

Determinação do fluconazol em cápsulas magistrais, por espectrofotometria

Determination of fluconazole in master capsules by spectrophotometry

RESUMO: O fluconazol possui atividade antifúngica, classificação biofarmacêutica descrita na literatura como classe I e é considerado, portanto, um fármaco de solubilidade e permeabilidade alta. Encontra-se disponível na forma de cápsula e é produzido a nível industrial e magistral. O principal propósito deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica por espectrofotometria para doseamento de fluconazol em cápsulas magistrais. Para tanto, o método foi aplicado, as amostras foram diluídas em metanol, assim como as soluções do padrão no intervalo de concentrações de 100 a 350µg/mL. O comprimento de onda para leitura foi de 260nm. O método analítico apresentou linearidade ($R^2 = 0,9995$) a equação $y = 0,0021x + 0,0041$, precisão $\pm 0,83$ ($CV\% \leq 5\%$), exatidão $\pm 0,41$ e robustez (comprimento de onda diferentes 260 e 262nm, diferentes marcas de solventes) e seletivo. Portanto, método desenvolvido e validado apresenta as características fundamentadas a partir dos resultados encontrados e de acordo com os objetivos deste trabalho.

Palavras-chave: Validar; método; doseamento; metanol.

ABSTRACT: Fluconazole, has antifungal activity, biopharmaceutical classification described in the literature as class I and is therefore considered a drug solubility and high permeability. It is available in capsule form and is produced at the industrial and master level. The main purpose of this study was to develop and validate an analytical methodology for spectrophotometric determination of fluconazole in capsules. Therefore, the method has been applied, the samples were diluted in methanol, and the standard solutions in the concentration range of 100 to 350 ug / ml. The wavelength for reading was 260nm. The analytical method was linear ($R^2 = 0.9995$) the equation $y = 0.0041 + 0,0021x$, ± 0.83 precision ($CV\% \leq 5\%$), accuracy and robustness ± 0.41 (different wavelength 260 and 262nm, Different brands of solvents) and selective. Therefore, a developed and validated method presents the characteristics based on the results found and in accordance with the objectives of this work.

Keywords: Validate; method; dosing; methanol.

INTRODUÇÃO

As farmácias de manipulação, no Brasil, apresentam uma característica diferente das de outros países, que é a oferta de variados tipos de medicamentos, mesmo aqueles já disponibilizados pela indústria farmacêutica, sendo que, a preços mais baixos e, por conseguinte, as farmácias magistrais se disseminaram por todas as cidades brasileiras (PINHEIRO, 2008). Nas últimas décadas a atividade da manipulação teve uma retomada expressiva ocupando atualmente números significativos no mercado comercial (ALVES et al., 2009). O panorama setorial sobre as farmácias de manipulação brasileiras (2015/2016), realizado pela Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais (Anfarmag), aponta que 73% dos entrevistados registraram crescimento em seu faturamento ou resultados estáveis no ano passado. A expectativa é que o setor movimente R\$5 bilhões de reais por ano.

A história da farmácia brasileira coloca, atualmente, a manipulação de medicamentos em situação de destaque, pois, além de oferecer à população uma alternativa segura para obtenção de formulações farmacêuticas personalizadas e de custo acessível, resgata a importância da presença do profissional (BRAGA, 2009; FERREIRA, 2000) nos estabelecimentos farmacêuticos, praticando, a tão importante, atenção farmacêutica (FERREIRA, 2000). E desde então, o mercado nacional adequou-se às novas regras, de forma a garantir a qualidade, eficácia e segurança destes medicamentos (BRAGA, 2009; CARVALHO et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2006).

O fluconazol, α -(2,4-Difluorfenil)- α -(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol, (Fig. 1) é um fungicida que inibe a síntese de ergosterol, um dos constituintes mais importantes das membranas celulares de várias leveduras.

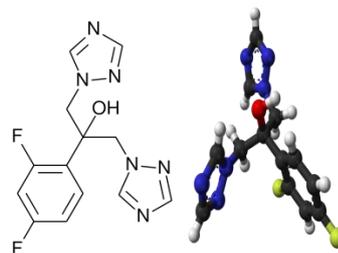


Figura 1: Estrutura química do fluconazol

Este fármaco possui classificação biofarmacêutica descrita na literatura como classe I. É considerado, portanto um fármaco de solubilidade e permeabilidade alta. Tem como características pó branco cristalino e ponto de fusão de 138 a 140°C, máximo de absorção no comprimento de onda de 260nm. (MIRANDA et al, 2013).

O método mais exato para determinação da concentração do princípio ativo de fármacos é a espectrofotometria, onde se usa um espectrofotômetro que apresenta uma fonte de energia radiante (luz), um monocromador, um dispositivo para isolamento de luz monocromática, mais exatamente, faixas estreitas de energia radiante da fonte de luz, células de vidro ou de sílica feixes de energia radiante que passam através do solvente ou da solução. Apresentando como vantagem um meio simples na determinação de substâncias (SILVERSTEIN et al, 2009).

O objetivo desse trabalho é avaliar o teor do fluconazol nas cápsulas que estão sendo produzidas nas farmácias magistrais da cidade de Caruaru-Pe. Tendo como padrão a farmacopeia Brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padrões e reagentes, reagentes e amostras

Para as etapas correspondentes ao desenvolvimento do método e sua validação, foram utilizados o padrão de fluconazol e placebo obtidos em farmácias magistrais de Caruaru em forma de cápsulas.

Material utilizado: micropipeta, balança analítica, vortex, espectrofotômetro UV - VIS shimadzu modelo Uv mini-1240 serial A 109546
Os reagentes utilizados foram: Metanol, grau HPLC.

2.2. Preparo das soluções

Para o preparo de todas as soluções foi usado como solvente o metanol. Inicialmente, preparou-se uma solução mãe pesando-se 50 mg do fármaco em estudo para a obtenção de uma solução de 1 mg/mL. Desta solução transferiu-se alíquotas para os respectivos balões volumétricos de 10 mL e ajustou-se o volume com metanol. Isto para obter as soluções nas concentrações 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL

2.3. Seleção do comprimento de onda

Estabelecidas as condições do ensaio foi determinado o espectro de absorção, transferindo-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão de fluconazol 1.000 µg/mL para um tubo de ensaio de 10 mL e completar com metanol para 2mL, com agitação por 30 segundos no vortex. As leituras das absorvâncias foram efetuadas, contra o branco, no intervalo de 190 a 400 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm.

2.4. Validação do método analítico

O método analítico foi validado segundo critérios estabelecidos na Farmacopéia Americana 29ª edição (USP, 2006) e no "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Brasil, 2003).

2.5 Precisão e Exatidão

A repetitividade do método foi determinada pela análise de seis tomadas de ensaio de 150 mg, obtendo-se soluções na concentração final de 200 µg/mL, realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista. A precisão intermediária e exatidão foram obtidos pela análise da amostra em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes, sendo as mesmas realizadas em seis replicatas, na concentração de 200 µg/mL. As absorvâncias das soluções foram medidas em 260 nm, utilizando-se metanol ajuste do zero. A

partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do ensaio.

2.6. Recuperação

A exatidão expressa, em porcentagem, foi avaliada a partir da adição e recuperação de quantidades conhecidas de fluconazol, na amostra. Foram preparadas soluções na concentração final de 200µg/mL. As absorvâncias das soluções foram medidas em 260nm, utilizando-se solução de metanol para ajuste do zero. A recuperação de 98% a 102% é recomendada para a exatidão do método. O teste foi realizado em triplicata.

2.7. Linearidade

Para o estudo do intervalo foram preparadas soluções em triplicata nas concentrações de 100 a 350 µg/mL de fluconazol em metanol. Mediram-se as absorvâncias das soluções em 260nm, utilizando-se metanol para ajuste do zero. Construiu-se a curva analítica nas concentrações de 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do ensaio.

2.8. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir da curva analítica e calculados pela relação: $3 \times \sigma/S$ e $10 \times \sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica.

2.9. Especificidade

Com a finalidade de verificar a possível interferência dos demais componentes das fórmulas no método e determinar sua especificidade, prepararam-se amostras simuladas isentas de fluconazol que foram submetidas ao método proposto.

2.10. Robustez

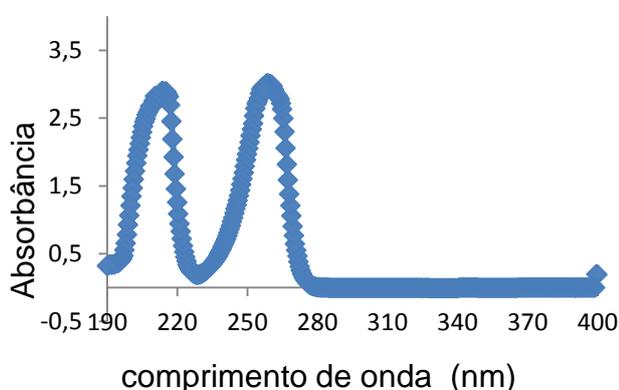
Foi realizado utilizando-se como o comprimento de onda 260nm, diferentes marcas do solvente, metanol (Vetec, lote 110738; F2 : J.T. Baker, lote K49C12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Seletividade

A varredura espectrofotométrica, 190-400nm (Figura 2), realizada para a verificação do comprimento de onda adequado, demonstrou que o fluconazol apresentou pico máximo de absorbância em 260nm, cujo valor foi definido para utilização no desenvolvimento e validação do método analítico por espectrofotometria.

Assim, a seletividade do método foi o primeiro passo no desenvolvimento e validação da metodologia analítica, na qual foi observado que o fluconazol apresentou pico de absorção no comprimento de onda de 260nm, o mesmo não acontecendo com a formulação placebo.



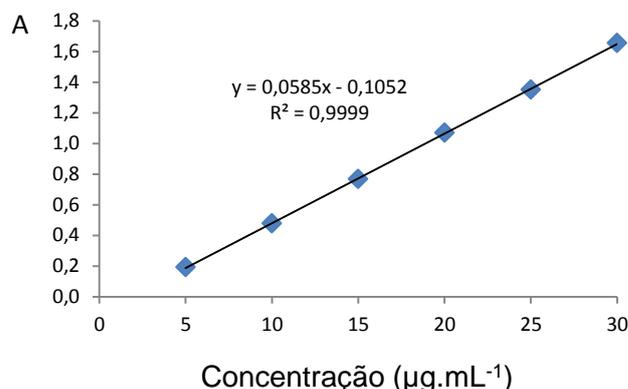
A seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico. Este parâmetro deve ser avaliado continuamente durante a validação e subsequente utilização do método (Silva et al., 2014; Silva et al., 2010). A legislação preconiza que o método pode ser considerado seletivo se nenhum interferente da matriz, sem o fármaco, apresentar absorbância no comprimento de onda específico para a molécula a ser analisada (ICH, 2005; BRASIL, 2003)

Portanto, a metodologia proposta para quantificação do fluconazol demonstrou ser seletiva, uma vez que não houve interferência dos componentes nos pontos específicos de detecção do fármaco (comprimento de onda de 260 nm).

3.2. Linearidade

Submetemos nossas amostras a testes para avaliar a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado conforme Figura 3.

Figura 3 – curva calibração linearidade



O método proposto por espectrofotometria apresentou linearidade em uma faixa de 100 a 350µg/mL. A curva analítica (Figura 3), obtida em triplicata, pôde ser descrita através da equação $y = 0,0021x + 0,0041$, obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9995. O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade e linearidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (Nunes et al., 2005).

A inclinação da curva (coeficiente angular) apresentou valor de desvio padrão igual a 0,0585 e coeficiente de variação de 0,415%. O limite de detecção e o limite de quantificação foram de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos durante a determinação da linearidade. Os valores de CV(%) e Exatidão, obtidos durante a avaliação foram inferiores a $\pm 5,0\%$, com isso atendendo os critérios estabelecidos na RE 899 de 2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 1 – linearidade. Valores correspondentes ($n=3$) do método validado.

Conc (ug/mL)	Média (n=3)	DP	CV (%)	Precisão (%)
100	100,270	1,531	1,53	100,27
150	152,651	0,727	0,48	101,77
200	200,429	0,825	0,41	100,21
250	247,889	1,803	0,73	99,16
300	303,921	1,983	0,65	101,31
350	351,857	0,825	0,23	100,53

3.4. Precisão e Exatidão

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos durante a determinação dos parâmetros precisão e exatidão do método por espectrofotométrico,

Para ambos, os valores de CV(%) obtidos durante a avaliação da precisão foram inferiores a 5,0%. Na determinação da exatidão, demonstrou-se proximidade entre os valores de concentração obtidos pelos métodos e os seus valores teóricos.

Tabela 2 - Precisão e Exatidão. Valores, em µg/mL, correspondentes aos parâmetros de Precisão e Exatidão (n=6) do método validado.

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
Precisão Repetibilidade	200	200,627	0,693	100,31
Precisão Intermediária (Dia 1) Analista 1	200	200,508	0,728	100,25
Analista 2	200	200,825	0,648	100,41
(Dia 2) Analista 1	200	200,508	0,833	100,25
Analista 2	200	200,667	0,566	100,33

3.5. Robustez

As amostras testes foram submetidas para avaliar a robustez, medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. As modificações avaliadas foram: preparo das soluções de leitura utilizando metanol proveniente de diferentes fornecedores (F1: J,T, Baker, lote K49C12; F2 : Vetec, lote 110738); leitura das soluções em diferentes comprimentos de onda (260 e 262nm). Foi constatado que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve suas respostas, em seis replicatas, em meio às variações realizadas. A Tabela 3 mostra os valores obtidos durante a avaliação da robustez do método.

Tabela 3 – Valores, em µg/mL, correspondentes à determinação da robustez do método espectrofotométrico validado (n=6).

Parâmetro	Conc., teórica	Conc., Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	200	200,111	0,597	100,05
B	200	200,508	0,833	100,25
C	200	199,714	0,362	99,86

Legenda: A = Solução de metanol (fornecedor 1, 260nm); B = Solução de metanol (fornecedor 2, 260nm); C = Solução de metanol (fornecedor 1, 262nm).

CONCLUSÕES

O método desenvolvido para quantificar o fármaco em estudo, utilizando a espectrofotometria, mostrou-se de acordo com a RE – 899 (BRASL, 2003). A técnica utilizada mostrou-se prática, simples e objetiva para a quantificação do medicamento manipulado fluconazol.

REFERÊNCIAS

BERGOLD, A. M; GEORGIADIS, S. **Novidades em Fármacos antifúngicos: Uma Revisão.** Revista Visão Acadêmica, Curitiba, v.5, n.2, p. 159-172, Jul – Dez/2004.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 67, Anexo 1, de 08 de outubro de 2007. **Dispõe sobre o regulamento técnico de Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais para Uso Humano em Farmácias.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 08 de outubro de 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa. Resolução n.º 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.** Brasília, DF; 2003. 29 maio.

BUMERAD – CRF-SP n.º 43746 , **Anvisa** em (14/mar/2013)

CARVALHO,G,K; GOMES,L , FERREIRA,A, NOGUEIRA, S, A . **Determinação do teor de fluconazol em cápsulas industriais e magistrais.** Revista Faculdade Montes Belos (FMB), v. 7, n.º 2, 2014, p (47-56), 2014.

COELHO, Helenilze; MATINATTI, Audrei Nunes Fernandes; ARAÚJO, Magali Benjamim; BERGOLD, Ana Maria; BUENO, Francie. **Análise química-farmacêutica do Fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.

DOMINGOS;S,I,A ARAUJO ;B,R, GOMES; S,L,BARBOSA. **Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao**

fluconazol. Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, jul./set. 2005 189

FACHINA, F; SANCHES, A, U. **Uso e aceitação de medicamentos magistrais em pacientes atendidos nas Clínicas Integradas.** *Rev. Bras. Farm.* 93(2): 167-172, 2012

GIL, E.S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos.** 3ª edição, Editora Pharmabooks, São Paulo, 2010. Pág 274. 16

JÚNIOR, S.M. *et al*; **Revista Brasileira Farmácia.** Vol 93, n 2, pg. 265, 2012.

LEAL, L B. *et. al*; **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; vol.43, n. 2, pg. 33, 2007

M. LINDENBERG *et al.* **Fluconazol: Classificação Biofarmacêutica e sugestão de excipiente** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58 (2004) 265–278.)

OLIVEIRA,D,M¹;MARKMAN, B.E.O¹,UESSUGUI ,O¹. **Ensaio de dissolução de capsulas de fluconazol: Problemas encontrados na determinação por espectrofotometria na região do UV** Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2010;31(2):211-213

RAMOS, T. R *et al.* **Validação de um método analítico para a determinação de substâncias ativas em formulações farmacêuticas empregadas em “peelings” químicos.** RBCF. São Paulo, v. 41, n. 2, p. 228- 235, jun. 2005.

SILVESTER, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C., **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** 5ª ed., LTC.(2009)