos pertencentes à classe das alilaminas. A molécula atua inibindo a epoxidação do esqualeno, de modo a bloquear a biosíntese do ergosterol, composto essencial para a membrana celular

fúngica, conforme Figura 1 (BRENNAN & LEYDEN, 1997). Constatou-se posteriormente que o fármaco possui, além da ação antifúngica, atividade anti-inflamatória *in vivo*, promovendo redução do eritema induzido por radiação UVB (NAHM *et al.*, 1999).

O cloridrato de butenafina foi introduzido no Brasil, no ano de 2007, pela empresa Brainfarma associada à Mantecorp, na forma de creme dermatológico, sob nome comercial de Tefin (BRASIL, 2006b, 2007). Anteriormente, a empresa Allergan Prod. Farm. Ltda. possuía registro para o medicamento, mas o mesmo caducou sem que o produto fosse lançado no mercado nacional (BRASIL, 2006a). No mercado americano, o fármaco pode ser encontrado sob forma de creme dermatológico (Mentax[®] da Bertek Pharmaceuticals e Lotrimin Ultra[®] da Schering-Plough), contendo 1% do fármaco, sendo apenas para uso externo (NEWTON & POPOVICH, 2004).

No que se refere à análise qualitativa e quantitativa do cloridrato de butenafina, não há praticamente literatura disponível em idioma ocidental. KOSHIKAWA e colaboradores (1992) publicaram trabalho em japonês apresentando algumas propriedades físico-químicas e estabilidade do cloridrato de butenafina. Do resumo, apreende-se que o fármaco, no estado sólido, possui boa estabilidade frente ao calor, umidade, luz ambiente, luz solar e UV, mas que a molécula em solução não é estável sob luz UV. LING e colaboradores (2000) publicaram, em chinês, estudo sobre determinação de butenafina na forma farmacêutica creme empregando CLAE e WU e colaboradores (2006) desenvolveram formulação e determinaram, também pelo método de CLAE, o conteúdo de cloridrato de butenafina em creme a 2% contendo 20% de uréia. Este artigo também se encontra disponível somente em chinês. Já TANUMA e colaboradores (2001) relatam, sucintamente, um método de análise, também por CLAE, para determinação do fármaco no estrato córneo, após aplicação tópica do medicamento.

No resumo do artigo de KOSHIKAWA e colaboradores (1992) há um breve relato sobre duas substâncias relacionadas: 1-naftalenometanol e 1-(clorometil)-naftaleno; bem como sobre um possível produto de degradação, N-metil-N-(1-naftalenilmetil)-1-naftalenemetanamina, sob forma de cloridrato. Em 2006, LING e colaboradores publicam, também em chinês, um artigo sobre a determinação do fármaco e de substâncias relacionadas na forma farmacêutica creme por CLAE.

No artigo de ARIKA e colaboradores (1993) está descrita determinação da presença de butenafina¹⁴C após aplicação de solução tópica, sob oclusão, em diferentes camadas da pele de cobaio. Os resultados demonstraram que a butenafina é acumulada em altas concentrações na epiderme (incluindo o estrato córneo) e apresenta um prolongado tempo de retenção, conferindo atividade terapêutica residual após o término do tratamento (SINGAL, 2008). Baixas concentrações de radioatividade foram localizadas a nível de glândulas sebáceas e de folículos capilares, sugerindo que a BTF penetra em menor quantidade na derme através destas vias. De acordo com Lesher (1997), o fármaco apresenta baixa absorção sistêmica após aplicação tópica.

Nenhuma farmacopéia internacional apresenta, até o momento, monografia para o cloridrato de butenafina.

3. Validação de métodos analíticos

A necessidade de se demonstrar a qualidade de medições químicas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, é cada vez mais reconhecida e exigida pelas agências reguladoras. Dados analíticos não-confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas, resultando em prejuízos financeiros para as companhias e sanitários para a população. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, deve-se submetê-lo a uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação é um processo pelo qual se estabelece, por meio de estudos experimentais, que um método é apropriado para as aplicações analíticas pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Para o registro de novos produtos, as agências reguladoras do Brasil e de outros países exigem a validação de métodos analíticos e, para isso, a maioria delas tem estabelecido guias e resoluções com diretrizes a serem adotadas no processo. No Brasil, o assunto é regulamentado por uma resolução (BRASIL, 2003) com poder de lei. As guias, em contrapartida, são documentos que sugerem uma linha a ser seguida, e são, portanto, abertos para interpretação (RIBANI *et al.*, 2004).

É importante destacar que não há um modelo único para executar a validação de métodos analíticos aplicados a fármacos e medicamentos. A grande variedade de substâncias, formas farmacêuticas e técnicas tornam impossível estabelecer um

sistema de validação universal. As guias são recomendações e, portanto, intencionalmente flexíveis para permitir aos analistas adaptá-las de acordo com a situação. Por conseguinte, no desenvolvimento de um método, é importante um bom planejamento onde sejam avaliados os requerimentos legais, a técnica escolhida e a finalidade do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Diferentes grupos têm definido os parâmetros analíticos para validação. Na tentativa de harmonizar as divergências encontradas entre as definições, representantes das indústrias e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão, por meio da ICH (International Conference on Harmonisation), definiram os parâmetros e requerimentos para a validação de métodos analíticos para produtos farmacêuticos (ICH, 1994, 1996, 2005). As diretrizes contidas nas guias publicadas pela ICH são quase integralmente adotadas na Farmacopéia Americana (USP, 2008) e no texto da Resolução Específica nº 899/2003 (BRASIL, 2003).

Os parâmetros analíticos, ou características de desempenho, tipicamente avaliados durante o processo de validação são: especificidade, linearidade e faixa de trabalho, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação da substância em análise e robustez (BRASIL, 2003).

Os procedimentos descritos em monografias farmacopeicas podem variar de determinações analíticas de alta exatidão a avaliações subjetivas de características físicas. Considerando esta variedade de ensaios, diferentes esquemas de validação podem ser requeridos para diferentes métodos, sendo estes classificados em categorias, de acordo com sua aplicação (BRASIL, 2003; USP, 2008):

- Categoria I: métodos analíticos para determinação da substância ativa em matérias-primas ou medicamentos;
- Categoria II: métodos analíticos para determinação de impurezas e produtos de degradação em matérias-primas ou medicamentos;
- Categoria III: métodos analíticos para determinação de características de desempenho do medicamento (dissolução, por exemplo);
- Categoria IV: testes de identificação.

A avaliação de diferentes parâmetros é requerida para cada categoria, conforme indicado na Tabela 1 (BRASIL, 2003; USP, 2008).

Tabela 1 Ensaio necessários para a validação de método analítico, segundo sua finalidade (Fonte: BRASIL, 2003).

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 Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
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.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

A validação de métodos bioanalíticos é um processo utilizado para estabelecer que o método quantitativo analítico seja adequado para a aplicação biomédica em questão (CAUSSON, 1997). Para isso é necessária uma avaliação consistente de parâmetros analíticos chave, tais como exatidão, precisão, especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade (CDER/FDA, 2001). A determinação de analitos em matrizes biológicas é sujeita a tantas variáveis que o método analítico não está realmente validado até que seja aplicado com sucesso em pelo menos um estudo (CAUSSON, 1997).

4. Estabilidade de fármacos e medicamentos

Os estudos de estabilidade são justificados por razões sanitárias, econômicas e legais. Quanto à razão sanitária, o fato de um fármaco ser inócuo não significa necessariamente que seu produto de degradação também o será. Tendo em vista o motivo legal, este exige que todos os medicamentos cumpram com as condições de identidade, efetividade, potência, pureza e inocuidade durante o período em que se encontram no mercado e até o momento de seu uso. Já os motivos econômicos são embasados no fato de que um medicamento que não possui a dose indicada, pode não gerar os efeitos desejados ou no caso das características organolépticas não apropriadas, o próprio paciente evita o uso do produto (NUDELMAN, 1975).

A previsão da estabilidade de um produto farmacêutico é realizada através de testes de longa duração e estabilidade acelerada, conforme regulamentado, no Brasil, pela atual RE nº 1 de 29 de julho de 2005 da ANVISA (BRASIL, 2005), a qual é uma adaptação, para nossa zona climática, do guia elaborado pela ICH (ICH, 2003). Os estudos de estabilidade acelerada são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações de características da forma farmacêutica, empregando condições de estresse de armazenamento (luz, calor, umidade), com o propósito de monitorar o decaimento do analito, as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento, através das leis de cinética química (REYNOLDS *et al.*, 2002; KLINK *et al.*, 2005). Entretanto, estes estudos não dispensam a realização de estudo de estabilidade de longa duração.

No Brasil, a maioria das empresas farmacêuticas multinacionais e nacionais importa o fármaco sintetizado em outros países e procede a sua inserção numa forma farmacêutica, na grande maioria das vezes, sem o suficiente conhecimento dos possíveis produtos de degradação. Além disso, o Brasil está inserido numa zona climática denominada IV, quente e úmida, diferente da zona onde estão inseridos Estados Unidos, Japão e Europa. Considerando-se que os ensaios de estabilidade são pertinentes à temperatura do país, todos os ensaios devem ser realizados sob os nossos aspectos climáticos, onde ocorre acentuada variação de temperatura e umidade, entre as regiões durante todo o ano. Além dos fatores extrínsecos à formulação, como umidade, incidência de luz e temperatura, é necessário também

avaliar a influência dos excipientes na estabilidade do produto, bem como conhecer os produtos de degradação que eventualmente podem se formar durante o prazo de utilização do medicamento.

O acompanhamento da estabilidade de fármacos e medicamentos requer o emprego de métodos de análise específicos, que não sofram interferência dos produtos de degradação, e que estejam validados para tal utilização.

5. Quantificação de fármacos na pele - testes *in vitro*

A pele cobre uma área de aproximadamente 2 m² e atua como barreira protetora contra ataques físicos, químicos, microbiológicos e de raios ultravioleta, mantém a temperatura corporal, impede a perda de água, além de possuir funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato) (HADGRAFT, 2001). A pele é composta principalmente por duas partes: externamente a epiderme, seguida da derme, conforme Figura 3. A derme contém capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos capilares e nervos. A epiderme possui estrutura multilamelar, que representa os diferentes estágios de diferenciação celular. A partir da camada proliferativa basal até a camada mais externa, as células sofrem mudanças, de metabolicamente ativas e em divisão para células queratinizadas, funcionalmente mortas e densas, sendo que estas últimas estão cercadas por bicamadas lipídicas multilamelares e constituem a parte mais externa da pele chamada de estrato córneo, principal responsável pela função barreira do órgão (MOSER *et al*, 2001).

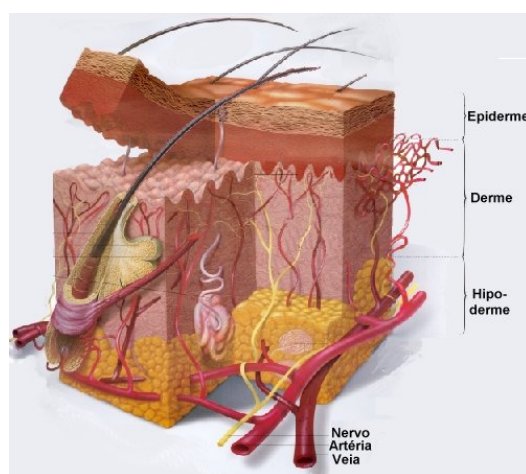


Figura 3. A pele com suas três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: <http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/images/pele3d.jpg>

Medicamentos aplicados via tópica sobre a pele podem ser divididos em duas categorias: de ação local e de ação sistêmica. A ação local pode ocorrer na pele ou sobre a superfície da mesma (estrato córneo) e também na epiderme e/ou derme. Formulações de ação local incluem cremes, géis, pomadas, pastas, suspensões, loções, espumas, sprays, aerossóis e soluções. Já os produtos aplicados na pele visando à ação sistêmica são, principalmente, os adesivos transdérmicos ou sistemas de liberação transdérmica de fármacos (USP, 2009a; USP, 2009b). A liberação de fármacos por via transdérmica possui uma série de vantagens para alguns fármacos em relação a outras vias de administração: evita o efeito de primeira passagem no intestino e a metabolização no fígado, possui menor risco de efeitos colaterais com reduzido risco de toxicidade e é uma via de fácil administração (DE PAULA, 2008).

Permeação cutânea é a passagem de uma substância pela pele, chegando até suas camadas mais profundas, inclusive circulação sanguínea. Testes para determinação da permeação cutânea de formulações transdérmicas são importantes para determinação de sua eficácia. Já para produtos dermatológicos, a determinação da quantidade de fármaco capaz de chegar à circulação não tem influência direta no efeito terapêutico. No entanto, a extensão da possível absorção sistêmica é um dado importante quanto à segurança e possíveis efeitos colaterais de formulações tópicas (BEMVINDO, 2006).

Como os produtos dermatológicos tratam doenças nas diferentes camadas da pele ou em apêndices cutâneos, sua eficácia depende da concentração do fármaco nesses locais (PERSHING *et al*, 1994; ALBERTI *et al*, 2001a; ALBERTI *et al*, 2001b). A presença do fármaco na pele depende da liberação do mesmo da formulação (ALBERTI *et al*, 2001a), sendo fatores críticos o veículo utilizado e o modo de preparo do mesmo. Após a liberação da formulação, a penetração através do estrato córneo irá determinar a disponibilidade local do fármaco (BEMVINDO, 2006). Existem diferentes rotas pelas quais os fármacos cruzam o estrato córneo: intercelular, transcelular e por meio de apêndices (podendo ser através das glândulas sudoríparas ou folículos pilosos). Em condições normais a penetração pela rota dos apêndices não é muito significativa, em parte, devido à baixa superfície ocupada pelos mesmos. As duas demais rotas de permeação através do estrato córneo são intercelular (passagem do fármaco entre as células pela matriz lipídica

intercelular) e transcelular (a passagem do fármaco ocorre também através das células) (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al*, 2001), sendo que a principal via de penetração cutânea é a intercelular (HADGRAFT, 2001; MOSER *et al*, 2001; HADGRAFT, 2004). Uma representação esquemática das vias de penetração cutânea pode ser visualizada na Figura 4.

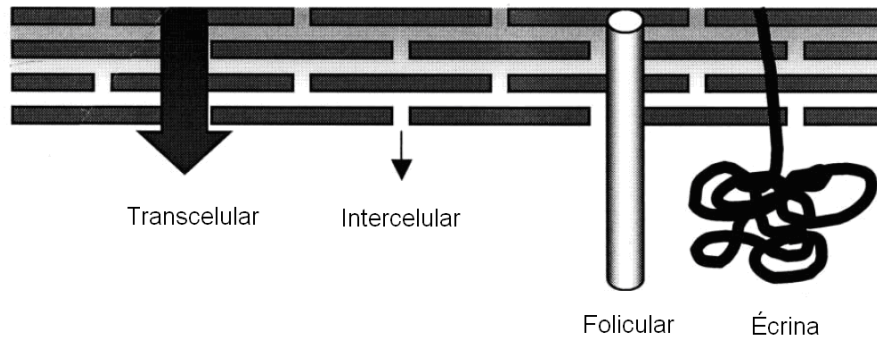


Figura 4. Representação esquemática da pele (estrato córneo) mostrando as diferentes rotas de penetração. Adaptado de HADGRAFT, 2001.

Uma série de fatores biológicos pode alterar a permeabilidade da pele, como o estado da pele (presença de alguma patologia), a idade da pele, o fluxo sangüíneo e o metabolismo. Fatores físico-químicos também apresentam grande influência no processo de passagem de uma substância através da pele. A hidratação do estrato córneo é um dos mais importantes fatores para aumentar a velocidade de penetração da maioria das substâncias. A hidratação pode resultar da água difundindo das camadas epidérmicas adjacentes ou da transpiração que se acumula após aplicação de um veículo oclusivo. Entre as características do fármaco que afetam a taxa de penetração estão o coeficiente de partição, o coeficiente de difusão, o tamanho e a forma molecular (AULTON, 2005).

Nesse contexto, o uso de experimentos de penetração cutânea *in vitro* se tornou um dos estudos mais relevantes na área dermatológica (DE PAULA, 2008). Idealmente, testes para avaliação da penetração e permeação de produtos de aplicação tópica devem ser feitos *in vivo*. No entanto, isso é freqüentemente impossível, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento, quando a toxicidade dos ativos e excipientes ainda não foi bem documentada. Experimentos *in vitro* ou *ex-vivo* têm sido empregados, devido ao considerável número de exigências associadas aos protocolos *in vivo* (BEMVINDO, 2006). Atualmente o modelo mais aceito é o emprego da pele suína em substituição à pele humana, devido à maior

semelhança histológica quando comparado a outros modelos (TOUTOI *et al.*, 1998; MOSER *et al.*, 2001; SCHMOOK *et al.*, 2001). Os estudos sobre a penetração cutânea de fármacos são extremamente importantes na otimização e desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação, dérmicas e transdérmicas (LEVEQUE *et al.*, 2004) e também para comparar produtos genéricos com inovador. A célula de difusão de Franz é o dispositivo padrão para a avaliação da permeação através da pele, sendo constituída de um compartimento doador e um receptor, separados por uma amostra de pele, conforme Figura 5 (OECD, 2004; DE PAULA *et al.*, 2008; USP, 2009a). A formulação é colocada sobre a pele, no compartimento doador, e o compartimento receptor é preenchido com meio onde o fármaco tenha condição sink garantida, sem degradar o tecido cutâneo. A homogeneidade deste meio é garantida por agitação magnética e as amostras são retiradas em tempos pré-determinados pela injeção de solução receptora (SR) no braço de reposição e coleta de meio no braço de amostragem. A temperatura da célula é mantida pela camisa dupla.

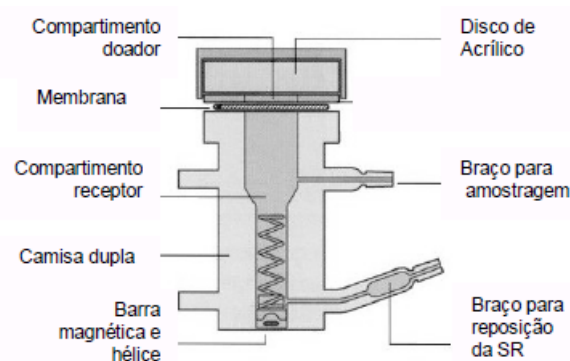


Figura 5. Célula de difusão de Franz. Adaptado de: HANSON RESEARCH, 2004; BENVINDO, 2006.

6. Referências

ALBERTI, I.; KALIA, YN; NAIK, A; BONNY, JD; GUY, RH. *In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. Journal of Controlled Release*, v. 71, p. 319-327, 2001a.

ALBERTI, I.; KALIA, YN; NAIK, A; BONNY, JD; GUY, RH. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, *in vivo. International Journal of Pharmaceutics*, v. 219, p. 11-19, 2001b.

ARIKA T, HASE T, YOKOO M, MAEDA T, AMEMIYA K AND YAMAGUCHI H. Effects of butenafine hydrochloride, a new benzylamine derivative, on experimental dermatophytosis in guinea pigs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.34, n.11, p.2250-2253, 1990.

ARIKA, T., HASE, T., YOKOO,M. Anti-*Trichophyton mentagrophytes* activity and percutaneous permeation of butenafine in guinea pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, n.2, p.363-365, 1993.

AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AZULAY, R.D. & AZULAY, D.R. *Dermatologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

BARBERO, AM & FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review. *Toxicology in Vitro*, v. 23, p. 1-13, 2009.

BEMVINDO, C.S. *Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRJ, 2006.

BRENNAN, B. & LEYDEN, J.J. Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents. *Journal of American Academy Dermatology*, v. 36, n. 2, p. S3-S8, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. *Diário Oficial da União*, Brasília, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. *Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade*. *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1697, de 02 de junho de 2006. *Concede [...] Caducidade de Registro de Medicamento [...]*. *Diário Oficial da União*, Brasília, Poder Executivo, de 05 de junho de 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 2487, de 04 de agosto de 2006. *Concede Registro de Medicamento Novo [...]. Diário Oficial da União*, Brasília, Poder Executivo, de 14 de agosto de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/monitora/cmed/pleito_precos.pdf> Acesso em 12/03/2007.

BUDAVARI (Ed.) *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 12. ed. Whitehouse Station, N. J.: Merck e Co. Inc., 1996. p. 1553.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v. 689, p.175-180, 1997.

CDER/FDA. Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*, 2001.

DCB. Denominação Comum Brasileira 2006. São Paulo: Febrapharma, 2006.

DE PAULA, D., MARTINS, C.A., AND BENTLEY, M.V.L.B. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. *Biomedical chromatography*, v.22, p.1416–1423, 2008.

DRUG LABEL SECTIONS. Disponível em <<http://www.dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=511>> Acesso em 01/3/2007.

GUPTA AK; EINARSON TR; SUMMERBELL RC AND SHEAR NH. An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses. A North American perspective. *Drugs*, v.55(5), p.645-674, 1998.

GUPTA AK; RYDER, JE; CHOW, M., COOPER, EA. Dermatophytosis: the management of fungal infections. *Skinmed*, v.4, n.5, p.305-310, 2005

GUPTA AK & TU LQ. Dermatophytes: Diagnosis and treatment. *Journal of American Academy Dermatology*, V. 54 (6), p.1050-1055, 2006.

GIMENO-CARPIO, E. Tratamiento tópico de las micosis cutâneas superficiales. *Medicina clínica (Barcelona)*, v.126(1), p. 43-46, 2006.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 224, p. 1-18, 2001.

HADGRAFT, J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 291-299, 2004.

HAINER, B., L. Dermatophyte Infections. *American Family Physician*, v.67, n.1, p.101-108, 2003.

HANSON RESEARCH. *Manual Diffusion Cell*. Operation Manual 58-001-802 – Rev.A. Chatsworth, 2004.

HAY, R. Superficial fungal infections. *Medicine*, v: 33(4), p.89-90, 2005.

ICH. International Conference on Harmonisation. *Text on validation of analytical procedures (Q2A)*. Geneva: ICH Secretariat, 1994. p.1-5.

ICH. International Conference on Harmonisation. *Text of analytical procedures: methodology (Q2B)*. Geneva: ICH Secretariat, 1996. p.1-8.

ICH. International Conference on Harmonisation. *Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A (R2)*. Geneva: ICH Secretariat, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Geneva: ICH Secretariat, 2005.

JACOBI U., KAISER M., TOLL R., MANGELSDORF S., AUDRING H., OTBERG N., STERRY W. AND LADEMANN J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*, v.13, p.19–24, 2007.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, O.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDIN, T.; DEBETS, A.; CRIEND, C.; BELD, C.; SONSEN, G.; JONG, G. Toward a generic approach for stress testing and drug products. *Pharmaceutical Technology*, V.29, N.2, p. 48-66, 2005.

KOSHIKAWA, S.; YAMASHITA, I.; SONODA, R.; WATANABE, N.; OHTANI, I.; TANJI, S.; MAEDA, T.; ISHIYAMA, N.; TAKASE, M. Chemical structure, physicochemical properties and stability of butenafine hydrochloride. *Iyakuin Kenkyu*, v. 23, p. 533-46, 1992. Disponível em SciFinder Scholar CAN 118:154264, 1993. Abstract.

LESHER JL, BABEL DE, STEWART DM, JONES TM, KAMINESTER L, GOLDMAN M, WEINTRAUB JS. Butenafine 1% A multicenter, cream in the treatment of tinea cruris: vehicle-controlled, double-blind trial. *Journal of American Academy Dermatology*, v. 36, p. S20-S24, 1997.

LEVEQUE, N.; MAKKI, S.; HADGRAFT, J.; HUMBERT, Ph. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v.269, p.323-328, 2004.

LING, Y.; BAO, Y.; ZAI, H.; ZHANG, Y.; ZHAN, W. Determination of butenafine in creams by HPLC. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, v. 20, p 333-334, 2000. Disponível em SciFinder Scholar CAN 133:168500, 2000. Abstract.

LING, S.; JIE, D.; GONG, W. RP-HPLC determination of content and related substances in butenafine hydrochloride cream. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 26, p. 463-465, 2006. Disponível em SciFinder Scholar CAN 147:173907, 2007. Abstract.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 52, p. 103-112, 2001.

NAHM, W.; ORENKO, I.; ROSEN, T. The antifungal agent butenafine manifests anti-inflammatory activity *in vivo*. *Journal of American Academy Dermatology*, v. 41, p. 203-206, 1999.

NEWTON, G.D. & POPOVICH, N. Fungal skin infections. In: BERARDI, R.R. (Ed.) *Handbook of Nonprescription Drugs*. 14. ed. Washington: American Pharmacists Association, 2004.

NUDELMAN, N., S. *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: El Atheneo, 1975, p.135.

ODOM, R.B. Update on topical therapy for superficial fungal infections: focus on butenafine. *Journal of American Academy Dermatology*, v. 36, n. 2, p. S1-S2, 1997.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development: Skin absorption: *in vitro* method, test guideline No 428. *Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris, OECD, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, K.M. HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*, February, p. 48-56, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

SCHMOOK, F., P.; MEINGASSNER, J., G.; BILLICH, A. Comparision of human skin or epidermis models with human and animal skin in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceuticals*, v.215, p.51-56, 2001.

SINGAL A. Butenafine and superficial mycoses: current status. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v.4, n.7, p.999-1005, 2008.

TANUMA, H.; DOI, M.; OHTA, Y.; ABE, M.; KUME, H.; MUKAI, H.; KATSUOKA, K. Butenafine hydrochloride (Mentax) cream for the treatment of hyperkeratotic type tinea pedis and its transfer into the horny layer, with or without concomitant application of 20% urea ointment (Keratinamin). *Mycoses*, v. 44, p 287-299, 2001.

TOUITOU, E., MEIDAN, V.,M., HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release*, v.56, p. 7-21, 1998.

VERMOUT S, TABART J, BALDO A, MATHY A, LOSSON B, MIGNON B. Pathogenesis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, v. 166, p. 267–275, 2008.

USP. Topical and transdermal drug products. *Pharmacopeial Forum*, v.35, n.3, p.750-753, 2009a.

USP. Topical and transdermal drug products – product quality tests. *Pharmacopeial Forum*, v. 35, n.3, p.1-10, 2009b.

USP 31. *THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 31th ed.* Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

WAGNER, H.; KOSTKA, K-H.; LEHR, C-M.; SCHAEFER, U.F. Drug distribution in human skin using two different *in vitro* test systems: comparison with *in vivo* data. *Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 1475-1481, 2000.

WEITZMAN I & SUMMERBELL RC. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, n.2, p.240–259, 1995.

WEINSTEIN, A. & BERMAN, B. Topical treatment of common superficial tinea infections. *American Family Physisician*, v.65, n.10, p.2095-2102 , 2002

WU, L., MA, L., CHEN, J. Preparation and determination of coumpound butenafine hydrochloride cream. *Huaxi Yaoxue Zazhi*, v.21, p. 394-396. Disponível em SciFinder Scholar CAN 146:468954, 2006. Abstract.

ZHANG, A.Y., CAMP, W.L., ELEWSKI, B.E. Advances in topical and systemic antifungals. *Dermatologic Clinics*, v.25, p.165-183, 2007.

CAPÍTULO I. Caracterização do padrão, desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para análise do cloridrato de butenafina em forma farmacêutica semi-sólida e estudo de estabilidade

1. Introdução

Na cromatografia líquida a separação física é conduzida com uma fase líquida. Os componentes que constituem a amostra são separados pela sua distribuição entre a fase móvel (fluido em movimento) e a fase estacionária (partículas sólidas empacotadas em uma coluna) (SKOOG *et al*, 2004; DONG, 2006). São interações físicas e químicas dos componentes da amostra com as duas fases que são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na intensidade dessas forças determina a resolução e, portanto, a separação dos solutos individuais.

Os principais mecanismos de separação utilizados na CLAE incluem: cromatografia em fase normal (ou cromatografia de adsorção) que é baseada na adsorção/dessorção do analito na fase estacionária polar; cromatografia em fase reversa, cuja separação é baseada no coeficiente de partição entre uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar; cromatografia por troca iônica que é baseada na presença de grupamentos iônicos na fase estacionária, sendo que estes podem ser trocadores de cátions ou de ânions e cromatografia por exclusão, cuja separação é baseada no tamanho das moléculas dos componentes da amostra (DONG, 2006).

Entre as vantagens da CLAE estão: análise quantitativa rápida e precisa, operação automatizada, sensibilidade de detecção, recuperação quantitativa da amostra e a aplicabilidade da técnica a diversas amostras. Entre as limitações da metodologia incluem-se ausência de detector universal, menor eficiência de separação que a cromatografia gasosa capilar e necessidade de treinamento do analista, já que a metodologia possui muitos parâmetros de análise (DONG, 2006).

Desde o primeiro método por CLAE descrito em uma farmacopéia (Farmacopéia Americana) em 1980, a velocidade de propagação desta metodologia não possui precedente na história das análises farmacêuticas (GÖRÖG, 2008). Este é o principal método (juntamente com método de cromatografia em camada delgada) para a análise de impurezas orgânicas relacionadas e para análise indicativa de estabilidade aplicada a fármacos presentes em formulações, contribuindo para uma maior segurança no uso de medicamentos (RAHMAN *et al*, 2006; GÖRÖG, 2008). O uso amplo da metodologia em estudos de estabilidade é devido a sua sensibilidade,

especificidade e alta capacidade de resolução (BAKSI & SINGH, 2002). A CLAE é uma técnica bem estabelecida como ferramenta efetiva no controle de processo e na análise de matéria-prima e produto acabado (RAO & NAGARAJU, 2003).

Neste contexto, o objetivo do presente capítulo foi o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade por CLAE para a quantificação de cloridrato de butenafina em formulação semi-sólida, bem como aplicação da metodologia em um estudo de cinética de degradação do fármaco frente à luz. Previamente a realização destes estudos, foram desenvolvidos métodos qualitativos e quantitativos para a análise do cloridrato de butenafina utilizado como substância química de referência, visando a sua caracterização e verificação da adequação do mesmo para os estudos propostos.

2. Produtos Farmacêuticos e Material de Referência

Produtos Farmacêuticos

O creme dermatológico Tefin foi adquirido em estabelecimento local, já que encontra-se disponível no Brasil desde 2007. Sua produção é realizada pela empresa Mantecorp Ind. Quim. Farm. Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O medicamento é composto de 1 % (*p/p*) de cloridrato de butenafina e dos seguintes excipientes: álcool benzílico, álcool etílico, álcool cetílico, benzoato de sódio, cera autoemulsionante, edetado dissódico, estearato peg-40, petrolato líquido, polissorbato 60, propilenoglicol, simeticona, petrolato branco, hidróxido de sódio e água. Para a parte inicial deste trabalho (desenvolvimento de método por CLAE, estudo de estabilidade e eletroforese capilar) foi utilizado o lote: 705. Já para a parte final deste trabalho (validação de método por CLAE para a quantificação de fármaco na pele e estudo comparativo entre duas formulações) foi utilizado o lote 901.

Para o estudo comparativo de permeação cutânea entre duas formulações foi utilizado o creme dermatológico Lotrimin Ultra[®] adquirido no mercado americano. O medicamento é produzido pela Schering-Plough HealthCare Products Inc. (Estados Unidos) e encontra-se disponível na composição de 1 % (*p/p*) de cloridrato de butenafina e dos excipientes: álcool benzílico, álcool cetílico, dietanolamina, glicerina, monoestearato de glicerila SE, polioxietileno (23) de éter cetílico,

propilenoglicol dicaprilato, água purificada, benzoato de sódio, ácido esteárico e petrolato branco. O lote utilizado foi o 9MO2DA.

Material de Referência:

O cloridrato de butenafina, caracterizado macroscopicamente como um pó cristalino branco e inodoro, foi doado pela empresa Mantecorp Ind. Quim. Farm. Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).

2.1 Caracterização do cloridrato de butenafina - substância química de referência (SQR):

A pureza das substâncias utilizadas como referência é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Assim sendo, devem ser utilizados materiais de referência com pureza documentada e bem caracterizados para o estudo de validação (ICH, 2005; MATHKAR *et al*, 2009). Neste contexto, a parte inicial deste capítulo enfoca a análise qualitativa e quantitativa da BTF SQR, sendo que a primeira inclui: caracterização da BTF SQR através da determinação da solubilidade, análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC), da espectrofotometria na região do infravermelho (IV), bem como o desenvolvimento de método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação do cloridrato de butenafina no produto dermatológico Tefin. A parte quantitativa inclui a análise do teor da BTF SQR através de titulação potenciométrica.

2.1.1 Análise Qualitativa:

Solubilidade

A determinação da solubilidade da BTF SQR foi realizada para verificar quais solventes poderiam ser utilizados como diluentes nos métodos a serem desenvolvidos. Esta avaliação foi realizada conforme F. Bras. IV, 1988, porém ao invés da pesagem de 1g de fármaco, foram utilizados 100 mg. Os solventes utilizados para a verificação da solubilidade foram: etanol, metanol, água pH neutro,

acetonitrila, acetona, diclorometano, hexano, ácido acético, ácido clorídrico 0.1 M e *n*-propanol, mantidos à temperatura ambiente. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico. O solvente utilizado e a solubilidade observada podem ser verificados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Determinação da solubilidade da BTF SQR, conforme F. Bras. IV, 1988.

Solvente	Solubilidade
Etanol	Solúvel
Metanol	Facilmente solúvel
Água pH neutro	Muito pouco solúvel
Acetonitrila	Pouco solúvel
Acetona	Muito pouco solúvel
Diclorometano	Ligeiramente solúvel
Hexano	Muito pouco ou insolúvel
Ácido Acético	Facilmente solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Muito pouco ou insolúvel
<i>n</i> -propanol	Ligeiramente solúvel

Calorimetria Exploratória Diferencial

As análises foram realizadas em um calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimatzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Foram pesados aproximadamente 2 mg de BTF em porta amostra de alumínio com capacidade para 4 µl, o qual foi selado e inserido no equipamento de DSC. A análise foi efetuada sob atmosfera inerte de nitrogênio mantida sob fluxo de 50 ml/min e velocidade de aquecimento de 10°C/min até 220°C. Esta técnica compara e avalia diferenças no fluxo de calor entre uma referência (porta-amostra selado vazio) e a substância em análise enquanto ambas são submetidas ao programa de temperatura controlada.

O termograma indicou a faixa de fusão compreendida entre 212,4°C e 221,3°C, com pico em 217,5°C, conforme Figura 1.1. A BTF SQR apresentou transição endotérmica, ou seja, a amostra absorve calor (91,83 J/g) para fundir.

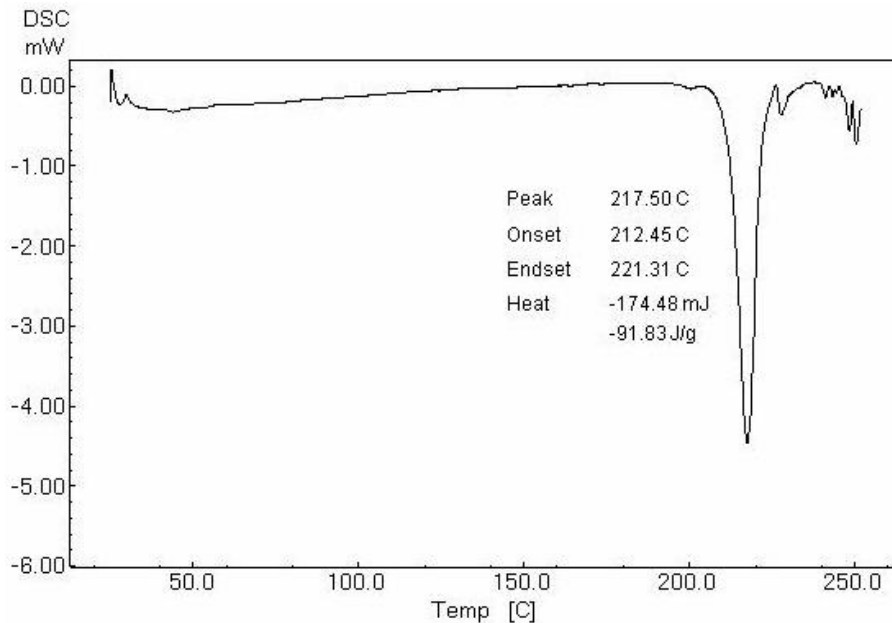


Figura 1.1. Curva de aquecimento obtida por DSC para a BTF SQR.

Espectrofotometria na Região do Infravermelho

O espectro na região do infravermelho da BTF SQR foi obtido através da preparação de uma pastilha contendo 150 mg de KBr e 1,5 mg do fármaco previamente dessecado a 105 °C por duas horas. A análise foi realizada em espectrofotômetro FTIR, marca Shimadzu, modelo 8001. O espectro no infravermelho da BTF pode ser verificado na Figura 1.2. e na Tabela 1.2. estão descritas as atribuições para as principais bandas referentes aos grupos funcionais característicos da molécula.

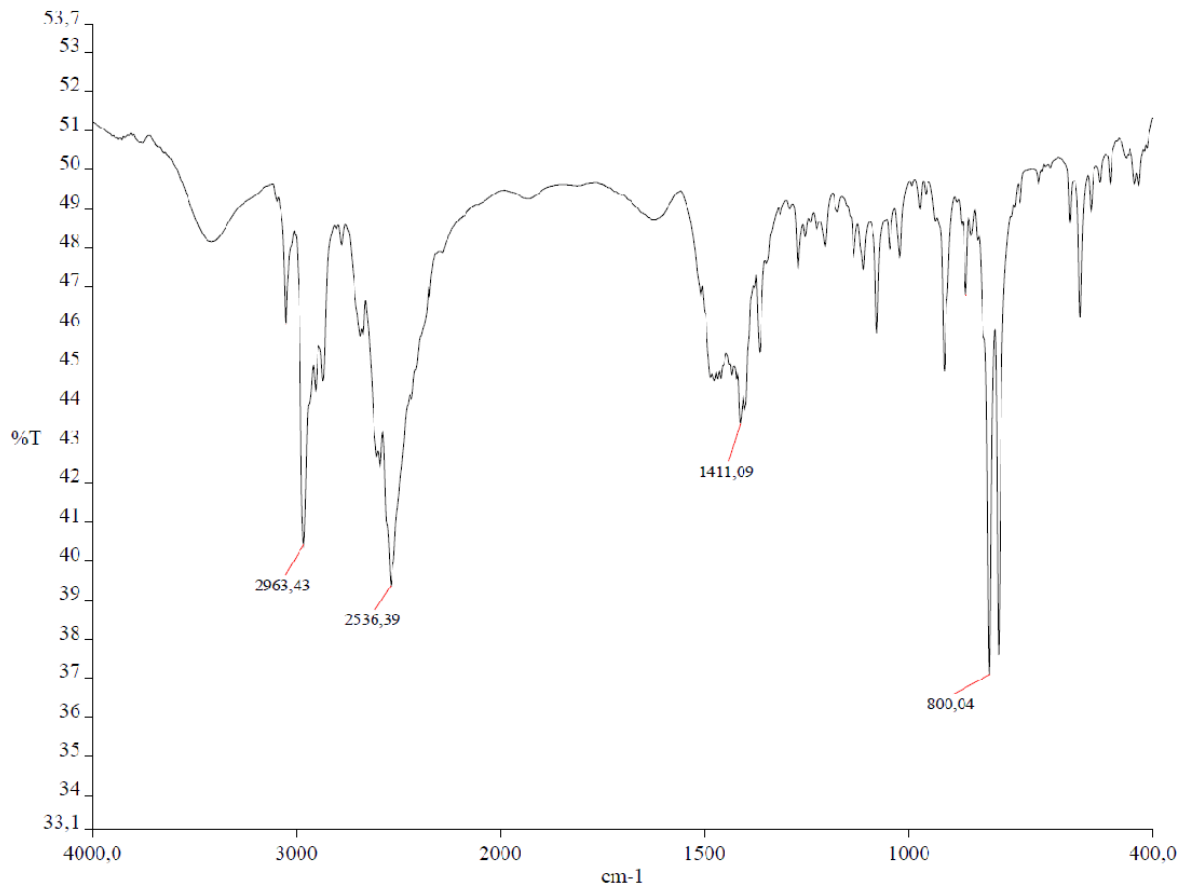


Figura 1.2. Espectro no IV da BTF SQR em pastilhas de KBr

Tabela 1.2. Atribuição das principais bandas do espectro da BTF na região do IV.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
800	Banda forte de anel dissustituído 1,4
1363 e 1411	Bandas de deformação axial grupamento <i>t</i> -butila
1514	Banda referente à ligação C=C aromática
2536	Banda forte do sal da amina
2963	Deformação da ligação C-H alifática
Em torno de 3400	Banda larga referente à deformação N-H do sal

A interpretação do espectro de IV da BTF foi baseada na análise realizada por Cardoso (2000) para o espectro de IV da terbinafina, tendo em vista a similaridade de ambas as moléculas. A banda em 800 cm⁻¹, característica de anel dissustituído 1,4 foi analisada conforme Silverstein (1994), já que o grupamento não se encontra presente na terbinafina, conforme pode ser visualizado na Figura 1.3.

A análise por espectrofotometria no infravermelho é um indicativo positivo de que a amostra trata-se de cloridrato de butenafina.

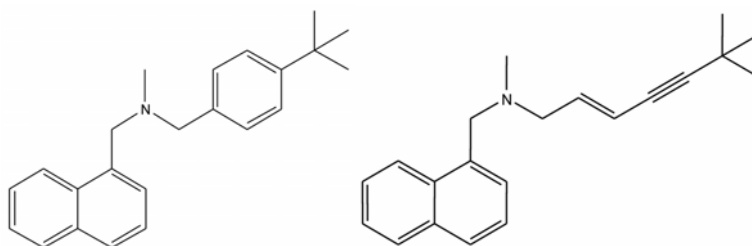


Figura 1.3. Estrutura química da butenafina (esquerda) e de terbinafina (direita).

Cromatografia em Camada Delgada

Para o desenvolvimento de cromatografia em camada delgada foi utilizada a BTF SQR, o creme dermatológico contendo o fármaco, bem como de terbinafina, análogo estrutural da butenafina. A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas de gel-sílica 60 F₂₅₄ (MERCK) com 10 cm de comprimento, 6 cm de largura e 0,25 mm de espessura da camada absorvente. Foi empregada lâmpada ultravioleta (UV) a 254 nm como revelador.

As soluções de BTF SQR e de terbinafina foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. Já a solução amostra foi preparada de acordo com o seguinte procedimento: pesagem de 1 g de creme (equivalente a 10 mg de BTF) em balão volumétrico de 50 mL, ao qual foi adicionado 15 mL de *n*-butanol, seguido de 5 minutos em ultrassom. Após, foram acrescentados 15 mL de metanol e o balão foi mantido por mais 5 minutos em ultrassom e o volume foi completado com metanol (concentração final de BTF 200 µg/mL), seguido de filtração com papel filtro. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico.

Os sistemas eluentes testados englobaram os seguintes componentes em diferentes combinações e proporções: tolueno, acetato de etila, hexano, clorofórmio, N-N-dimetilformamida, diclorometano, NaOH 0,1 M, metanol, acetona, trietilamina e acetato de amônio. O sistema eluente selecionado foi constituído de: metanol: acetato de etila: acetato de amônio (7:1,5:1). A aplicação das soluções contendo os fármacos foi realizada nas placas com o auxílio de tubos capilares a uma distância de 1,5 cm da borda inferior das mesmas, que foram posicionadas nas cubas

previamente saturadas com o sistema eluente. Após a migração da fase móvel, as placas foram retiradas das cubas e mantidas à temperatura ambiente para a secagem. A visualização das manchas foi realizada através da exposição da placa à luz UV 254 nm.

É possível verificar a semelhança entre os fármacos analisados na Figura 1.3., sendo diferenciados pela presença de anel aromático ligado à *t*-butila (BTF) ou, na mesma posição, uma ligação tripla, seguida de ligação dupla em ressonância (TER), o que garante polaridades aproximadas.

O cromatograma da BTF SQR, solução amostra do creme dermatológico e da terbinafina, bem como seus respectivos valores de fatores de retenção (R_f) podem ser visualizados na Figura 1.4. O R_x obtido pela razão entre o R_f da BTF e o R_f da terbinafina foi de 0,95. Apesar dos valores de R_f entre a BTF e a terbinafina obtidos serem próximos, o resultado é satisfatório, tendo em vista a similaridade estrutural entre as moléculas (Figura 1.3.) que garante uma polaridade semelhante, resultando em perfis de migração aproximados. A identificação da BTF foi efetuada através da comparação dos valores de R_f obtidos pela amostra da formulação semi-sólida e pela substância referência, sendo igual a 0,74 para ambas.

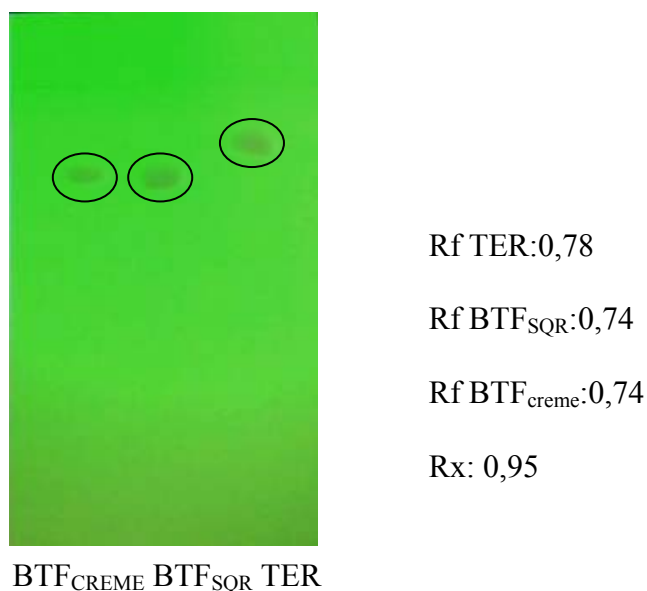


Figura 1.4. Cromatograma e valores de R_f obtidos por CCD na análise de BTF SQR, BTF extraída do creme dermatológico e terbinafina, com revelação por luz UV 254 nm.

2.1.2 Análise Quantitativa

Titulação Potenciométrica em meio não-aquoso

A titulação foi realizada conforme preconizado pela F. Bras. IV, 1988 que descreve as condições para a volumetria de bases fracas em meio não-aquoso. Inicialmente foi procedida a padronização do ácido perclórico 0,05 M em ácido acético. Para tanto, 8,5 mL de ácido perclórico foram dissolvidos sob agitação em 250 mL de ácido acético glacial. Foram acrescentados 20 mL de anidrido acético, seguido de diluição com ácido acético glacial a 1 litro e repouso por 24 horas. Foram pesados exatamente, cerca de 180 mg de biftalato de potássio, previamente dessecado a 120 °C por 2 horas, e dissolvidos em 50 mL de ácido acético glacial em frascos erlenmeyer de 250 mL de capacidade e foi realizada a titulação com a solução de ácido perclórico ($n=3$). Paralelamente foi realizada a titulação do branco. Para verificar a variação do potencial em milivolt (mV) e determinação do ponto final foi utilizado aparelho medidor de pH Digimed DM-20 equipado com eletrodo de membrana de vidro.

Foram pesados, exatamente, cerca de 120 mg de BTF SQR, dissolvidos em ácido acético glacial e foi realizada a titulação potenciométrica com solução acética de ácido perclórico 0,05 M ($n=6$), utilizando os mesmos equipamentos descritos para a padronização do ácido perclórico. Acetato de mercúrio II 6% foi adicionado para neutralizar a interferência do íon cloreto, devido à forma cloridrato do fármaco. Foi realizada correção do volume do titulante em relação à diferença de temperatura no dia de sua padronização e no dia da análise do fármaco. Paralelamente foi realizada a titulação do branco. Os resultados obtidos através de titulação potenciométrica da BTF SQR por meio não-aquoso podem ser verificados na Tabela 1.3. Durante os trabalhos seguintes descritos nesta dissertação, foi realizada correção em relação à pureza do padrão para as determinações quantitativas.

Tabela 1.3. Determinação quantitativa da BTF SQR por titulação potenciométrica em meio não aquoso.

Amostra	Teor (%)	Média (%)	DPR
1	99,29		
2	99,55		
3	100,50		
4	99,15	99,64	0,61
5	99,07		
6	100,29		

A titulação em meio não-aquoso com detecção potenciométrica demonstrou ser uma técnica rápida e precisa (DPR=0,61) para a quantificação de BTF SQR.

3. Conclusão

A determinação da solubilidade da BTF SQR permitiu verificar a adequação dos solventes para os estudos envolvendo o fármaco.

A análise por DSC indicou a faixa de fusão compreendida entre 212,4°C e 221,3°C, com pico em 217,5°C, com perfil afilado, sendo este fator indicativo de pureza do cloridrato de butenafina SQR.

A análise das bandas por espectrofotometria no infravermelho foi um indicativo de que a amostra trata-se de cloridrato de butenafina, já que as bandas referentes aos grupos funcionais do fármaco foram detectadas.

O método de CCD proposto para a detecção do fármaco foi considerado adequado uma vez que os perfis de migração do padrão e da amostra foram iguais e a diferenciação da terbinafina, semelhante estruturalmente, foi possível. A metodologia desenvolvida possui as vantagens de ser extremamente fácil, rápida e de custo reduzido.

Quanto à análise quantitativa, a volumetria em meio não-aquoso demonstrou a alta pureza da BTF SQR e representa um método rápido e preciso para a quantificação do fármaco, não necessitando de padrão para a análise.

O conjunto de análises realizadas demonstrou a adequação da BTF SQR para os estudos descritos neste trabalho e revelam o ponto de fusão do fármaco que não está indicado na literatura, bem como o espectro no IV característico do mesmo.

4. Referências

BAKSHI, M & SINGH, S. Development of validated stability-indication assay methods – critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.28, p.1011-1040, 2002.

CARDOSO, S.G. Terbinafina: validação de metodologia de análise e estabilidade fotoquímica. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2000.

DONG, M.W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2006.

Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988, parte IV.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, v.48, p.247-253, 2008.

ICH. International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Secretariat, 2005.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.49, p.627-631, 2009.

RAHMAN, N.; AZMI, S.N.H.; WU, H.-F. The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach. *Accreditation and Quality Assurance*, v.69, p.69-74, 2006.

RAO, R.N. & NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.33, p.335-377, 2003.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8ed. Belmont: Brooks/Cole- Thompson Learning, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; GLAYTON BASSLER, G.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

Stability-indicating LC assay for butenafine hydrochloride in creams using an experimental design for robustness evaluation and photodegradation kinetics study

Aline Bergesch Barth*, Gabriela Bolfe de Oliveira, Marcelo Donadel Malesuik, Clésio Soldatelli Paim, Nadia Maria Volpato.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre-RS, Brazil.

* Corresponding author: Tel: +55 51 33085214; Fax: +55 51 33085378

E-mail address: alinebbarth@hotmail.com (Aline Bergesch Barth)

Abstract

A stability-indicating LC method for the determination of the antifungal agent butenafine hydrochloride (BTF) in a cream was developed and validated using the Plackett-Burman experimental design for robustness evaluation. Also, the drug photodegradation kinetics was determined. The analytical column was operated with acetonitrile, methanol and a solution of triethylamine 0.3% adjusted to pH 4.0 (6:3:1) at a flow rate of 1 mL/min and detection at 283 nm. BTF extraction from the cream was done with *n*-butyl alcohol and methanol in ultrasonic bath. The performed degradation conditions were: acid and basic media with HCl 1M and NaOH 1M, respectively, oxidation with H₂O₂ 10% and the exposure to UV-C light. No interference in the BTF elution was verified. Linearity was assessed ($r^2 = 0.9999$) and ANOVA showed non-significative linearity deviation ($p > 0.05$). Adequate results were obtained for repeatability, intra-day precision and accuracy. Critical factors were selected to examine the method robustness with the two-level Plackett-Burman experimental design and no significant factors were detected ($p > 0.05$). The BTF photodegradation kinetics was determined for the standard and for the cream, both in methanolic solution, under UV light at 254 nm. The degradation process can be described by first-order kinetics in both cases.

Keywords: Experimental design, method validation, stability-indicating method, butenafine hydrochloride, photodegradation kinetics.

Introduction

Butenafine hydrochloride (BTF) is a benzylamine derivative antifungal agent. It has a structure that resembles the allylamines; however, a butylbenzyl group replaces the allylamine group (Figure 1) (1). This antifungal agent has activity against dermatophytes such as *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* which cause tinea infections (2, 3). The drug inhibits the fungal enzyme squalene epoxidase, blocking the biosynthesis of ergosterol, which is an essential component of fungal cell membranes (1-3). Also, the benzylamine antifungal agent demonstrates inherent anti-inflammatory properties *in vivo*, as demonstrated by reduced cutaneous erythema response after UVB irradiation (4). BTF was introduced in the Brazilian market in 2007.

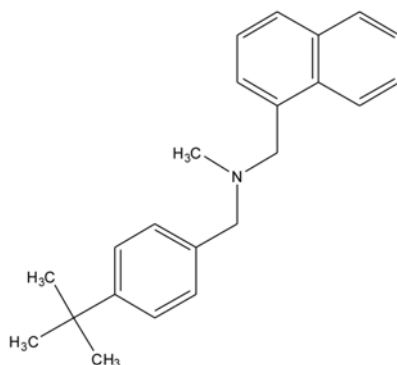


Figure 1. Chemical structure of BTF.

There is no study describing suitable analytical conditions of a method that is stability indicative for both BTF raw material and commercial cream, objectifying to quantify the drug in presence of its degradation products (DP) and to elucidate inherit stability characteristics of the standard and the active substance in the semisolid formulation. Due to these reasons, a LC method was developed and validated by specificity, enclosing placebo and stress conditions as acid, basic, oxidation and UV light, linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision, robustness, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD).

A two-level experimental design approach was applied for the robustness test in order to examine potential sources of variability by screening a large number of factors in relatively small number of experiments (5, 6). Therefore, the reliability of the analysis with respect to deliberate variations in method parameters can be evaluated, as recommended by ICH Guideline (7).

According to ICH (8), stress testing of the drug substance can help identify the likely degradation products, which can cooperate to establish the degradation pathways and the intrinsic stability of the molecule. In agreement with this guide, the light testing should be an integral part of the stress testing. Consequently, a study of the BTF photodegradation kinetics was performed in order to provide evidence on how the quality of the drug varies with the time under the influence of light. To realize this study, the developed stability-indicating method was applied.

The objective of the present study was to develop and validate a stability-indicating LC method in compliance with the ICH Guideline (7) and the USP (9) for the determination of BTF in creams using the Plackett-Burman experimental design for robustness evaluation as well as to determine the photodegradation kinetics of the drug in methanolic solution.

Materials and Methods

Materials

The reference standard was kindly supplied by Brainfarma (Rio de Janeiro, Brazil) and the commercial cream Tefin[®] was obtained in the local market. Creams are claimed to contain 1% (*w/w*) of BTF and the following inactive ingredients: benzyl alcohol, ethyl alcohol, cetyl alcohol, sodium benzoate, emulsifying wax, edetate disodium, polyethylene glycol 40

stearate, liquid petrolatum, polysorbate 60, propylene glycol, simethicone, white petrolatum, sodium hydroxide and water. All reagents were analytical or HPLC grade. Acetonitrile and methanol were purchased from Tedia (Fairfield, USA), the phosphoric acid from Merck (Darmstadt, Germany) and the *n*-butyl alcohol from Synth (Diadema, Brazil). Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV with pump (Molsheim, France).

Chromatographic system

The HPLC system (Agilent 1200 series, Santa Clara, USA) consisted of a G1311A quaternary pump, G1322A vacuum degasser, G1316A thermostat column compartment, G1329A standard auto sampler and G1315B diode array detector set at 283nm. The analytical column, a Shim-pack CLC – C8 (M) (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), and the guard column, a Shim-pack CLC G-C8 (4) (4.0 mm i.d., 10 mm long) (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), were operated in ambient temperature (25 °C). The final selected mobile phase was acetonitrile, methanol and a solution of triethylamine 0.3% adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid 10% (6:3:1; v/v/v) in isocratic mode at a flow rate of 1 mL/min and the sample injection volume was 20µL. The triethylamine solution was prepared freshly or kept in refrigerator (5 °C ± 3 °C) for a maximum time of 24 hours.

Sample preparation for LC analysis

The stock solution of BTF reference standard was prepared in methanol. The working standard solution (20 µg/mL) was obtained by the dilution of the stock solution in a mixture of acetonitrile, methanol and water (6:3:1, v/v/v). The use of water instead of a solution of

triethylamine and phosphoric acid in the diluent mixture was verified and no modification in the chromatographic profile or in the measured areas was observed.

For the commercial cream, a quantity equivalent of 10 mg BTF was transferred to a 50 mL volumetric flask, and then it was added 15 mL of co-solvent *n*-butyl alcohol (that was selected after the testing of several solvents), followed by 5 minutes in ultrasonic bath. After that, 15 mL of methanol were added to the volumetric flask, followed by more 5 minutes in ultrasonic bath. Methanol was added until the concentration of 200 µg/mL of BTF. This solution was filtered and one aliquot of the filtrated fluid was diluted with a mixture of acetonitrile, methanol and water (6:3:1; v/v/v) until the final concentration of 20 µg/mL. Also, here the use of water instead of a solution of triethylamine and phosphoric acid in the diluent mixture was verified and no modification in the chromatographic profile or in the measured areas was observed. Both sample and standard solutions were then filtered through a 0.45µm membrane filter (Millipore) prior to the injection.

Validation procedure

The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose (7). The method was validated for linearity, detection limit, quantification limit, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, specificity, robustness and system suitability.

To test linearity, standard plots were constructed with six concentrations in the range of 10-40 µg/mL of the drug prepared in triplicates. The linearity was evaluated by linear regression analysis that was calculated by the least square regression and by ANOVA for compliance of the linear model.

The quantification and detection limits were obtained based on signal-to-noise approach. The background noise was obtained after injection of the blank, observed over a distance equal to 20 times the width at half-height of the peak in a chromatogram obtained by the injection of 20 µg/mL of the reference standard (10, 11). The signal-to-noise ratio applied was 10:1 for the LOQ and 3:1 for the LOD. The results were verified experimentally.

The repeatability was verified from six independent sample preparations in the same day, obtained as described in *Sample preparation for LC analysis*. The intermediate precision was tested by assaying freshly prepared sample solutions at the same concentration in two other days. Precision was reported as %R.S.D.

The accuracy was determined by the recovery of known amounts of BTF reference standard added to the samples in the beginning of the preparative process. The added levels were 20, 40 and 60% of the nominal drug concentration. The results were expressed as the percentage of BTF reference standard recovered from the sample.

Two types of specificity experiments were performed. In the first one, it was assessed by comparing the chromatograms obtained from the pharmaceutical preparation and the standard solution with those obtained from excipients which take part in the commercial cream and verifying the absence of interferences. In the second type, forced degradation protocols were performed in order to provide suitable analytical conditions for stability study of BTF. The accelerated degradation conditions applied were: light, acid, basic and oxidant media. Samples were analyzed against a freshly prepared control sample (with no degradation treatment) and under light protection. The peak purity was determined using the tools of the Agilent Chemstation software. Excipient solutions were submitted to the same degradation conditions in order to demonstrate no interference. Specific details of the experiments conditions are described below:

- *Effect of UV light*: 1 mL of a solution containing 0.1 mg/mL of BTF reference standard in methanol was placed in a closed 1cm quartz cell. The cells were exposed to a UV chamber (100 x 18 x 17cm) with internal mirrors and UV fluorescent lamp CSR F30W T8 emitting radiation at 254nm for 15, 30, 60, 120 and 180 minutes. The same procedure was realized for sample solution from the commercial cream, after the BTF extraction as described in *Sample preparation for LC analysis*. Protected samples, wrapped in aluminum foil (in order to protect from light) were submitted simultaneously to identical conditions and used as control. After the degradation treatment, the samples were diluted to 20 µg/mL with a mixture of acetonitrile: methanol: water (6:3:1; v/v/v) and immediately analyzed.

- *Effect of oxidation*: BTF reference standard was dissolved in methanol (1 mg/mL) and 5 mL of this solution were transferred to a volumetric flask, where hydrogen peroxide solution (30%) was added until the final concentration of 10% and the volume was completed with methanol. After 20 hours the solution was diluted until the final concentration of 20 µg/mL, filtered and analyzed. Similar procedure was realized for the commercial cream, when 25 mL of the initial solution 200 µg/ml of BTF, obtained as described in *Sample preparation for LC analysis*, were transferred to a volumetric flask and submitted to degradation. A control solution containing the excipients was prepared under the same circumstances of the commercial cream solution.

- *Effect of acid and alkaline hydrolysis*: 5 mL of the BTF reference standard solution were transferred to a volumetric flask and HCl (acid degradation) or NaOH (alkaline degradation) was added until the final concentration of 1M in both cases. After 5 hours (basic degradation) and 1 and 6 days (acid degradation), one aliquot of the solution was neutralized HCl 1M (alkaline degradation) or with NaOH 1M (acid degradation) and diluted with acetonitrile, methanol and water (6:3:1, v/v/v) until the final concentration of 20 µg/mL for LC analysis. Similar procedure was realized with the commercial cream, when 25 mL of the initial solution

200 µg/mL of BTF (obtained as described in *Sample preparation for LC analysis*) were transferred to a volumetric flask and submitted to the degradation. A control solution containing the excipients was prepared under the same circumstances of the commercial cream.

During the stability assays the peak purity tool was applied to confirm the absence of other substances co-eluting in the same retention time.

The robustness of the analytical method was investigated with the factors summarized in Table 1. The six factors selected were examined in a Plackett-Burman design (8 experiments) (5, 6). The BTF standard and the sample were analyzed under identical experimental conditions and for this reason no additional experiments were necessary. The estimation of the error from the distribution of effects was done according to the Dong algorithm that is a suitable tool to identify significant effects in small designs (6).

Table 1. Factors and levels applied to the robustness test by LC method

Factor	Units	Level (-1)	Level (+1)	Nominal
pH of the triethylamine solution	-	3.9	4.1	4
Concentration of the organic phase	%	88*	92*	90
Column temperature	°C	20	30	25
Wavelength of the detector	nm	281/282	284/285	283
Column manufacturer	-	Shimadzu	Merck	Shimadzu
Triethylamine concentration	%	0.27	0.33	0.3

* The modification on the organic phase composition was done proportionally to the nominal composition (30% methanol and 60% acetonitrile).

The system suitability was verified through the evaluation of the obtained parameters for the standard elution, such as theoretical plates, peak asymmetry and retention factor, verified in different days of the method validation. The resolution was calculated according to USP (9) using the chromatogram obtained from the worst case of accelerated degradation conditions, which is the chromatogram that presented the nearest degradation product peak (DP) to the BTF peak. The injection precision was calculated according to USP (9) and also from the difference of duplicate injections of five sample solutions, as described by Ermer and Ploss (12).

BTF photodegradation kinetics

The study was carried out with quartz cells containing 0.5 mL of BTF standard in methanolic solution 400 µg/ml exposed to UVC radiation (254 nm). The experiment conditions for the drug irradiation were the same described for the specificity analysis under UV light as described in *Validation procedure* at pre-established times (40, 60, 80, 100, 120 and 140 minutes), the total volume contained in the quartz cell was transferred to a volumetric flask ($n = 3$) and diluted with acetonitrile, methanol and water (6:3:1, v/v/v) to achieve the final theoretical concentration of 20 µg/mL. These solutions were protected from light and analyzed by LC, employing the validated method.

The photodegradation kinetics of BTF in the presence of the cream excipients was evaluated through the same experimental conditions described for the BTF standard. The cream solution, prepared as described in *Sample preparation for LC analysis*, was diluted in methanol. Aliquots of 1 mL of this solution (100 µg/mL) were transferred to quartz cells and exposed to UVC light (254 nm). Also, a solution containing the excipient ingredients was submitted to this stress condition to evaluate a possible interference of its degradation in the

BTF elution. At pre-established times (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 minutes), the total volume contained in the quartz cell was transferred to a volumetric flask ($n = 3$) and diluted with acetonitrile, methanol and water (6:3:1, $v/v/v$) to achieve the final theoretical concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$. As described for the standard, these solutions were protected from light and analyzed by LC, employing the validated stability-indicating method.

In order to evaluate a possible contribution of thermally induced degradation, protected samples prepared from the standard and the commercial cream were wrapped in aluminum foil and exposed to the same conditions described above. They were kept in the chamber until the withdrawn of the last samples and analyzed. In addition, the temperature inside the chamber was controlled during the experiment in both cases.

The BTF photodegradation kinetic rate was determined by plotting the drug concentration (zero-order process), the log (first-order process) and the reciprocal (second-order process) concentration versus time. The determination coefficients (R^2) were obtained and the best observed fit indicated the reaction order. The kinetic parameters constant (k) and $t_{0.5}$ were calculated.

Results and Discussion

Selection and optimization of the chromatographic conditions

The effect of the composition of the column and mobile phase on the retention time of BTF and on its chromatographic parameters was initially investigated. At the first stage, C18 column chemistry (15 cm) and a solution 0.3% triethylamine in water were used with acetonitrile as the organic solvent. Modifications in the organic phase percentage did not result in adequate retention time or peak symmetry.

Subsequently C8 column chemistry (25cm) was also evaluated. Adequate analytical parameters were obtained. Due to the high quantity of acetonitrile required, methanol was tested, as a part of the organic phase, to reduce the analysis costs. The composition of the mobile phase varied from: 45 to 80% (acetonitrile), 10 to 45% (methanol), 10% (triethylamine solution 0.3%) and both 3 and 4 pH values were evaluated (as BTF is a basic compound with pK_a value 7.87 ± 0.5 , calculated with the ACD/ChemSketch software). A composition of acetonitrile, methanol and triethylamine solution (6:3:1; v/v/v) with pH value of 4.0 was finally chosen.

Validation of LC methods

Before the beginning of the validation procedure, a stability test was performed with two solutions: one of them containing reference standard and the other containing the commercial cream, both in a mixture of acetonitrile, methanol and water (6:3:1, v/v/v) and prepared according to section 2.3. After 20 h of analysis there was no significant alteration in the measured areas (the variation was smaller than 2%).

Linearity, LOD and LOQ: over the concentration range of 10 – 40 $\mu\text{g/mL}$, the slope and the intercept obtained from the three standard curves analyzed together were 22.415 and 6.524, respectively, and the determination coefficient was 0.9999. The analysis of variance revealed that the obtained results correspond to a linear regression ($p < 0.05$) with adequate fitting ($p > 0.05$). Regarding the intercept, it was significantly different from the theoretical zero value ($p < 0.05$), although it was less than 2% of the area obtained for 20 $\mu\text{g/mL}$ of BTF reference standard (100% of analyte level), therefore, there is no interference on the validation (10).

LOQ and LOD were 0.0542 and 0.0166 µg/mL, respectively.

Precision: repeatability and intermediate precision results are expressed as relative standard deviations (%R.S.D.). The %R.S.D. values presented in Table 2 were low for both the repeatability and the intermediate precision (%R.S.D. maximum 1.64%), demonstrating the good precision of the developed method for the semisolid dosage form.

Table 2. BTF Precision study by LC method.

Intra-day precision (n=6)		
	Label claim (%)	R.S.D. (%)
Day 1	101.13*	0.76
Day 2	99.09	1.62
Day 3	98.26	0.88
Inter - day precision (n=17)		
	Label claim (%)	R.S.D. (%)
	99.4	1.64

* One sample was identified as an outlier, according to Dixon's Q Test ($\alpha = 0,05$) (13) and excluded.

Accuracy: the data for accuracy were expressed in terms of percentage recoveries of BTF from the real samples. These results are summarized in Table 3. The mean recovery data were within the range of 100.48 to 103.21% and the mean %R.S.D. was 0.86%, satisfying the acceptance criteria for the study.

Table 3. BTF accuracy study by LC method.

Added levels (%) (n=9)	Added concentration (µg/mL)	Mean recovery (%) ± R.S.D. (%)
20	4	103.21 ± 0.90
40	8	101.28 ± 1.32
60	12	100.48 ± 0.38

Specificity: placebo injections were performed to demonstrate the absence of interference of the excipients components with the BTF elution. The results demonstrate that

there was no interference of other materials from the cream formulation, as shown in Figure 2 (a).

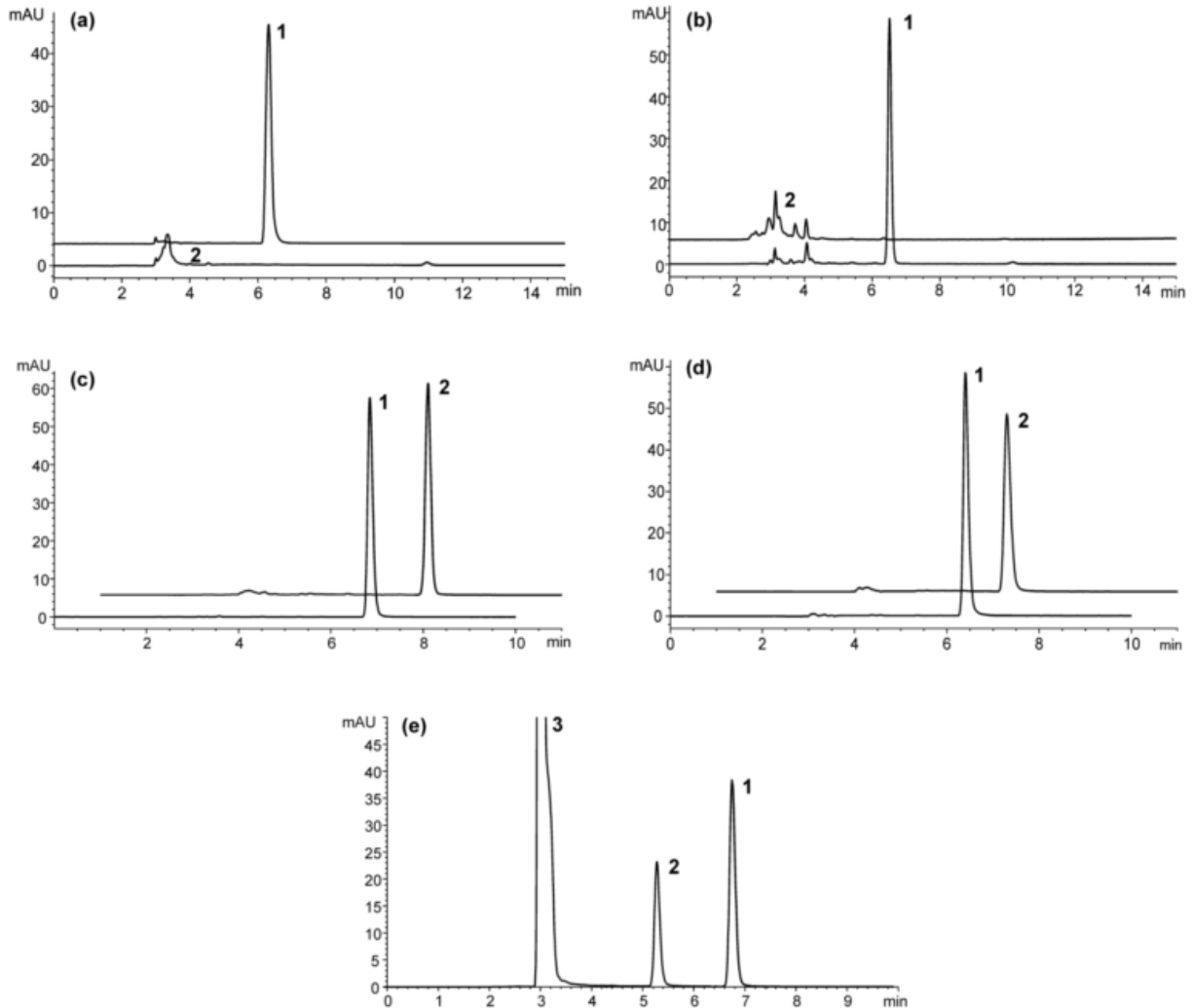


Figure 2. (a) Representative chromatograms obtained for 1) BTf reference standard 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and for the 2) placebo. (b) Photodegradation of BTf 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from the commercial cream in methanolic solution exposed to 254 nm UV light. 1) 30 minutes of exposure and 2) 17.5 hours of exposure. (c) Chromatograms obtained from 1) reference standard 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and from the 2) commercial cream solution 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BTf, both in 1M hydrochloridric acid for 6 days. (d) Chromatograms from the 1) BTf reference standard 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and from the 2) commercial cream solution 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BTf, both in 1M sodium hydroxide for 5 hours. (e) 1) BTf and 2) its DP in a chromatogram from the commercial cream solution 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BTf in hydrogen peroxide 10% for 19 hours. 3) H_2O_2 stabilizing. Chromatographic conditions: see *Chromatographic system*.

BTF solutions were submitted to different stress conditions to induce degradation. Under UV radiation (254nm), total degradation was observed after 17.5h for the standard and for the commercial cream solutions. After 30 minutes the BTF content in both analytes exhibited some decrease and additional peaks were detected quicker than in other stress conditions (Figure 2(b)). The results obtained in this preliminary stability study indicate that BTF is very susceptible to the photodegradation. However, UV spectra's from BTF peak and from other two peaks of DP were overlaid (Figure 3). Two of them presented similarity to the BTF peak, suggesting that these DP molecules have few differences from the BTF molecule or that the structures just present the same absorptive properties. These findings indicate that the developed LC method is capable of providing separation among similar molecules and/or molecules with similar absorption profiles from the analyte.

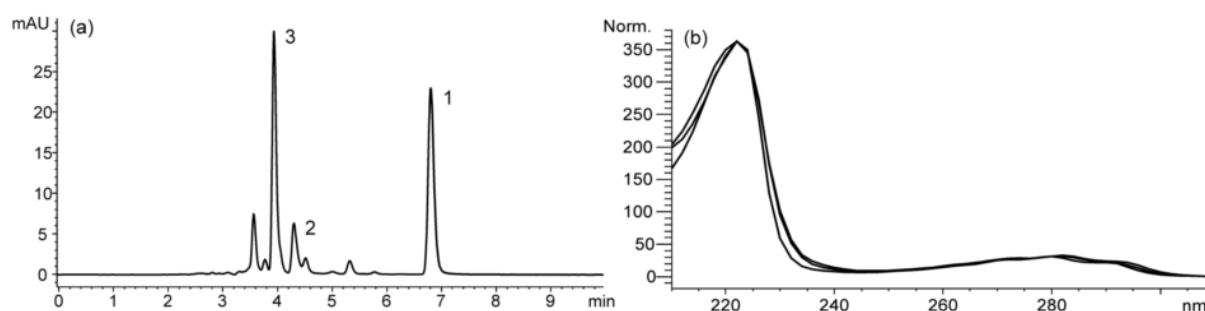


Figure 3. (a) Chromatogram from the BTF reference standard exposed to UV light for 2 h. 1) BTF, 2) DP, 3) majority DP. (b) The overlapping of the UV spectra from peaks indicated in chromatogram (a), indicating similarity between the molecules 1, 2 and 3 or same absorptive properties. Chromatographic conditions: see *Chromatographic system*.

When acid degradation was performed, no degradation peaks were detected and the concentration of butenafine hydrochloride remained constant during the exposure time to the degradation condition, according to *Validation procedure* (Figure 2(c)). Under basic conditions the standard remained stable, although the drug from the commercial cream solution did not (Figure 2(d)). The possible reason can be due to the action of one or more excipient ingredients that facilitate the degradation reaction.

The oxidation by H₂O₂ caused the degradation of standard and commercial cream and just one DP peak could be observed. However, the extent of oxidation was not the same for the sample solutions. After 20 hours it remained 96.23% of BTF on the standard solution and only 62.42% of the drug lasted on the commercial cream solution (Figure 2 (e)). Also, this higher degradation in sample solution can be due to the action of one or more excipient ingredients that favor the product formation.

Robustness: the Plackett-Burman design selected factors and the obtained response to each experiment are summarized in Table 4 for both wavelength variations of 1nm and 2nm. The responses are the percentages of BTF in the commercial cream (relative to its label claimed concentration) obtained in relation to the standard solution in each experiment.

After the calculation of the effects for each parameter, the statistical interpretation, through the *t*-test, allowed to define what is significant and what is not. No significant factors were detected for all the experiments in the tested wavelengths (Table 4), as *t*-calculated values were minor than the *t*-critical value ($\alpha = 0.05$).

Another way to evaluate the results is creating a half normal-plot, to rank the effects according to the increasing absolute effect size. The effects are plotted against a scale defined by portioning the right half of the normal distribution in equal parts and by taking the median of each slice. These values are called rankits (6). The effect of each factor was calculated and the results are summarized with the respective rankit in Table 5 (just for the wavelength variation of two nm). In figure 4, these effect values were plotted with the critical effect values of margin of error (ME) (0.44) and of simultaneous margin of error (SME) (0.89). When one effect is positioned between ME and SME is called possibly significant and one effect that is above SME is considered significant (6). None of the results exceeded the ME or SME values, so the effects of each parameter were not significant, confirming the results obtained from the *t*-test, for this wavelength variation.

Table 4. Plackett-Burman design factors and the obtained response to each experiment.

Experiment	pH	Column	Dummy	Wave-length	% Organic Phase	Temperature	% TEA*	Response ($\pm 1\text{nm}$)	Response ($\pm 2\text{nm}$)
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	99.41	99.46
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	99.67	99.91
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	99.15	99.12
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	99.11	99.08
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	99.57	99.5
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	99.22	99.24
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	99.35	99.35
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	99.45	99.47
$t_{\text{calculated}} (\pm 1\text{nm})$	-1.333	1.902	-0.053	-0.658	-0.800	0.373	-0.622		
$t_{\text{calculated}} (\pm 2\text{nm})$	-1.166	1.756	0.442	-0.281	-1.086	0.442	-0.952		
t_{critical}	5.408								

*TEA= triethylamine

Table 5. Effects from the seven-factor Plackett-Burman design for the wavelengths of 281 nm and 285 nm

Factor (definition)	Effect	Rankit
Detection Wavelength (A)	0.0525	0.09
Temperature (B)	0.0825	0.27
<i>Dummy</i> (C)	0.0825	0.46
% TEA* (D)	0.1775	0.66
% Organic phase (E)	0.2025	0.90
pH of TEA* solution (F)	0.2175	1.21
Column (G)	0.3275	1.71

*TEA= triethylamine

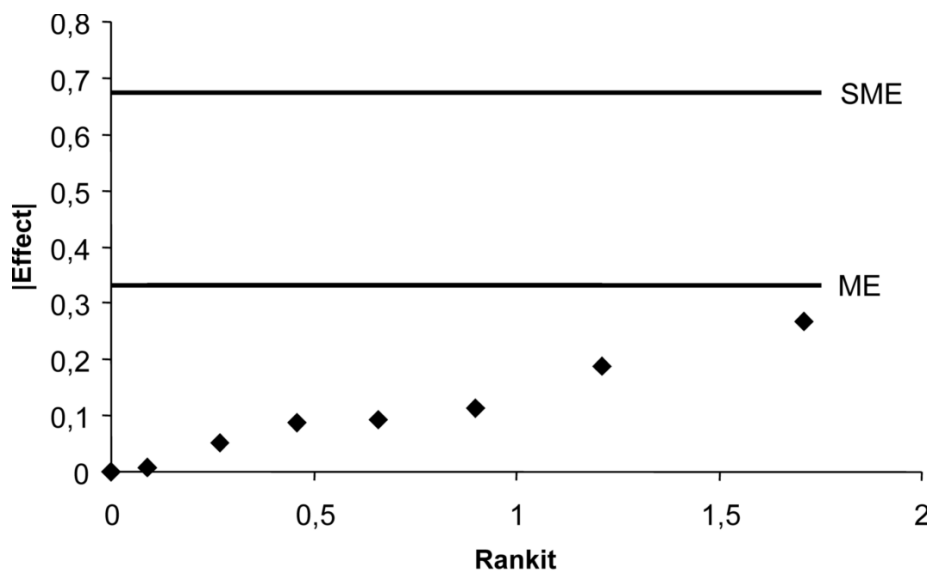


Figure 4. Half-normal probability plot for the effects of Table 5 with identification of the critical effects ME and SME.

Also, the performance parameters were analyzed. In all the performed experiments the theoretical plates were higher than 5000 and the tailing factor was smaller than 1.4, in agreement with the literature (14, 15). The retention factor observed in all analysis was higher than 1 (16).

System suitability: the analysis of the BTF standard evaluated at each day presented the approximate results: 16600 theoretical plates, 0.97 peak asymmetry and 2.09 for the retention factor. The resolution of BTF and DP was obtained through the analysis of the oxidative degradation chromatogram that has the nearest DP from the BTF peak and the calculated value was 12.4. For injection repeatability, calculated according to two different ways (as described in *Validation procedure*), a R.S.D. of 0.2% was determined for the standard and sample solution. The obtained results establish that the LC system and procedure are capable of providing data of acceptance quality (14, 15).

BTF Photodegradation kinetics

Through the evaluation of the determination coefficients obtained by plotting the drug concentration (zero-order process), the log (first-order process) and the reciprocal (second-order process) concentration versus time, the degradation of BTF in methanolic solutions could be better described as first order kinetic for both the standard solution and the cream solution, under the applied experimental conditions (Table 6). Therefore, the degradation speed is proportional to one component (17), the BTF itself. The obtained degradation rate constants (k) and $t_{0.5}$ were: 0.284 h^{-1} and 2.44 h for the standard solution; 0.422 h^{-1} and 1.64 h for the drug in the cream solution. The rate constants were quite different probably because of the action of one or more excipient ingredients that influence the drug degradation in the cream solution. The plots containing the logarithm of the remaining BTF in the standard and in the commercial cream versus time are in Figure 5.

Table 6. Determination coefficients from the photodegradation kinetics of BTF .

Order	Standard	Cream
Zero	0.9789	0.9271
First	0.9891	0.9755
Second	0.9809	0.8853

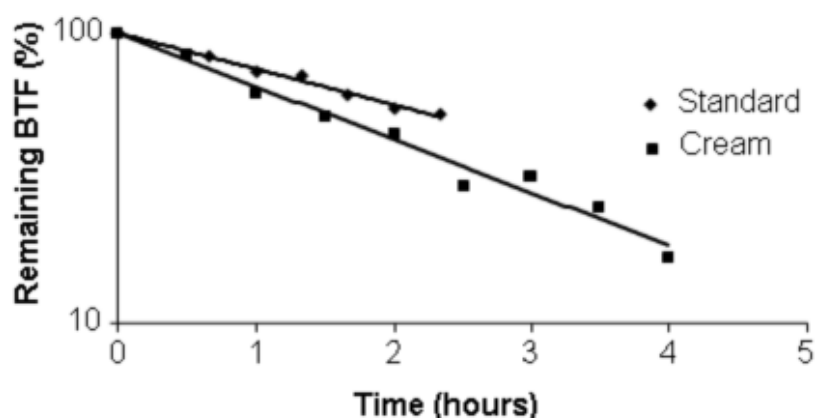


Figure 5. First-order reaction plots of remaining BTF from the standard and from the cream versus time, after photodegradation with UV-C light.

The temperature inside the chamber was always below 34°C. There was no considerable variation in the BTF concentration in the solutions containing BTF standard and commercial cream, wrapped in aluminum foil and submitted to the photodegradation conditions, as thermal controls. The peaks generated by the solution containing the excipient ingredients and exposed to the same UV-C radiation had no interference in the BTF migration time.

Conclusion

The reverse phase LC method proposed was found to be simple, fast, accurate, precise, linear, robust and specific and it is a powerful tool to investigate chemical stability of BTF.

The robustness of the method was verified with small variations on pH, concentration of triethylamine solution, concentration of organic phase, detector wavelength, column manufacturer and analysis temperature, using the Plackett-Burman experimental design to examine potential sources of variability. All the parameters meet the criteria of the ICH guidelines for method validation. Its chromatographic retention time of 6.8 min allows the analysis of a large number of samples in an adequate period of time. The method could therefore be recommended for routine quality control analysis of raw material and of commercial cream, as well as for protocols of BTF stability study.

The method applicability to stability studies was proved through the evaluation of the main factors that affect the drug content in solution and through the BTF degradation kinetics in methanolic solution exposed to UVC light. Both methanolic solutions of BTF, reference standard and commercial cream, showed stability in relation to the applied acid condition and instability when submitted to basic, oxidation and light conditions. The degradation kinetics was defined as first order for the drug in both standard and cream methanolic solutions, establishing that its speed is dependent on the drug concentration. The developed method and the stability study are essential to future studies of isolation and identification of the degradation products, objectifying the analysis of biological and toxicological aspects, aiming the maintenance of efficacy and safety of the pharmaceutical product.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES (Brazil) and CNPq (Brazil) for the financial support and Brainfarma for the provision of BTF reference standard.

References

1. A.K. Gupta; T.R. Einarson; R.C. Summerbell and N.H. Shear. An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses. A North American perspective, *Drugs* 55(5): 645-674 (1998).
2. W. McNeely and C.M. Spencer. Butenafine. *Drugs*, 55(3): 405-412 (1998).
3. A.K. Gupta. Butenafine: An update of its use in superficial mycoses, *Skin Ther. Lett.*, 7(7): 1-5 (2002).
4. Nahm W., Orengo I., Rosen T., 1999. The antifungal agent butenafine manifests anti-inflammatory activity in vitro, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 41, 203-206.
5. Y.V.Heyden; M. Jimidar; E. Hund; R. Niemeijer; R. Peeters; J. Smeyers-Verbeke; D.L. Massart and J. Hoogmartens. Determination of system suitability limits with a robustness test, *J. Chromatogr. A*, 845: 145-154 (1999).
6. Y.V. Heyden; A. Nijhuis; J. Smeyers-Verbeke; B.G.M Vandeginste and D.L. Massart. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 723-753 (2001).
7. ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization, 2005
8. ICH Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substance and Products: Text and Methodology. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization, 2003
9. US Pharmacopoeia XXXI, 2008. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 232 – 243, 683 – 687.
10. G.P. Carr and J.C. Wahlich. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8: 613 – 618 (1990).

11. J. Ermer and C. Burgess. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice, 1nd ed., J. Ermer and J.H.McB. Miller, Eds. Wiley-VCH Verlag & Co., Weinheim, 2005, pp. 101-119.
12. J. Ermer and H.J. Ploss. Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37: 859-870 (2005).
13. C. Burgess. Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, 1nd ed., J. Ermer and J.H.McB. Miller Eds. Wiley-VCH Verlag & Co., Weinheim, 2005, pp. 355-386.
14. FDA CDER. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. FDA, 1994.
15. G.A. Shabir. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A*, 987: 57-66 (2003).
16. S. Lindsay. S. High Performance Liquid Chromatography. Analytical Chemistry by Open Learning, 2nd ed., John Wiley & Sons, London, 1992, pp. 17-42.
17. N.E.S. Nudelman, Estabilidad de Medicamentos, 1nd ed., El Ateneo, Buenos Aires, 1975, pp. 5 – 22.

Journal of Chromatographic Science manuscript for review

JOURNAL OF
Chromatographic Science

Journal of Chromatographic Science <http://mc.manuscriptcentral.com/jcs>

Stability-indicating LC assay for butenafine hydrochloride in creams using an experimental design for robustness evaluation and photodegradation kinetics study

Journal:	<i>Journal of Chromatographic Science</i>
Manuscript ID:	JCS-10-014
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	12-Jan-2010
Complete List of Authors:	barth, Aline; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Boffe, Gabriela; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pharmacy Malesuik, Marcelo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Paim, Clesio; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pharmacy Volpato, Nadia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pharmacy
Keyword:	Experimental design, method validation, stability-indicating method, butenafine hydrochloride, , photodegradation kinetic



Confidential materials. Please destroy hard copies upon completion of review

CAPÍTULO II. Estudos para o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar para a análise de cloridrato de butenafina presente na formulação semi-sólida

1. Introdução

A eletroforese capilar (EC) é considerada um método alternativo atrativo para a análise de fármacos, por causa da sua alta eficiência de separação, curto tempo de análise, relativamente baixo custo de operação e de consumíveis, facilidade de automação e uso de baixos volumes de analito, bem como reduzido consumo de solventes quando comparada com técnicas como a CLAE (CREGO *et al*, 2001; ALTRIA & ELDER, 2004; GOMES *et al*, 2004; SÜSLÜ *et al*, 2007; GAONA-GALDOS *et al*, 2008; MAMANI *et al*, 2008). Apesar da EC ter se tornado técnica de rotina para análises específicas em alguns países (ALTRIA, 1999; ALTRIA & ELDER, 2004), no Brasil o uso da técnica permanece majoritariamente na pesquisa.

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico (TAVARES, 1996; SANTORO *et al*, 2000), sendo que a velocidade e o sentido da migração dependem do tamanho e da magnitude de carga de cada íon (ALTRIA, 1996; SANTORO *et al*, 2000; GERVASIO *et al*, 2003), conforme Figura 2.1. Na EC a separação é conduzida em tubos cujas dimensões são em torno de 15 a 100 μm de diâmetro interno e em torno de 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com eletrólito condutor e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso de capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese, pois devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente de calor gerado pela passagem de corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados, resultando em separações de alta eficiência, resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997). Entretanto a técnica apresenta algumas desvantagens como baixa precisão de injeção e pouca sensibilidade, quando comparada com CLAE (ALTRIA *et al* 1998; ALTRIA, 1999).

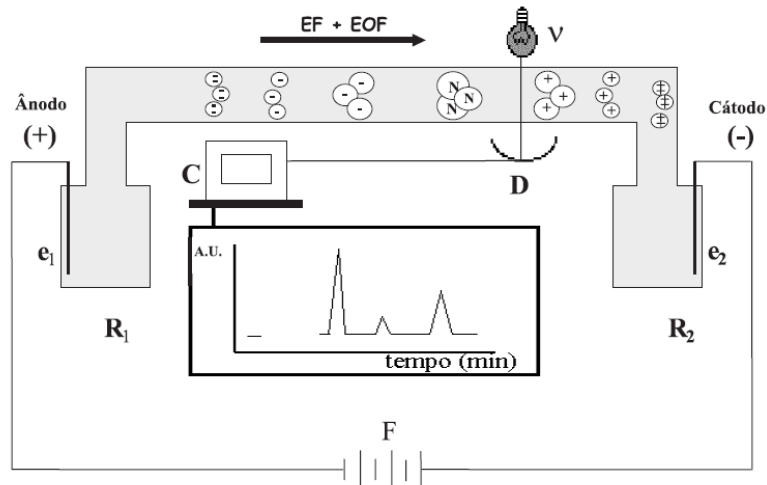


Figura 2.1. Diagrama esquemático do sistema de EC: R1 e R2 são os recipientes contendo o eletrólito onde se encontram os eletrodos e1 e e2 e F é a fonte de tensão. Os círculos brancos representam os íons com as cargas indicadas ou as espécies sem carga N e as áreas representam as massas. Já v é uma lâmpada de emissão com frequência conhecida, D é o detector acoplado ao computador C. Fonte: GERVASIO *et al*, 2003.

Outro mecanismo envolvido no transporte de analitos em direção ao detector é o fluxo de solução gerado pela aplicação de voltagem no capilar preenchido com eletrólito. Esse fluxo ocorre por causa da ionização dos grupamentos silanóis no interior do capilar em $\text{pH} > 3$. Os grupos silanóis ionizados atraem cátions provenientes do tampão que formam duas camadas, sendo que a mais distante da parede do capilar é movimentada no sentido do cátodo, com a aplicação da tensão, conforme Figura 2.2. O desequilíbrio de cargas origina deslocamento osmótico do solvente água do ânodo para o cátodo, o que contribui para o deslocamento do analito, mesmo desprovido de carga (neutro) ao longo do capilar, sendo que está força de transporte é chamada de fluxo eletrosmótico (EOF) (ALTRIA 1996; SANTORO *et al*, 2000).

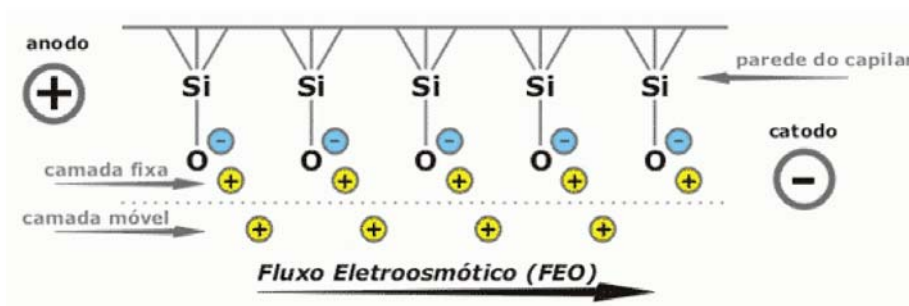


Figura 2.2. Formação e sentido do fluxo eletrosmótico. Fonte: GRAEF, 2007.

A eletroforese capilar classifica-se em eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia capilar eletrocínética micelar (MEKC), focalização isoeétrica capilar, isotacoforese capilar, eletroforese capilar em gel e eletrocromatografia capilar. Na CZE os compostos são separados pela combinação entre mobilidade eletroforética e a magnitude do fluxo eletrosmótico. As moléculas são separadas de acordo com o tamanho e o número de grupamentos ionizados (SANTORO *et al*, 2000). Na MECK a solução tampão contém um tensoativo em concentração superior a concentração micelar crítica, proporcionando um microsistema de duas fases. O eletrólito é a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, pseudo-estacionária, que é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose (TAVARES, 1997). Moléculas neutras podem ser separadas pelo método em função de sua hidrofobicidade, já que os compostos hidrofílicos não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética (SANTORO *et al*, 2000). A partição diferenciada de solutos neutros entre essas duas fases é responsável pela seletividade de separação (TAVARES, 1997).

Um procedimento importante nas análises por eletroforese capilar consiste na adição de concentração conhecida de padrão interno (PI). Determina-se a relação entre as áreas fornecidas pela amostra e PI, eliminando desse modo, erros decorrentes da variabilidade do volume de injeção, voltagem e EOF. O PI deve possuir propriedades químicas similares ao composto sob análise, apresentar tempo de retenção semelhante e não interferir na análise (DOSE & GUIOCHON, 1991).

O pH da solução tampão é um dos parâmetros que afeta fortemente a separação em EC. Este parâmetro afeta tanto o EOF, quanto a mobilidade eletroforética dos analitos (GERVASIO *et al*, 2003). Outros fatores incluem o tempo de injeção da amostra, o tampão (concentração e força iônica), adição de modificador orgânico ao tampão de corrida, temperatura de análise e tensão aplicada (TOASAKSIRI *et al*, 2000; CREGO *et al*, 2001; NEMUTLU *et al*, 2005; LIU *et al*, 2009).

Neste contexto, o objetivo do presente capítulo foi o desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para a quantificação de cloridrato de

butenafina na formulação semi-sólida em estudo, investigando os diversos fatores que influenciam o desempenho da análise.

2. Metodologia

2.1. Solventes e reagentes

O sal fosfato de potássio foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha), o acetato de amônio da marca Quimex (Cotia, Brasil) e o citrato de sódio foi adquirido da Spectrum (New Brunswick, EUA). O tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Nuclear (Diadema, Brasil). Os solventes e sais utilizados foram de grau analítico. Água purificada foi obtida pelo equipamento Millipore® Direct-Q 3UV (Molsheim, França).

2.2. Sistema de Eletroforese Capilar

Os experimentos foram conduzidos em equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent, modelo ^{3D}CE (Waldbronn, Alemanha) equipado com auto-amostrador, detector de arranjo de fotodiodos, sistema de controle de temperatura e fonte de fornecimento de tensão de até 30 kV. O software CE Chemstation foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise de dados (inclusive a verificação da pureza dos picos obtidos). Foi utilizado capilar de sílica fundida de comprimento total de 48,5 cm, comprimento efetivo de 40 cm e diâmetro interno de 50 µm.

2.3. Desenvolvimento de Método Analítico

Considerando as características de base fraca da BTF, com valor de pK_a de $7,87 \pm 0,5$, primeiramente optou-se pelo desenvolvimento de método analítico por CZE em pH baixo, já que a molécula apresenta-se ionizada no mesmo. Foram testados diferentes tampões, variando sua concentração e pH, bem como a adição de modificador orgânico, temperatura de análise, tempo de injeção da amostra e tensão aplicada. A seguir estão detalhadas as principais tentativas.

Nota: considerou-se a concentração da amostra 50 µg/mL, tensão de 25 Kv, tempo de injeção de 5 segundos e temperatura de 25 °C como condições padrão de análise

por serem usuais na literatura, portanto, quando não indicado no texto, estes foram os valores utilizados.

Utilização de tampão fosfato: inicialmente foi avaliado o seu uso, já que os valores de pK_a do fosfato são 2,12 (pK_{a1}), 7,21 (pK_{a2}) e 12,32 (pK_{a3}), atuando como tampão nestas proximidades de pH (ALTRIA, 1996). Sendo assim, considerando-se o valor de pK_a do fármaco, foram testados os valores de pH de 3 e 5, onde a BTF encontra-se totalmente ionizada. Foram analisadas as concentrações 25 e 50 mM, que se encontram dentro da faixa de concentração indicada na literatura, já que concentrações superiores causam problemas de aquecimento interno no capilar (ALTRIA, 1996). Também, a adição de 10% de metanol como modificador orgânico foi averiguada, bem como os tempos de injeção de 3 e 5 segundos e a intensidade do sinal gerado em dois diferentes comprimentos de onda: 223 nm e 283 nm (pontos de absorção máxima). Todas as combinações, considerando os fatores descritos, foram testadas.

Os resultados obtidos com o comprimento de onda de 223 nm resultaram numa intensidade adequada de sinal. Já no comprimento de 283 nm a intensidade do sinal foi consideravelmente baixa, sendo descartado o uso deste comprimento de onda. Esse resultado é justificável pela reduzida absorção do fármaco em 283 nm e pela menor sensibilidade do método em relação à CLAE, cujo método de quantificação para BTF foi desenvolvido nesse comprimento de onda.

A variação no volume de injeção teve como efeito somente a redução na área e intensidade do sinal, fato justificável devido à menor injeção de amostra. A adição do modificador orgânico não trouxe nenhum benefício significativo para análise eletroforética.

Entre a concentração de tampão e os valores de pH, o tampão fosfato 50 mM, pH 5 resultou em parâmetros de análise adequados (tempo de migração de 4,5 minutos, simetria de 0,95 e pratos teóricos em torno de 63.000). Na Figura 2.3 pode ser verificado o adequado perfil eletroforético da análise.

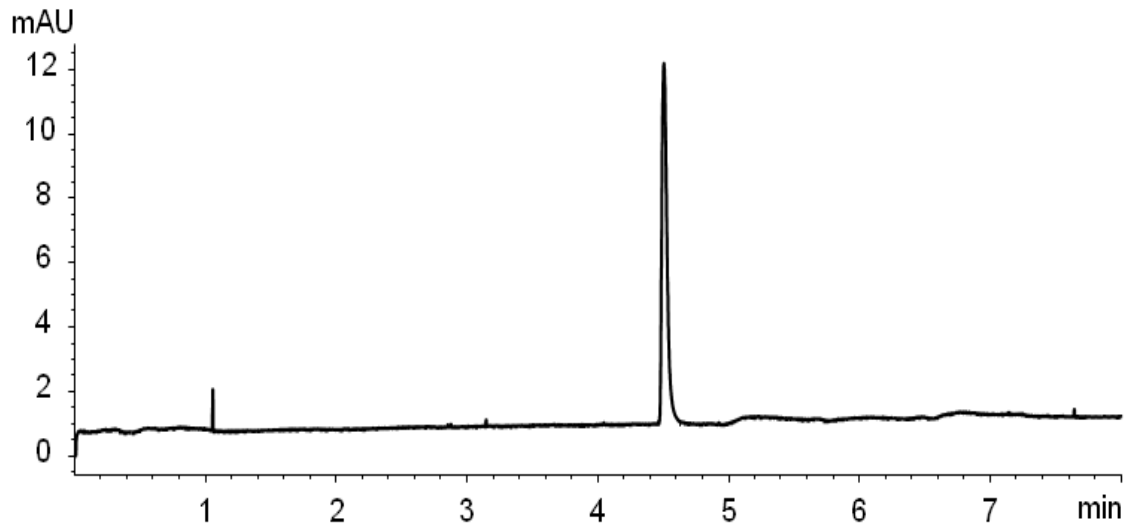


Figura 2.3. Eletroferograma de BTF SQR (50 µg/mL). Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mM, pH 5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.

Entretanto, não foi obtida reprodutibilidade nos parâmetros de análise citados. A Figura 2.4 exemplifica o perfil eletroforético obtido em análises subseqüentes nas mesmas condições. Nos parâmetros de análise foi verificado um reduzido número de pratos teóricos (em torno de 4440) e inadequada simetria (USP tailing: 0,628), que pode ser visualizada no eletroferograma pela formação de “*front*” no pico do fármaco.

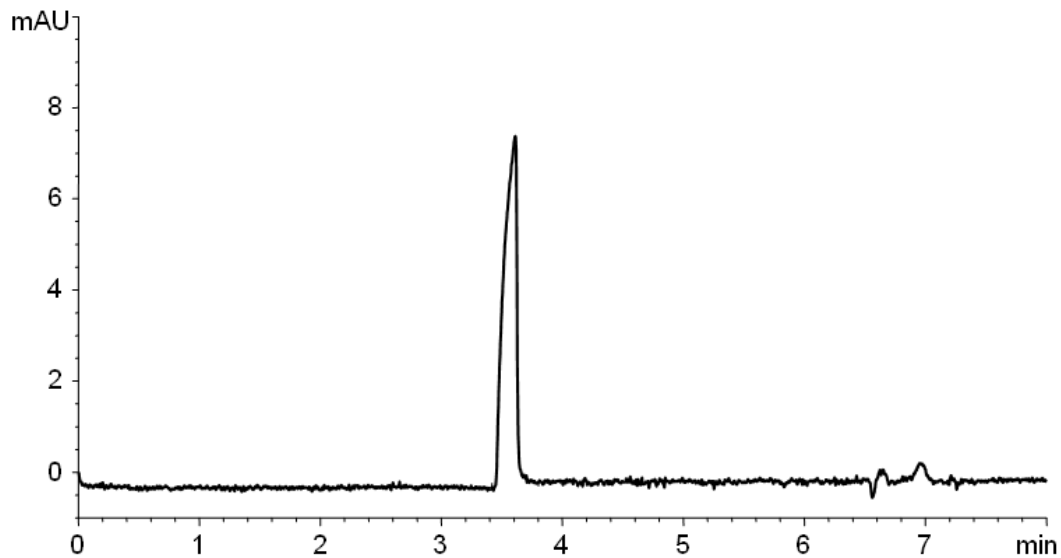


Figura 2.4. Eletroferograma de BTF SQR (50 µg/mL). Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50mM, pH 5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.

Devido à falta de reprodutibilidade nas análises, foram testados outros tampões, conforme descrito a seguir.

Utilização de tampão citrato: a sua utilização também se justifica pela faixa de ação tamponante ocorrer em valores de pH baixos, já que os valores de pK_a do citrato são 3,06 (pK_{a1}) e 5,40 (pK_{a2}) (ALTRIA, 1996). Sendo assim foram testados os valores de pH 3 e 5 nas concentrações de 25 e 50 mM.

Os melhores resultados foram obtidos com a concentração de tampão de 25 mM e valor de pH 3. Entretanto, apesar da intensidade do sinal ser excelente (em torno de 40 mAU), os parâmetros de análise obtidos não foram plenamente satisfatórios.

Utilização de tampão acetato: foram produzidas soluções nas concentrações de 25 e 50 mM e nos seguintes valores de pH: 3, 4 e 5. O pK_a do acetato é 4,75 (ALTRIA, 1996). As melhores condições foram obtidas com o tampão na concentração de 25 mM, pH 5. Porém, novamente a simetria não foi adequada (USP tailing em torno de 2,1).

Já nas tentativas de desenvolvimento de metodologia analítica por MECK foram realizadas em pH elevado, onde a molécula encontra-se sem carga, para que a migração ocorra devido à interação com as micelas. Foram avaliados os fatores citados para a CZE, bem como diferentes concentrações do tensoativo.

Utilização de tampão TRIS com SDS: inicialmente foi avaliado o uso do tampão TRIS (pK_a : 8,3) (ALTRIA, 1996) com a adição de SDS. O tampão foi testado nas concentrações de 20 e 50 mM e o tensoativo na concentração de 20 mM e valor de pH de 10,5, onde a BTF encontra-se totalmente não ionizada. Excelentes parâmetros de análise foram obtidos: intensidade de aproximadamente 20 mAU, simetria adequada (0,89), pratos teóricos em torno de 40.000 e tempo de migração de 3,5 minutos, conforme Figura 2.5

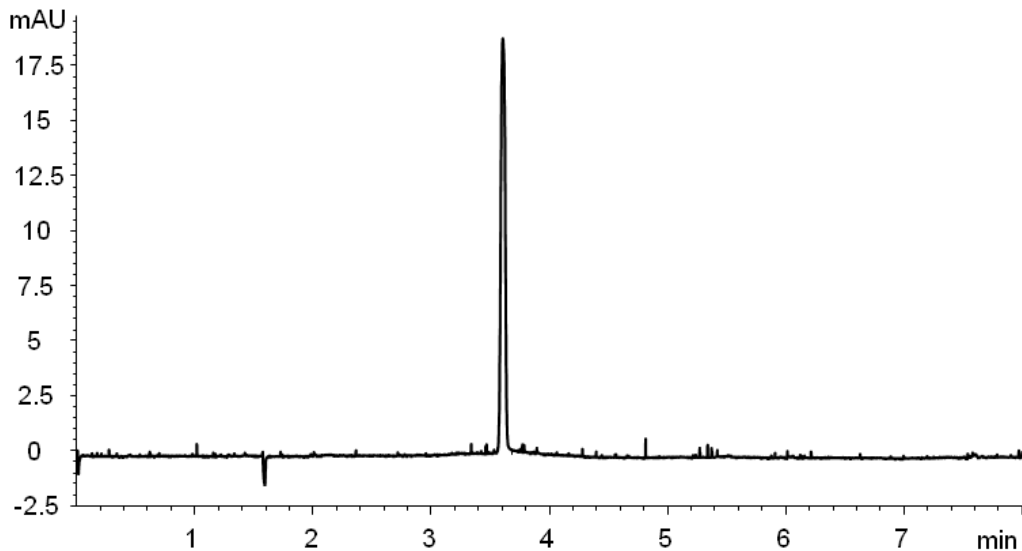


Figura 2.5. Eletroferograma de BTF SQR (50 µg/mL). Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM, pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.

Como foi possível reproduzir o método, foi conduzido estudo para avaliar a sua especificidade frente à luz como fator de degradação, já que o fármaco é sensível a este agente de estresse. Na degradação forçada da BTF SQR frente à luz UVC (254 nm), conduzida conforme indicado para a metodologia de CLAE, descrita no capítulo 1, houve uma redução a 75,09% na área do fármaco após 1 hora de exposição. Foi detectado pico do produto de degradação em 3,3 minutos, conforme Figura 2.6 A análise da pureza pelo software indicou ausência de migração conjunta de outra substância. Pelo conhecimento prévio da suscetibilidade ao meio oxidativo, a BTF SQR também foi exposta a este meio (mesmas condições descritas para o método de CLAE), sendo verificado decaimento na área do pico em análise realizada após 24 horas de contato com o agente estressor. A análise da pureza pelo software indicou novamente a ausência de migração conjunta de outra substância.

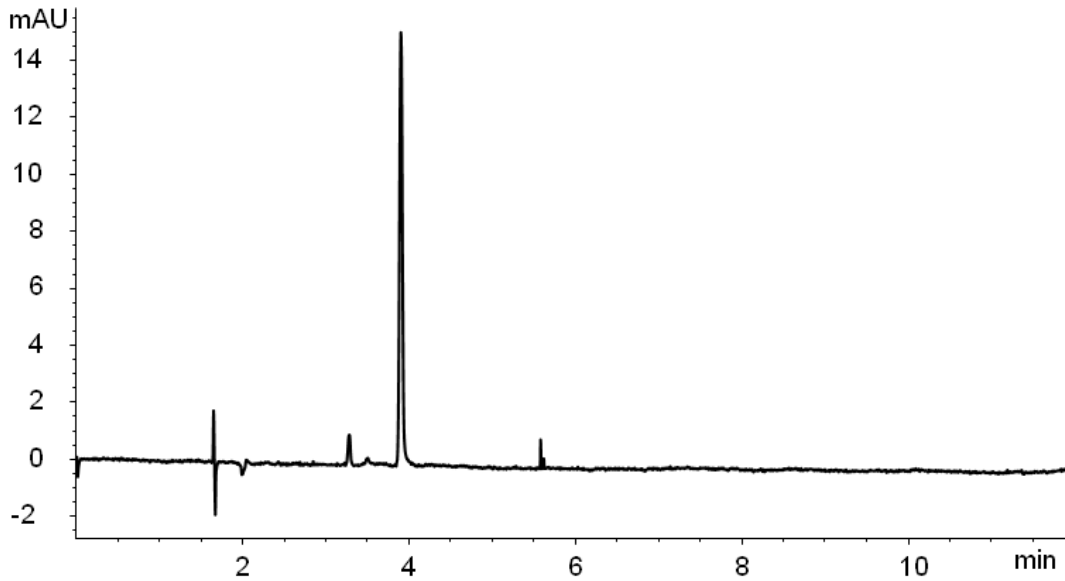


Figura 2.6. Eletroferograma de BTF SQR (50 µg/mL) exposta à luz UVC (254 nm) por uma hora. Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM em pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.

Seleção do padrão interno:

Foram realizados testes para selecionar uma substância passível de ser utilizada como padrão interno nas condições de MECK desenvolvidas. As seguintes substâncias foram testadas: nimesulida, terbinafina, epinastina, fexofenadina, rabeprazol, rosiglitazona, duloxetina, mesilato de gemifloxacino, paracetamol, 1-naftol, cimetidina, diclofenaco de sódio, tramadol cloridrato e hidroclorotiazida. Os melhores perfis eletroforéticos foram obtidos com 1-naftol, cimetidina, hidroclorotiazida e rosiglitazona. Para verificar a adequabilidade destes fármacos como padrão interno foi realizado um estudo de proporcionalidade, onde a concentração do PI foi mantida constante (50 µg/mL) e a concentração da BTF foi analisada em três níveis (20, 50 e 100 µg/mL) (6 análises em cada nível). Foi calculada a razão entre as áreas BTF/PI e verificado o DPR. Os menores valores de DPR foram obtidos com o uso de rosiglitazona (Figura 2.7.) como padrão interno e a análise da linearidade dos dados forneceu um r^2 de 0,9989, sendo um indicativo prévio de linearidade do método.

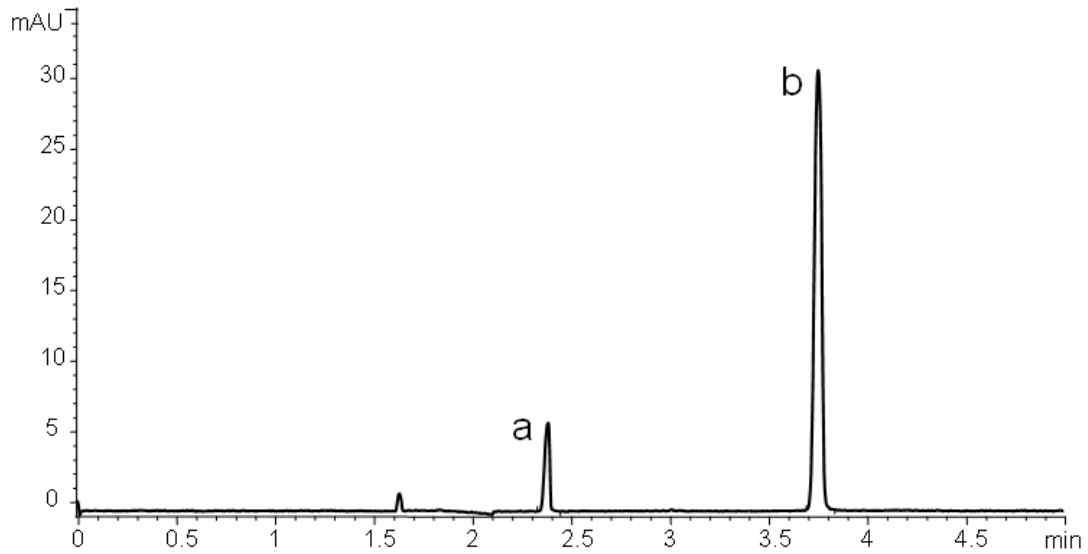


Figura 2.7. Eletroferograma de: a) Rosiglitazona (50 $\mu\text{g/mL}$) e b) BTF SQR (50 $\mu\text{g/mL}$). Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM em pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.

Posteriormente procedeu-se a análise da BTF extraída do creme dermatológico e observou-se um perfil alargado da base do pico, conforme eletroferograma “a” na Figura 2.8.

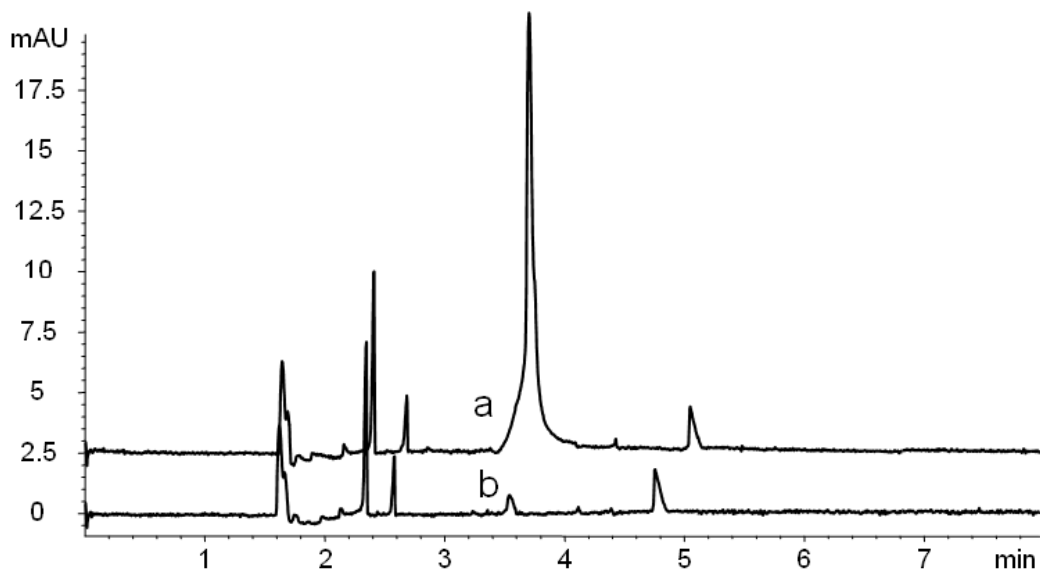


Figura 2.8. Eletroferograma de BTF (50 $\mu\text{g/mL}$) obtida do creme (a), com alargamento de sua base e eletroferograma do placebo simulado (b) com sinal no mesmo tempo de migração do fármaco, sugerindo a migração concomitante dos mesmos como fator de alargamento do eletroferograma “a”. Condições eletroforéticas: TRIS 50mM, SDS 20 mM em pH 10,5, tensão de 25 Kv, temperatura de análise 25 °C e tempo de injeção de 5 segundos.

Para confirmar a causa deste alargamento, foi analisada uma solução placebo e observou-se um pequeno sinal no tempo de migração da BTF, conforme eletroferograma “b” da Figura 2.8. Uma solução padrão de BTF SQR foi adicionada ao placebo e o perfil eletroforético obtido foi semelhante ao da solução amostra da formulação semi-sólida, confirmando a suposição de interferência dos excipientes do produto na migração da butenafina nas condições desenvolvidas.

Para resolver os excipientes do fármaco foram testados: capilar de maior comprimento (51 cm), aumento na concentração de SDS (75 e 100 mM) e redução do pH (para 7 e 8) (AGILENT TECHNOLOGIES, 2000), bem como a adição de agentes para aumentar a viscosidade como etilenoglicol (5, 10, 15 e 25%) e propanol (5, 10 e 15%). Todas as tentativas não resultaram em migração diferenciada dos componentes do placebo e da BTF. Foi verificado o padrão de migração dos componentes do creme isoladamente e vários apresentaram um pequeno sinal no tempo de migração da BTF. São eles: EDTA, cera auto-emulsificante, álcool benzílico, silicone, óleo mineral, vaselina sólida e polietilenoglicol 40.

O foco dos testes passou a ser o método de extração do fármaco da formulação, objetivando separar o mesmo dos excipientes. Foi testado o uso de extração líquido-líquido, procedimento presente em algumas monografias de pomadas e cremes nas Farmacopéias (F. Bras, 1988 e USP, 2008). Foram avaliadas as seguintes combinações de solventes: n-butanol e éter; n-butanol e HCl 0,1 M; éter e etanol; éter e HCl 0,1M; dimetilsulfóxido (DMSO) e éter e DMSO e HCl 0,1M, entretanto, não foi eliminado o interferente. Posteriormente foi analisado o método de extração descrito por Kaale (2002), que consiste no uso de metanol e hexano com agitação vigorosa, seguida de centrifugação. Após a retirada de parte da fase inferior aquosa, o procedimento foi realizado mais duas vezes, sem obtenção de resultados adequados.

Utilização de tampões Borato e Tetraborato com SDS: foi verificada a adequabilidade do uso dos tampões tetraborato e borato (pKa: 9,24) (ALTRIA, 1996) com SDS. O tampão tetraborato foi testado nas concentrações de 20 e 40 mM com SDS 25 e 50 mM e valores de pH 9 e 10. O tampão borato foi avaliado nas concentrações de 25 e 50 mM, com SDS 25 e 50 mM no pH 10 somente. Foram

analisados padrão de BTF, o fármaco extraído do creme e o placebo simulado, sendo que a interferência de parte dos excipientes foi novamente verificada.

3. Conclusões

O método desenvolvido por MECK mostrou-se não específico frente à formulação de placebo simulado, inviabilizando seu uso para o creme. A metodologia poderia ser aplicada para a análise de matéria-prima, porém mais estudos são necessários para este uso, sendo esta uma perspectiva futura deste trabalho. Apesar da ineficiência no desenvolvimento de método analítico para quantificação da BTF na formulação semi-sólida, o trabalho reuniu diferentes estratégias de desenvolvimento analítico por EC embasadas na literatura, partindo do modelo simples da CZE empregando diferentes tampões até MECK com aditivos.

4. Referências

AGILENT TECHNOLOGIES. *A Quick Start Guide to Capillary Electrophoresis*. Ed. 02/00, 2000.

ALTRIA, K.D. *Capillary electrophoresis Guidebook*. Totowa: Humana Press, 1996.

ALTRIA, KD; KELLY, MA; CLARK, BJ. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis.I. *Trends in Analytical Chemistry*, v.17, n.4, p. 204 -214, 1998.

ALTRIA, K.D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 856, p. 443-463, 1999.

ALTRIA, K.D. & ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. *Journal of Chromatography A*, v. 1023, p. 1-14, 2004.

Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988, parte IV.

CREGO A., L., MARINA M., L., LAVANDERA, J., L. Optimization of the separation of a group of antifungals by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v.917, p.337-345, 2001.

DOSE, EV & GUIOCHON, GA. Internal Standardization Technique for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, n.63, p. 1154-1158, 1991.

GAONA-GALDOS, A.A., FILHO, L.A.Z., TAVARES, M.F.M, AURORA-PRADO, M.S.A., SANTORO, M.I.R.M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Development and validation of a method for quantitative determination of econazole nitrate in cream formulation by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v.1192, p. 301-305, 2008.

GERVASIO, A.P., LAVORANTE, A.F., MORAES, C.B., GINÉ, M.F., MIRANDA, C.E.S., CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. *Química Nova*, v.26, n.1, p. 65-74, 2003.

GOMES, P., SIPPEL, J., JABLONSKI, A., STEPPE, M. Determination of rosiglitazone in coated tablets by MECK and HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 36, p. 909-913, 2004.

GRAEF, L.E. *Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2007.

KAALE, E; SCHEPDAEL, AV; ROETS, E; HOOGMARTENS, J. Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 1331-1337, 2002

LIU, H., WEN, Y., LUAN, F., GAO, Y. Application of experimental design and radial basis function neural network to the separation and determination of active components in traditional Chinese medicines by capillary electrophoresis. *Analytical Chimica Acta*, v. 638, p. 88-93, 2009.

MAMANI, M.C.V., AMAYA-FARFAN, J., REYES, F.G.R., SILVA, J.A.F., RATH, S. Use of experimental design and effective mobility calculations to develop a method for the determination of antimicrobials by capillary electrophoresis. *Talanta*, v. 76, p. 1006-1014, 2008.

NEMUTLU, E., YARDIMCI, C., OZALTIN, N. Determination of sertaconazole in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 547, p. 83-88, 2005.

SANTORO, M.I.R.M., PRADO, M.S.A., STEPPE, M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.36, n.1, p.97-107, 2000.

SÜSLÜ, I, DERMICAN, S, ALTINOZ, S., KIR, S. Optimization, validation and application of a capillary electrophoretic method for the determination of zafirlukast in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 16-22, 2007.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, v.19, n.2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova*, v.20, n.5, p. 493-511, 1997.

TOASAKSIRI, S., MASSART, D.L., HEYDEN, Y.V. Study of method validation criteria in capillary electrophoresis method for separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Analytica Chimica Acta*, v.416, p. 29-42, 2000.

USP 31. *THE UNITED STATES Pharmacopoeia*. 31th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

CAPÍTULO III. Validação de metodologia para a quantificação do cloridrato de butenafina em segmento de pele e estudo comparativo de retenção cutânea de duas formulações presentes no mercado.

O objetivo deste capítulo foi a validação de um método previamente desenvolvido de cromatografia líquida para avaliar a permeação e a penetração do cloridrato de butenafina presente em formulação semi-sólida através da pele de orelha suína. Para este estudo foram utilizadas células de Franz. Os parâmetros avaliados na validação do método bioanalítico foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e os resultados obtidos estão de acordo com os códigos oficiais. Posteriormente à validação da metodologia, foi realizado um estudo comparativo entre duas formulações e não foi detectada diferença significativa na concentração de fármaco na epiderme, já na derme a diferença foi significativa no período de 8 horas. Não foi detectada presença significativa de fármaco no fluido receptor durante o estudo para ambas as formulações.

Manuscrito a ser submetido ao *Biomedical Chromatography*

A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations.

Aline Bergesch Barth*, Rúbia Lazzaretti Pereira, Bethânia Andrade de Vargas, Nadia Maria Volpato.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre-RS, Brazil.

* Corresponding author: Tel: +55 51 33085214; Fax: +55 51 33085378

E-mail address: alinebbarth@hotmail.com (Aline Bergesch Barth)

Abstract

An analytical chromatographic method previously developed for a butenafine hydrochloride (BTF) formulation was validated for the analysis of the drug in the main skin layers. To evaluate the specificity of the method, the influence of the components of the skin was analyzed, as well as the skin in contact with the excipient ingredients and no signal was detected on the elution of the drug. Linearity was assessed with 8 different solution concentrations in the range of 0.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0.9999$) and ANOVA showed non-significantly linearity deviation ($p > 0.05$). Adequate results were obtained for repeatability, intra-day precision and accuracy, which were analyzed in the following concentrations: 0.5, 3.0 and 8.0 $\mu\text{g/mL}$ of BTF extracted from six layers spiked with the drug. The limit of quantification and the limit of detection were determined using the signal to noise ratio and the obtained values were: 68.4 ng/mL and 17.7 ng/mL, respectively. After the validation of the analytical method, a comparative study of BTF cutaneous penetration through porcine skin was performed applying two different formulations: Tefin, present in the Brazilian market, and Lotrimin Ultra[®], available in the American market, and no statistical difference was found in the epidermis ($p > 0.05$) although in the dermis the difference was significant ($p < 0.05$). During the experiment period (8 hours) no drug permeation from both formulations was detected in the receptor fluid.

Keywords: method validation, Franz cell, porcine skin, butenafine hydrochloride.

Introduction

Butenafine (*N*-4-*tert*-butylbenzyl-*N*-methyl-1-naphthalenemethylamine hydrochloride) (Figure 1), a broad-spectrum topical antifungal agent (Mingeot-Leclercq *et al*, 2001; Singal, 2008), shows excellent therapeutic efficacy in humans with dermatomycoses (Arika *et al*, 1993; Gupta *et al*, 1998; Mcneely and Spencer, 1998; Mingeot-Leclercq *et al*, 2001). The drug readily interacts with lipids and is incorporated into membrane phospholipids which may explain the excellent antifungal efficacy and long duration of action when it is used as a topical antifungal agent in humans (Mingeot-Leclercq *et al*, 2001). The drug mechanism of action is based on the inhibition of the fungal enzyme squalene epoxidase, blocking the biosynthesis of ergosterol, which is an essential component of fungal cell membranes (Gupta *et al*, 1998; Mcneely and Spencer, 1998; Gupta, 2002). Butenafine hydrochloride (BTF) was introduced in the Brazilian market in 2007 formulated as 1% (*w/w*) cream.

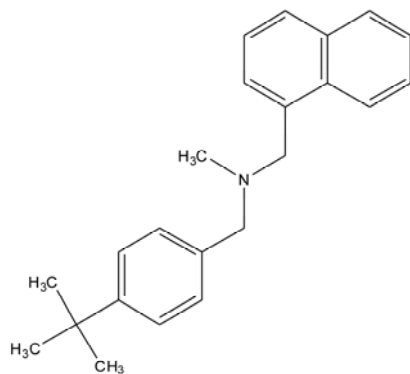


Figure 1. Chemical structure of BTF.

In order to design dermal delivery systems and/or superficial topical delivery it is essential to understand the permeation and/or retention of drugs through/into the skin. Crucial parameters include the amount of active agent accumulated in the different strata of the skin, as well as the flux through the skin into the systemic circulation. For topical delivery systems, accumulation in the skin with minimal permeation is desired, while for systemic delivery, the

opposite behavior is preferred (Touitou *et al*, 1998). In spite of the use of BTF in topical formulations, there are only few studies that quantify the drug in the skin: two animal studies (Arika *et al*, 1990; Arika *et al*, 1993) and a human study (Tanuma *et al*, 2001), but only one of them quantifies the BTF in different layers of the skin (Arika *et al*, 1993), however it applies an *in vivo* model. The applied method is complex, expensive, multi-step, time-consuming and demand the use of animals. Consequently, it is not a convenient method for assessing the drug delivery in different skin layers as usually necessary in skin penetration studies performed to assess drug delivery to the skin during development of new topical formulations (Wagner *et al*, 2000; Lopes *et al*, 2010; USP, 2009b), to allow the comparison of generic products with an innovator (De Paula *et al*, 2008; USP, 2009b) and in post-approval drug product monitoring (USP, 2009b). The use of excised human skin in an *in vitro* model is an alternative (Wagner *et al*, 2000), however, its availability is limited and animal skin is therefore preferred (Moser *et al*, 2001; SCCP, 2006). Studies have been demonstrating that porcine skin is the most relevant animal model for human skin (Touitou *et al*, 1998; Moser *et al*, 2001; Schmook *et al*, 2001; SCCP, 2006, Jacobi *et al*, 2007; Meyer *et al*, 2007; Barbero & Frasch, 2009). In this context, the diffusion cell model is the standard for measuring drug permeation across the skin. This model consists of donor and receptor compartments separated by the skin sample and the permeation rate through the skin into the receptor compartment as well as the drug retention in the skin are quantified with an analytical method as LC (Touitou *et al*, 1998; Moser *et al*, 2001; SCCP, 2006).

Considering that dermatophytosis are superficial fungal infections (Singal, 2008) with treatment efficacy dependent on the drug localization in the skin and that BTF is strictly for topic use with limited data about systemic toxicity (Leshner *et al*, 1997), the objective of the present study was to validate the previously developed LC method in compliance with the CDER/FDA Guideline (2001) for the *in vitro* determination of the permeation and penetration

of BTF from creams in porcine ear skin using the Franz cell diffusion model, as well as to compare the penetration of BTF from two products: formulation T (Tefin), available in the Brazilian market, and formulation L (Lotrimin Ultra[®]), present in the American market.

Materials and Methods

Materials

The reference standard was kindly supplied by Brainfarma (Rio de Janeiro, Brazil) and both creams T and L were obtained in the local Brazilian and American market, respectively, and are claimed to contain 1% (w/w) of BTF. The following inactive ingredients are present in formulation T: benzyl alcohol, ethyl alcohol, cetyl alcohol, sodium benzoate, emulsifying wax, edetate disodium, polyethylene glycol 40 stearate, liquid petrolatum, polysorbate 60, propylene glycol, simethicone, white petrolatum, sodium hydroxide and water. The American formulation L contains the following excipient ingredients: benzyl alcohol, cetyl alcohol, sodium benzoate, stearic acid, diethanolamine, glycerin, glycerin monostearate SE, polyoxyethylene (23) cetyl ether, propylene glycol dicaprylate, white petrolatum and purified water

All reagents used in this work were analytical or HPLC grade. Acetonitrile and methanol were purchased from Tedia (Fairfield, USA) and the phosphoric acid from Merck (Darmstadt, Germany). Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV with pump (Molsheim, France). The porcine ears were obtained from a local slaughterhouse (Harmonia, Brazil).

Chromatographic system

The LC method was previously developed for the stability study of the semi-solid formulation and its validation for this matrix was done according to the ICH Guideline (2005) with the analysis of the specificity enclosing degradation conditions as: acid and basic media with HCl 1M and NaOH 1M, respectively, oxidation with H₂O₂ 10% and the exposure to UV light (254nm). For the robustness evaluation, critical factors (pH and concentration of trietilamine solution, concentration of organic phase, detector wavelength, column manufacturer and analysis temperature) were selected to examine the method robustness with the two-level Placket-Burman experimental design. The method consists on: LC system (Agilent 1200 series, Santa Clara, USA) containing a G1311A quaternary pump, G1322A vacuum degasser, G1316A thermostat column compartment, G1329A standard auto sampler and G1315B diode array detector set at 283nm. The analytical column, a Shim-pack CLC – C8 (M) (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) and the guard column, a Shim-pack CLC G-C8 (4) (4.0 mm i.d., 10 mm long) (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) were operated in ambient temperature (25 °C). The mobile phase was composed by acetonitrile, methanol and a solution of triethylamine 0.3% adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid 10% (6:3:1; v/v/v) in isocratic mode at a flow rate of 1 mL/min and the sample injection volume was 20µL.

Calibration Standards

The stock solution of BTF reference standard was prepared in methanol. The working standard solutions (25, 150 e 400 µg/mL) were obtained by the dilution of the stock solution

in the same solvent. This series was applied to spike skin samples during the validation. To execute the permeation studies, solutions of 0.5, 3.0 and 8.0 µg/mL were obtained from the dilution from the working solution with methanol, spiked with porcine skin as described for linearity in *Method Validation*, and applied as the external calibration curve.

Skin Preparation

During transport from the slaughterhouse the fresh porcine ears were kept at 4 °C. After cleaning with water, skin samples (central region from the outer side of the auricle) were excised by the use of scissors and a scalpel. Then all the skin was cut in round pieces to be placed in the Franz diffusion cells. These pieces had the thickness measured with a caliper and the range of thickness between 1.0 and 1.2 mm was accepted to be used in the experiments (OECD, 2004). After that, they were packed in PVC film and aluminum foil, than stored at -20 °C and used within a month. The ears were obtained from a local slaughterhouse and the following criteria were applied: they had to be from the same porcine race, age between 4 and 6 months, white and the excision procedure had to be done before the usual scalding of the animals. No skin with wounds, warts or hematomas was accepted.

Butenafine Hydrochloride Extraction Procedure

Porcine ear skin sliced in round pieces with 1.5 cm diameter (same internal diameter that is in contact with the receptor media, of the Franz cell) had the dermis and epidermis separated. The skin was placed in a water bath at 60 °C for 1 minute and the layers were separated with a scalpel. Then, the skin pieces were cut in small pieces, placed in tubes and 100 µL of a solution containing 5 mg/mL of BTF was carefully added on the skin. A weak

hand agitation was performed and after the solvent had evaporated, 5 mL of methanol was added (final concentration of 100 µg/mL). As BTF is highly soluble in methanol, this was the first and unique tested solvent. Five different series combining ultrasonic bath and vortex–stirring were tested: 2 min of vortex–stirring followed by 5 min in ultrasonic bath, the same series 2 times, the same series 3 times, just 10 min in ultrasonic bath and just 20 min in ultrasonic bath. After the selection of the extraction procedures, a second extraction was performed to the same skin layers to verify a possible residual presence of the drug.

Method Validation

To test linearity, standard plots were constructed with eight concentrations in the range of 0.1–10 µg/mL of the drug prepared in triplicates. The final dilution of each volumetric flask was done with methanol spiked with porcine skin according to the proportion obtained during the permeation studies (round skin of 1.5 cm diameter cut in small pieces to each 5 mL of diluent). The linearity was evaluated by linear regression analysis that was calculated by the least square regression and by ANOVA for compliance of the linear model.

The quantification and detection limits were obtained based on signal-to-noise approach. The background noise was obtained after injection of the blank, observed over a distance equal to 20 times the width at half-height of the peak in a chromatogram obtained by the injection of 3 µg/mL (intermediate concentration from the accuracy curve) of the reference standard. The signal-to-noise ratio applied was 10:1 for the LOQ and 3:1 for the LOD. The results were verified experimentally and the diluent was composed by methanol spiked with skin according the proportion described in the linearity test. Therefore, a possible interference of the skin on the LOD and LOQ was considered.

The repeatability was verified from five independent sample preparations in the same day. The intermediate precision was tested by assaying freshly prepared sample solutions at different concentrations in other day. Each day, rounded skins with 1.5 cm of diameter had the dermis separated from the epidermis and they both were cut in small pieces and placed in tubes. These layers were spiked with 100 μL of working standard solutions (25, 150 or 400 $\mu\text{g/mL}$) and after the methanol evaporation, 5 mL of methanol were added to obtain the theoretical concentrations of 0.5 (first day), 3.0 and 8 $\mu\text{g/mL}$ (second day). Precision was reported as %R.S.D.

The accuracy was determined by the recovery of known amounts of BTF reference standard added to the skin to verify the agreement between the measured and nominal concentrations of the analytes in the spiked drug-free matrix samples. The results were obtained from the three levels also assayed for repeatability and expressed as the percentage of BTF reference standard recovered from the sample.

The specificity was assessed by comparing the chromatograms obtained from the extraction solution of the skin in contact with pharmaceutical preparation, with the extraction solution of the skin only and also with the extraction solution of the skin in contact with the excipient ingredients of the formulations. The absence of interferences was verified in all cases.

Application of the Method to in vitro Skin Penetration Studies

Prior to the use, the skin specimens were defrosted at ambient temperature and then placed in the Franz-type diffusion cell (Hanson Research, Chatsworth, USA), with the epidermis facing the donor compartment and the dermis facing the receptor compartment. The nominal diffusion area of the Franz cell was 1,77 cm^2 and the receptor volume contained 7 mL

of degassed water adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid 10%. As in our previous study the drug showed stability in strong acid conditions (HCl 1M) for 6 days at room temperature, the drug was stated as stable in this media (Barth *et al*, 2010). Butenafine hydrochloride solubility in the receptor phase was determined, achieving sink conditions to have a high capacity to dissolve and carry away the drug (USP *et al*, 2009a). One infinite dose of the Brazilian or the American formulation (200 mg) was placed on the skin surface in the donor chamber. At given times intervals (1h, 2h, 4h, 6h and 8h) aliquots of 1 mL were collected to be analyzed and the same volume of receptor fluid was replaced. The receptor medium was maintained at 37 °C, in order to keep the skin surface at 32 °C (the ambient temperature was 21 °C) and magnetically stirred at 500 rpm. Eight replicates of the formulation plus two of excipients ingredients were done to each product.

After eight hours of experiment, the skin was removed from the Franz diffusion cell and the excess of formulation was removed with the help of a spatula followed by the separation of the dermis from the epidermis using a scalpel. The skin layers were weighted and BTF was extracted according to *Butenafine Hydrochloride Extraction Procedure*, previously described.

The results are reported as means \pm R.S.D. (n = 8). Data were statistically analyzed using the *t* – test, after assuring the normal distribution. The level of significance was set at α = 0.05.

Results and Discussion

Butenafine Hydrochloride Extraction Procedure

The results for the five different tested series combining ultrasonic bath and vortex – stirring ranged from 90.57 to 107.94 % for the dermis and 89.95 to 97.52 % for the epidermis. Although all the obtained values could be acceptable, the easiest procedure was not chosen, as the spiking of the skin with the drug solution does not truly represent the complete penetration of a drug, then the sequence of 2 min of vortex – stirring followed by 5 min in ultrasonic bath executed 2 times was selected for the study. After the extraction of a skin penetration study, a second extraction was performed with the same skin samples (two dermis and two epidermis) and no drug was detected in the methanolic solution. This result confirms the efficiency of the first extractive procedure.

Method Validation

Linearity, LOD and LOQ: over the concentration range of 0.1 – 10 µg/mL, the slope and the intercept obtained from the three standard curves analyzed together were 22.613 and 0.3686, respectively, and the determination coefficient was 0.9999. The analysis of variance revealed that the obtained results correspond to a linear regression ($p < 0.05$) with adequate fitting ($p > 0.05$). Regarding the intercept, it was not significantly different from the theoretical zero value ($p > 0.05$). LOQ and LOD were 0.0684 and 0.0177 µg/mL, respectively.

Precision: repeatability and intermediate precision results are expressed as relative standard deviations (%R.S.D.). The %R.S.D. values presented in Table 1 were low for both the repeatability and the intermediate precision (%R.S.D. maximum 5.16% for epidermis in the inter-day precision), demonstrating the adequate precision of the developed method for penetration studies.

Accuracy: the data for accuracy were expressed in terms of percentage recoveries of BTF from the samples. These results are summarized in Table 1. The mean recovery data

were within the range of 100.50 to 111.04% for the epidermis and in the range of 99.11 to 101.10 % for the dermis, in accordance to the literature recommendations of overall recovery in the range of 85-115 % for bioanalytical methods (Causon, 1997; CDER/FDA, 2001; SCCP, 2006).

Table 1. Precision and Accuracy of the analytical method: BTF extracted from Epidermis and Dermis.

	Accuracy	Intra-day precision (n=5)
	Mean recovery (%)	R.S.D. (%)
Day 1 - 0,5 µg/mL*		
Epidermis	111.04	2.69
Dermis	101.10	3.70
Day 2 - 3.0 µg/mL		
Epidermis	100.79	2.52
Dermis	99.67	2.02
Day 2 - 8.0 µg/mL		
Epidermis	100.50	1.15
Dermis	99.11	1.35
		Inter-day precision (n=14)
		R.S.D. (%)
Epidermis		5.16
Dermis		2.48

* n=4: one sample of each layer in this day was lost during manipulation

Specificity: the analyses of the chromatograms obtained from the skin itself and from extraction solution from the skin with excipient ingredients demonstrated the absence of interference from the matrix with the BTF elution, as shown in Figure 2 and 3.

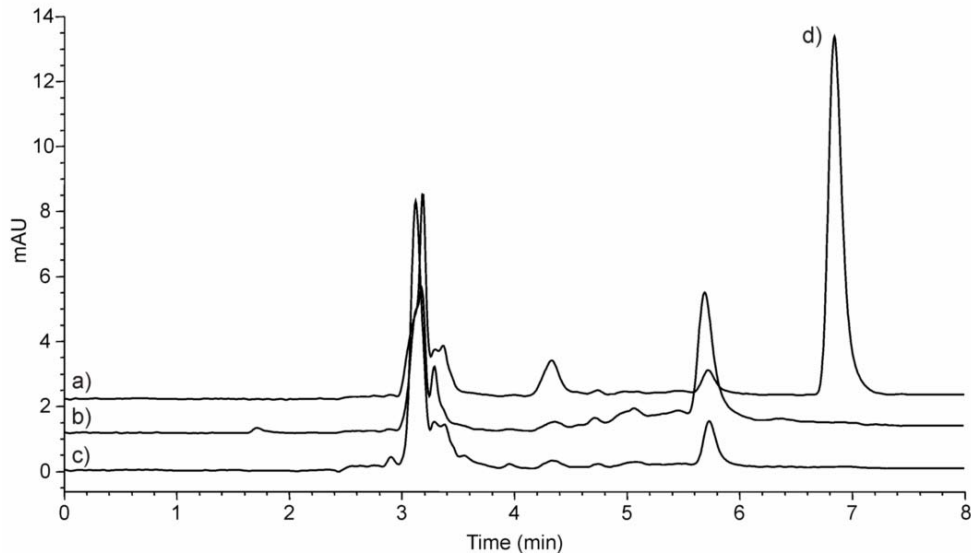


Figure 2 Chromatograms from: a) extraction solution from epidermis in contact with formulation T eight hours after the permeation study, b) extraction solution from epidermis in contact with the excipient ingredients from formulation L eight hours after the permeation study, c) extraction solution from epidermis in contact with the excipient ingredients from formulation T eight hours after the permeation study, d) BTF peak in the concentration of 4.32 $\mu\text{g/mL}$. The scale from the Y axis corresponds to the scale from chromatogram c.

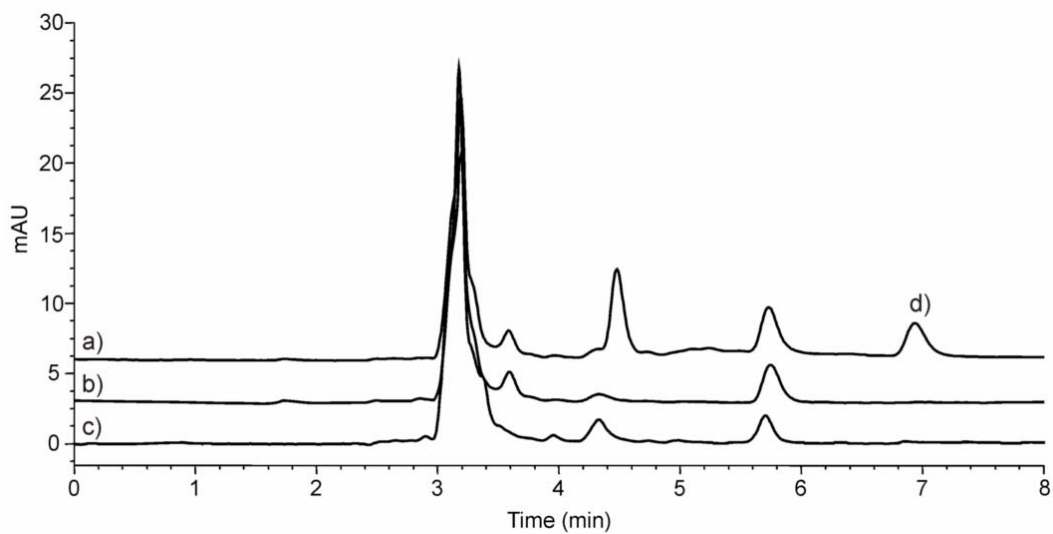


Figure 3. Chromatograms from: a) extraction solution from dermis in contact with formulation L eight hours after the permeation study, b) extraction solution from dermis in contact with the excipient ingredients from formulation L eight hours after the permeation study, c) extraction solution from dermis in contact with the excipient ingredients from formulation T eight hours after the permeation study, d) BTF peak in the concentration of 1.20 $\mu\text{g/mL}$. The scale from the Y axis corresponds to the scale from chromatogram c.

Method Application in a comparative cutaneous retention study

The application of this analytical method was demonstrated by the quantification of BTF in both porcine skin layers samples (dermis and epidermis) and samples of the receptor fluid compartment of diffusion cells after *in vitro* cutaneous penetration study. To perform this experiment the two different formulations T and L containing BTF were used as donor phase. The penetration experiment was carried out over 8 hours. The amount of BTF retained in the skin layers was: 308.60 and 8.45 ng/mg of skin (T) and 225.88 and 14.14 ng/mg of skin (L), for the epidermis and dermis, respectively. Another approach for exposing the results related to the total amount of drug and skin is: 3.12 μg and 4.14 of BTF in 331.42 mg of dermis (mean weight) for formulation T and L, respectively. In the epidermis the amount of BTF detected was: 15.14 μg (T) and 14.56 μg (L) in a mean epidermis weight of 55.86 mg. Two epidermis samples from formulation L were detected as outliers, according to the Dixon's Q Test (Burgess, 2005), and excluded from the data analysis.

The statistical interpretation, through the *t*-test, allowed to define if the amount of drug was significantly different in the skin layers for the different formulations. The penetration in the epidermis was not statistically different ($p > 0.05$) for them. However, in the dermis there was a statistically significant difference between the penetrations of BTF from the semi-solids ($p < 0.05$) and the higher penetration was achieved with formulation L. The graphical representation of the results can be seen in Figure 4 and 5. Dermatophytosis normally occur in the outermost layer of the skin, the epidermis (Weitzman and Summerbell, 1995; Crawford and Hollis, 2007). Therefore, the antifungal action is exerted in this layer and it is desired that the drug remains in this localization and does not penetrate to deeper tissues or achieve the circulation.

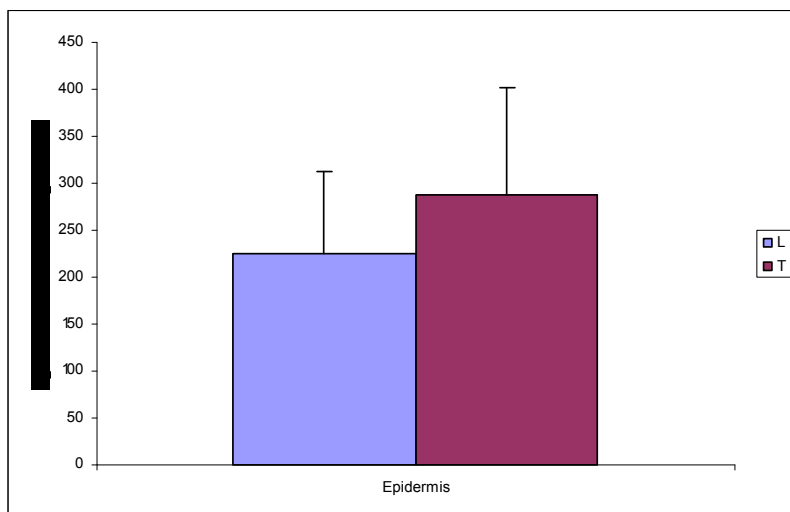


Figure 4. Plots of the mean concentration of formulations L and T in the epidermis with the respective standard deviations.

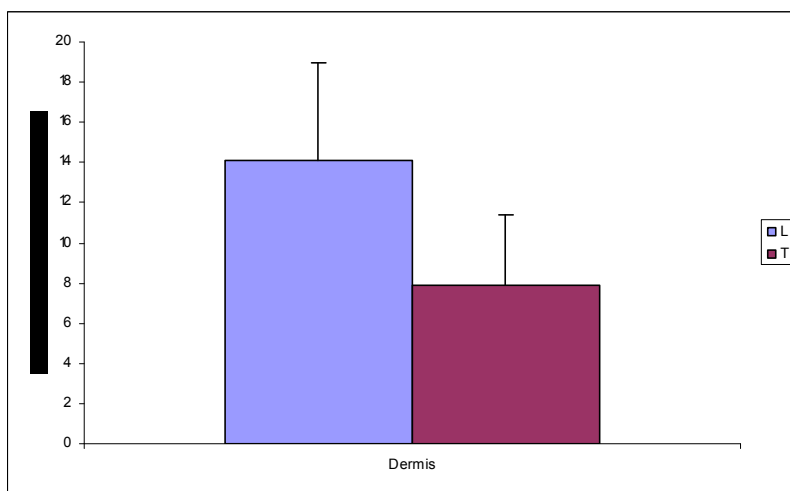


Figure 5 Plots of the mean concentration of formulations L and T in the dermis with the respective standard deviations.

Finally, the presence of BTF in the receptor compartment was detected in just one cell of the formulation T. The drug quantity was low: under the LOQ at 4 hours of experiment and at 6 and 8 hours the concentration was slightly over the LOQ, which after the calculation of the 8 cells mean was unexpressive.

Conclusion

The developed performance test for butenafine hydrochloride from creams enclosing the use of Franz diffusion cell with quantification of the drug in the main layers of the skin and in the receptor compartment has the necessary characteristics for a good bioanalytical method: reproducibility, reliability, ability to measure drug release from the finished dosage form and capacity of measuring changes in drug release characteristics from the finished product. Those changes may be related to active or inactive/inert ingredients in the formulation, physical or chemical attributes of the finished formulation, manufacturing variables, shipping and storage effects, aging effects, and other formulation factors critical to the quality characteristics of the finished drug product (USP, 2009b).

In this context, the reverse phase LC method proposed was found to be simple, fast, accurate, precise, linear and specific and it is a powerful tool to investigate the presence of BTF in skin samples and in the receptor compartment after in vitro permeation/retention studies. All the parameters meet the criteria of the FDA guidelines for method validation. Its chromatographic retention time of 6.8 min allows the analysis of a large number of samples in an adequate period of time.

The method applicability to permeation studies was proved through the evaluation of two formulations: T and L and there were no significant differences between the BTF penetration in the epidermis, but in the dermis the difference was significant ($\alpha = 0.05$) and no expressive drug permeation of both formulations was detected through porcine skin in vitro during 8 h.

The developed method is important to a complete analysis of topical formulations and to learn about the penetration profile of the drug in the cutaneous tissue, including the quantity

of active substance in the different layers of the skin and the flow from it to the systemic circulation, which could cause toxic effects as the systemic safety of this drug is not known.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Brazil) for the financial support, Brainfarma for the provision of BTF reference standard and the Laboratory of Technological Development (UFRGS) for using its circulating water-bath with magnetic-stirring.

References

Arika T, Hase T, Yokoo M, Maeda T, Amemiya K and Yamaguchi H. Effects of butenafine hydrochloride, a new benzylamine derivative, on experimental dermatophytosis in guinea pigs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1990; 34 (11): 2250-2253.

Arika T, Hase T, Yokoo M. Anti-*Trichophyton mentagrophytes* activity and percutaneous permeation of butenafine in guinea pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37 (2): 363-365.

Barbero AM and Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicology in Vitro* 2009; 23: 1–13.

Barth AB, Oliveira, GB, Malesuik, MD, Paim, CS, Volpato, MN. Stability-indicating LC assay for butenafine hydrochloride in creams using an experimental design for robustness evaluation and photodegradation kinetics study, 2010 (paper submitted).

Burgess C. Aberrant or Atypical Results. in: J. Ermer, J.H.McB. Miller (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, Weinheim 2005, 355-386.

Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B* 1997; 689:175-180.

CDER/FDA. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 2001.

Crawford F and Hollis S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2007;18(3).

De Paula D, Martins CA and Bentley MVLB. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. 2008; 22: 1416–1423.

Gupta AK; Einarson TR; Summerbell RC and Shear NH. An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses. A North American perspective, *Drugs* 1998; 55(5): 645-674.

Gupta AK. Butenafine: An update of its use in superficial mycoses, *Skin Therapy Letter*. 2002, 7(7): 1-5.

ICH. Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology. In: *Proceedings of the International Conference on Harmonization Q2 (R1)*, 2005

Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W and Lademann J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology* 2007; 13: 19–24.

Leshner JL; Babel DE; Stewart MD; Jones TM, Kaminester L, Goldman M, weintraub JS. Butenafine 1% cream in the treatment of tinea cruris: A multicenter, vehicle-controlled, double-blind trial. *Journal of American Academy of Dermatology* 1997, v.36, p.20-4.

Lopes LB and Reed R. A simple and rapid method to assess lycopene in multiple layers of skin samples. *Biomedical Chromatography* 2010; 24: 154–159.

McNeely W. and Spencer C.M. Butenafine. *Drugs* 1998; 55(3): 405-412.

Meyer W, Kacza J, Zschemisch NH, Godynicki S, Seeger J. Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin. *Annals of Anatomy* 2007; 189: 143-156.

Mingeot-Leclercq MP, Gallet X, Flore C, Van Bambeke F, Peuvot J and Brasseur R. Experimental and conformational analyses of interactions between butenafine and lipids. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; 45 (2): 3347-3354.

Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2001; 52:103-112.

OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals: Skin absorption: *in vitro* method. Organization for Economic Co-operation and Development. 428. 2004:1-8.

SCCP. Opinion on basic criteria for the in vitro assessment of derma absorption of cosmetic ingredients – updated March 2006. Scientific Committee on Consumer Products - SCCP/0970/06. 2006:1-12.

Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 215: 51–56.

Singal A. Butenafine and superficial mycoses: current status. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2008, 4(7): 999-1005.

Tanuma H, Doi M, Ohta Y, Abe M, Kume H, Mukai H, Katsuoka K. Butenafine hydrochloride (Mentax[®]) cream for the treatment of hyperkeratotic type tinea pedis and its transfer into the horny layer, with or without concomitant application of 20% urea ointment (Keratinamin[®]). *Mycoses* 2001; 44: 287-299.

Touitou E, Meidan VM, Horwitz E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release* 1998; 56: 7–21.

USP. Topical and transdermal drug products. *Pharmacopeial Forum* 2009a; 35(3):750-753.

USP. Topical and transdermal drug products – product quality tests. *Pharmacopeial Forum* 2009b; 35(3):1-10.

Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharmaceutical Research* 2000; 17 (2): 1475-1481.

Weitzman I and Summerbell RC. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8(2): 240–259.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

A carência de literatura científica analítica sobre o antifúngico cloridrato de butenafina e a sua introdução no mercado nacional em 2007 como medicamento de venda livre, requerem o desenvolvimento de métodos de análise de domínio público nacional, para que possam ser utilizados no controle de qualidade do insumo e do medicamento.

Neste contexto, a presente pesquisa foi desenhada com o intuito de desenvolver e validar métodos quantitativos para a análise do cloridrato de butenafina na sua forma farmacêutica, avaliar a aplicabilidade destes métodos para estudos de estabilidade, incluindo a determinação da cinética de degradação do fármaco frente a condição de estresse e de desenvolver e validar método para avaliar a penetração e permeação cutânea da BTF *in vitro*, empregando pele animal, bem como avaliar a aplicabilidade do método na análise comparativa de duas formulações presentes no mercado.

Primeiramente foram realizados testes para caracterizar a BTF substância de referência, visando ao seu uso como padrão. Esses testes incluíram: solubilidade, IV e DSC para a caracterização qualitativa. Já para sua caracterização quantitativa foi desenvolvido método de titulação potenciométrica, explorando a característica de base fraca da molécula. Adicionalmente foi desenvolvido método por CCD para identificação do fármaco no creme.

A validação de método por CLAE, com a utilização de condições normais de coluna (C8) e detector (UV/DAD) permitiu a análise qualitativa e quantitativa do fármaco de maneira rápida e eficiente. Além disso, a exposição do fármaco a fatores de estresse possibilitou a elucidação de fatores aos quais a molécula é susceptível e a influência dos excipientes. O fármaco demonstrou ser sensível à luz UVC, ao meio oxidativo e, na análise da formulação em solução, ao meio básico. As degradações por oxidação mostraram-se mais intensas na análise da solução obtida do produto farmacêutico do que no fármaco isoladamente. A eluição diferenciada do fármaco e seus produtos de degradação garante a característica de método indicador de estabilidade, sendo essencial para estudos futuros de isolamento e identificação de produtos de degradação do fármaco, com o objetivo da análise de aspectos toxicológicos e biológicos visando à manutenção da eficácia e segurança do produto farmacêutico.

A determinação da cinética de degradação em condições fotolíticas, definida como de primeira ordem, permitiu avaliar o grau de transformação durante o período de estudo. A alta velocidade de degradação da BTF permitiu detectar acentuada labilidade em condições fotolíticas, informação de extrema importância para a produção, controle de qualidade, armazenamento e embalagem de matéria-prima e forma-farmacêutica.

As tentativas de desenvolvimento de método por eletroforese capilar representaram um conjunto de estratégias empregando diferentes modelos, CZE e MECK, e considerando as variáveis críticas de cada técnica. Apesar do método por MECK desenvolvido não ser específico frente aos excipientes da formulação, impedindo seu uso para a forma farmacêutica, o método poderia ser validado para a análise de matéria-prima.

Para uma completa avaliação de formulações de liberação tópica é importante conhecer o perfil de penetração do fármaco no tecido cutâneo, incluindo a quantidade de substância ativa presente nas diferentes camadas da pele e o fluxo através dela para a circulação sistêmica, principalmente quando se trata de molécula não administrada por via oral/sistêmica, fato do qual pode se depreender sua baixa segurança sistêmica. Neste sentido, a adequação do método analítico descrito por CLAE para a análise da penetração do fármaco em diferentes camadas de pele suína foi assegurada, permitindo a avaliação *in vitro* da penetração e da permeação cutânea. Na análise da matriz biológica o método mostrou-se reprodutível, confiável, capaz de medir o fármaco liberado da formulação para o tecido cutâneo e conseqüentemente de fornecer informações relevantes.

Após a validação do método bioanalítico, foi realizado estudo comparativo de penetração cutânea de BTF em pele suína utilizando a célula de difusão de Franz e empregando-se duas formulações: Tefin, presente no mercado brasileiro, e Lotrimin Ultra[®], disponível no mercado americano, e não foi encontrada diferença significativa na penetração da BTF na epiderme. Já na derme a diferença encontrada entre as concentrações foi significativa. No período de estudo de 8 horas não houve permeação considerável do fármaco de ambas as formulações, uma vez que não foi detectada BTF no fluido receptor.

De modo geral, os resultados desse trabalho descrevem: (i) metodologia analítica indicativa de estabilidade por CLAE para a análise de BTF, bem como os principais agentes aos quais o fármaco em solução é susceptível, (ii) cinética de fotodegradação do fármaco frente à luz seguindo primeira ordem, (iii) estratégias para o desenvolvimento de metodologia por EC e método para a análise da matéria-prima, (iv) método para análise de BTF na pele suína e (v) comparação na permeação / penetração cutânea do fármaco de duas formulações diferentes, sendo que não foi detectada diferença significativa na retenção do fármaco na epiderme, porém na derme esta diferença foi significativa.