

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

**Análise químico-farmacêutica e
estudo de estabilidade do voriconazol**

ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

Porto Alegre, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**Análise químico-farmacêutica e
estudo de estabilidade do voriconazol**

Tese apresentada por
Andréa Inês Horn Adams para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria Bergold
Co-orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2007

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.08.2007, pela Comissão/Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Magali Benjamim de Araújo
Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dr. Sílvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

A211a Adams, Andréa Inês Horn

Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do voriconazol / Andréa Inês Horn Adams – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xxviii, 212 p.: il., gráf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Voriconazol. 2. Validação: método de análise de fármacos. 3. Controle de qualidade de medicamentos. 4. Estabilidade. I. Bergold, Ana Maria. II. Steppe, Martin. III. Título .

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Agradecimentos aos Laboratórios de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade que disponibilizaram os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos.

Um homem terá pelo menos dado a partida para a descoberta do sentido da vida humana quando começar a plantar árvores frondosas sob as quais sabe muito bem que jamais se sentará.

Elton Trueblood

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Ana Maria Bergold, por ter me orientado durante o mestrado e doutorado. Por sua disponibilidade, apoio, amizade e carinho, dedicação e exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Martin Steppe, pela receptividade, atenção e orientação na execução do ensaio microbiológico.

Aos Laboratórios de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade, por disponibilizarem a infra-estrutura e materiais necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório Farmoquímico Cristália, que através do farmacêutico Roberto Debom Moreira, concedeu a matéria-prima de voriconazol, que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos farmacêuticos do Hospital São Vicente de Paulo, de Passo Fundo/RS, que possibilitaram a aquisição das formulações usadas no trabalho.

À Farmoterápica, representada pelo farmacêutico Irajá Macchi Júnior, pela doação de materiais utilizados no estudo de estabilidade da formulação injetável.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, co-responsáveis por minha formação profissional e pessoal, pela oportunidade.

À Profa. Dr. Grace Gosmann, por seu incentivo e apoio em momentos importantes destes últimos anos e por seu auxílio na elucidação dos espectros de RMN.

Aos professores do Laboratório de Química Farmacêutica: Dr. Pedro E. Fröhlich e Dr. Jarbas Alves Montanha, pelos esclarecimentos prestados.

Ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM-UFRGS) pela execução das análises de espectrometria de massas.

À Profa. Dr. Naira Balzaretto, do Instituto de Física da UFRGS, pela realização das análises de espectrofotometria no infravermelho.

Aos professores do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, em especial Míriam, Siomara, Carla, Andréa, Cristiane e Mariza, pelo incentivo, amizade e compreensão.

A todos os amigos do LAPPS: Lia, Carol, Rochele, Samuel, Lizi, Inara, Sirlei, Marquinho, Lúcia, Letícia, Laura, Tiago, Jéferson, pela amizade, sugestões ao trabalho e momentos de alegria compartilhados.

Aos amigos que fiz enquanto estudante deste Programa de Pós-Graduação, que já seguiram seu caminho: Vanessa Maio, Ruy Beck, Cristiane da Silva, Simone Gnoatto, Patrícia Amaral e Tatiane Pereira, pelo apoio e amizade.

Ao meu esposo Ilídio pelo amor, constante incentivo, carinho e compreensão.

À minha família, pelo amor, apoio e exemplo de perseverança em todos os momentos.

SUMÁRIO

<i>AGRADECIMENTOS</i>	vii
<i>SUMÁRIO</i>	ix
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	xv
<i>LISTA DE TABELAS</i>	xix
<i>LISTA DE QUADROS</i>	xxi
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	xxiii
<i>RESUMO</i>	xxv
<i>ABSTRACT</i>	xxvii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	07
2.1 OBJETIVO GERAL	09
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	09
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS	13
3.2 ESTUDOS FARMACOECONÔMICOS DO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS	20
3.3 VORICONAZOL	22
3.3.1 Descrição	22
3.3.2 Atividade antimicótica	23
3.3.3 Mecanismo de ação	24
3.3.4 Farmacocinética	25
3.3.5 Efeitos adversos	26
3.3.6 Preparações farmacêuticas	26
3.3.7 Usos	27
3.3.8 Determinação quantitativa	27
3.3.9 Estabilidade	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA E FORMULAÇÕES	35
4.1.1 Substância química de referência (SQR)	35

4.1.2 Formas farmacêuticas	35
4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA SQR	36
4.2.1 Ponto de fusão	36
4.2.2 Poder rotatório específico	36
4.2.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	36
4.2.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	37
4.2.5 Espectrometria de massas	37
4.2.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	37
4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS	37
4.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta	38
4.3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	38
4.3.3 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)	39
4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS	39
4.4.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	39
4.4.1.1 Equipamento	39
4.4.1.2 Validação	39
4.4.1.2.1 Especificidade	39
4.4.1.2.2 Linearidade	40
4.4.1.2.3 Exatidão	40
4.4.1.2.4 Precisão	42
4.4.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência	44
4.4.2.1 Equipamento	44
4.4.2.2 Reagentes	44
4.4.2.3 Fase móvel	44
4.4.2.4 Condições cromatográficas	44
4.4.2.5 Validação	45
4.4.2.5.1 Especificidade	45
4.4.2.5.2 Linearidade	47
4.4.2.5.3 Exatidão	48
4.4.2.5.4 Precisão	49
4.4.2.5.5 Robustez	50
4.4.3 Ensaio microbiológico	51
4.4.3.1 Ensaios preliminares	52
4.4.3.2 Execução do ensaio	52
4.4.3.2.1 Material	53
4.4.3.2.2 Preparação do meio de cultura	54

4.4.3.2.3	Preparação da solução tampão	54
4.4.3.2.4	Preparação do inoculo	54
4.4.3.2.5	Preparação da solução SQR	55
4.4.3.2.6	Preparação da solução amostra	55
4.4.3.2.7	Ensaio	55
4.4.3.3	Validação	56
4.4.3.3.1	Linearidade	56
4.4.3.3.2	Exatidão	56
4.4.3.3.3	Precisão	58
4.5	ESTUDO DE ESTABILIDADE	58
4.5.1	Estabilidade fotoquímica	59
4.5.1.1	Condições	59
4.5.1.2	Amostra em solução	59
4.5.1.3	Amostra em estado sólido	59
4.5.1.4	Comprimidos	60
4.5.2	Estabilidade térmica	60
4.5.2.1	Amostra em solução	60
4.5.2.2	Amostra em estado sólido	60
4.5.3	Estabilidade da preparação extemporânea injetável	61
4.5.3.1	Amostra	61
4.5.3.2	Preparação das soluções	61
4.5.3.3	Reconstituição do injetável	61
4.5.3.4	Preparação da solução para infusão em cloreto de sódio 0,9%	62
4.5.3.5	Preparação da solução para infusão em glicose 5%	62
4.6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	63
4.6.1	Degradação da amostra	64
4.6.2	Isolamento por CLAE semipreparativa	64
4.6.3	Determinação da pureza das frações	64
4.6.4	Concentração das frações	65
4.6.5	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)	65
4.6.6	Espectrometria de massas	65
4.6.7	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C	66
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS PRODUTOS SUBMETIDOS À DEGRADAÇÃO	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	ANÁLISE QUALITATIVA DA SQR	69

5.1.1 Ponto de fusão	69
5.1.2 Poder rotatório específico	69
5.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta	70
5.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	71
5.1.5 Espectrometria de massas	73
5.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	74
5.1.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C	77
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS	80
5.2.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta	80
5.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	81
5.2.3 Cromatografia a líquido de alta eficiência	82
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS	83
5.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta	83
5.3.1.1 Especificidade	83
5.3.1.2 Linearidade	84
5.3.1.3 Exatidão	85
5.3.1.4 Precisão.....	86
5.3.1.5 Validade do ensaio	87
5.3.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência	88
5.3.2.1 Especificidade	89
5.3.2.2 Linearidade	92
5.3.2.3 Exatidão	94
5.3.2.4 Precisão	94
5.3.2.5 Robustez	95
5.3.2.6 Validade do ensaio	98
5.3.3 Ensaio microbiológico	98
5.3.3.1 Linearidade	101
5.3.3.2 Exatidão	103
5.3.3.3 Precisão	104
5.3.3.4 Validade do ensaio	105
5.3.4 Análise comparativa dos métodos	105
5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE	106
5.4.1 Estabilidade fotoquímica	109
5.4.1.1 Estabilidade à luz UV-C (254 nm)	111
5.4.1.2 Estabilidade à luz UV-A (352 nm)	112
5.4.2 Estabilidade térmica	114

5.4.3	Comparação dos produtos de degradação	116
5.4.4	Estabilidade da forma farmacêutica injetável	118
5.4.4.1	Estabilidade do produto reconstituído	119
5.4.4.2	Estabilidade das soluções para infusão	119
5.5	ISOLAMENTO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	126
5.5.1	CLAE semipreparativa	126
5.5.2	Determinação da pureza das frações coletadas	128
5.5.3	Identificação do produto de degradação (PD1)	131
5.5.3.1	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	131
5.5.3.2	Espectrometria de massas	133
5.5.3.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H	133
5.5.3.4	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³ C	137
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS PRODUTOS SUBMETIDOS À DEGRADAÇÃO	139
6	CONCLUSÕES	143
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
8	REFERÊNCIAS	153
9	ANEXOS	
	Anexo 1 – Tabelas de resultados da análise estatística dos métodos quantitativos	
	Anexo 2 – Cálculo do índice de similaridade, através da sobreposição de espectros	
	Anexo 3 – Relação dose/massa corpórea para preparação do injetável	
	Anexo 4 – Tabelas de resultados de estabilidade da formulação injetável	
	Anexo 5 – Espectros de RMN-HETCOR do voriconazol e do PD1	
	Anexo 6 – Artigos publicados	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da anfotericina B.....	15
Figura 2. Estrutura química de fármacos antifúngicos da classe dos imidazóis e triazóis.....	16
Figura 3. Estrutura química da caspofungina.....	19
Figura 4. Biossíntese do ergosterol, apresentando os alvos das várias classes de antifúngicos	20
Figura 5. Estrutura química do voriconazol.	23
Figura 6. Pó para solução injetável de voriconazol, após reconstituição com água estéril para injeção, e bolsas para infusão contendo 0,5 mg/ml de voriconazol em glicose 5% ou cloreto de sódio 0,9%.....	63
Figura 7. Espectro na região do ultravioleta da SQR de voriconazol diluída em água, metanol, hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M.....	70
Figura 8. Espectro na região do ultravioleta de solução da SQR de voriconazol diluída em hidróxido de sódio 0,1 M (20 µg/ml) e avaliada nos tempos zero, 20, 40 e 60 minutos após o preparo.....	71
Figura 9. Espectro na região do infravermelho da SQR do voriconazol, em brometo de potássio.....	72
Figura 10. Espectro de massas (MS/MS) do voriconazol.	74
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H do voriconazol (400 MHz, em DMSO-D6).....	76
Figura 12. Espectro de RMN de ¹³ C do voriconazol, (400 MHz, em DMSO-D6).	79
Figura 13. Espectro de UV do voriconazol SQR e em comprimidos, em diferentes solventes, na concentração de 20 µg/ml. Diluente inicial em todos os testes: metanol. Diluente final: água, metanol e ácido clorídrico 0,1M.....	80
Figura 14. Placa cromatográfica (CCD), visando à identificação do voriconazol em comprimidos e em amostras submetidas à degradação. (1) solução SQR, (2) solução de comprimidos, (3) solução de comprimidos degradada (4) solução de fluconazol	81
Figura 15. Cromatogramas da SQR de voriconazol e dos comprimidos de voriconazol.....	82

Figura 16. Espectro na região do ultravioleta das soluções amostra, SQR e placebo.....	84
Figura 17. Representação da curva padrão de voriconazol, método espectrofotometria de absorção no UV, na faixa de 12 a 24 µg/ml.....	85
Figura 18. Cromatogramas da solução metanólica de comprimidos de voriconazol (VCZ): (1A) solução 100 µg/ml; (1B) solução placebo; (2) degradação em meio alcalino; (3) degradação em meio ácido; (4) degradação em meio neutro; (5A) degradação em meio oxidante-amostra; (5B) branco da reação de oxidação; (6) após exposição à luz UV-A.....	90
Figura 19. Representação gráfica da curva padrão de voriconazol, método de CLAE.....	93
Figura 20. Cromatogramas da SQR de voriconazol (1) e de comprimidos de voriconazol, 100 µg/ml (2).	95
Figura 21. Fotografia de placa obtida através do doseamento microbiológico do voriconazol.....	102
Figura 22. Representação gráfica das curvas de voriconazol, para SQR e amostra, pelo ensaio microbiológico, difusão em ágar – cilindros em placas.....	102
Figura 23. Fotografia dos halos inibição obtidos no teste de recuperação do ensaio microbiológico do voriconazol.....	104
Figura 24. Cromatogramas do voriconazol exposto à luz UV-C. (A) Voriconazol em estado sólido, 14 dias. (B) Voriconazol em solução metanólica, 1 hora. (C) Comprimido íntegro, 14 dias.....	112
Figura 25. Cromatogramas do voriconazol exposto à luz UV-A, por 14 dias. (A) Voriconazol em estado sólido. (B) Solução metanólica.....	113
Figura 26. Teor de voriconazol em soluções e em estado sólido, após exposição à radiação UV-A e UV-C, determinado por CLAE.....	114
Figura 27. Cromatogramas do voriconazol, mantido a 60 °C. (A): em estado sólido, por 50 dias (B): em solução metanólica, por 21 dias.....	115
Figura 28. Teores percentuais de voriconazol em soluções metanólicas, mantidas a 60 °C, analisadas por CLAE.....	116
Figura 29. Estudo de estabilidade da solução reconstituída de voriconazol injetável, mantida sob refrigeração (4-8 °C), analisada por CLAE.....	119

Figura 30. Estudo de estabilidade de soluções para infusão de voriconazol, diluídas em cloreto de sódio 0,9%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas por CLAE.....	120
Figura 31. Estudo de estabilidade de soluções para infusão de voriconazol, diluídas em glicose 5%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas pelo método de CLAE.....	121
Figura 32. Cromatogramas da solução para infusão de voriconazol em cloreto de sódio 0,9% e glicose 5%, no 21º dia após o preparo, mantidas a 4 °C.	122
Figura 33. Cromatogramas das soluções obtidas após contato das bolsas de PVC com metanol por 5 dias. (1A) Solução metanólica, obtida de bolsa que continha voriconazol em NaCl 0,9% (1B) Solução de lavagem aquosa da mesma bolsa. (2A) Solução metanólica, obtida de bolsa que continha voriconazol em glicose 5%. (2B) Solução de lavagem aquosa da mesma bolsa.....	123
Figura 34. Cromatograma da solução metanólica de comprimidos de voriconazol, degradada por hidrólise básica (15 minutos, temperatura ambiente), obtido através de CLAE semipreparativa.	126
Figura 35. Curva de pureza do pico com TR de 13,7 minutos, indicando índice de pureza de 0,955927.	127
Figura 36. Curva de pureza do pico com TR 16,0 minutos, indicando índice de pureza de 1,0000.	128
Figura 37. Cromatogramas da fração PD1 antes da dessecação (A) e após a dessecação (B) em evaporador rotatório.....	130
Figura 38. Cromatogramas da fração PD2 antes da dessecação (A) e após a dessecação (B) em evaporador rotatório..	130
Figura 39. Espectros na região do IV da SQR de voriconazol e PD1, em brometo de potássio. A) espectro SQR. B) espectro PD1. C) porção ampliada do espectro, na faixa de 2000 a 500 cm ⁻¹	132
Figura 40. Espectro de massas do PD1(MS/MS).....	133
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H do PD1 (400 MHz, em DMSO-D6).....	135
Figura 42. Espectro de RMN de ¹³ C do PD1, (400 MHz, em DMSO-D6).....	138
Figura 43. Estrutura química proposta para o PD1.....	139
Figura 44. Doseamento microbiológico do voriconazol degradado por luz UV-C.....	141

Figura 45. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 2,6 minutos (PD1), obtidos através de hidrólise básica, hidrólise ácida e sob refluxo.....	Anexo 2
Figura 46. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 2,6 minutos (PD1), obtidos através de hidrólise básica, calor e oxidação.....	Anexo 2
Figura 47. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 2,6 minutos (PD1), obtidos através de hidrólise básica, luz UV-C em solução e em estado sólido e luz UV-A em solução.....	Anexo 2
Figura 48. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 3,1 minutos (PD2), obtidos através de hidrólise básica e hidrólise em meio neutro.....	Anexo 2
Figura 49. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 3,1 minutos (PD2), obtidos através de hidrólise básica, calor e oxidação.....	Anexo 2
Figura 50. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 3,1 minutos (PD2), obtidos através de hidrólise básica, Luz UV-C (em solução) e luz UV-A (em solução).....	Anexo 2
Figura 51. Índice de similaridade dos picos de degradação relativos ao PD1 com TR de 2,6 minutos (CLAE analítica) e 13,7 minutos (CLAE semipreparativa).....	Anexo 2
Figura 52. Índice de similaridade dos picos de degradação relativos ao PD2 com TR de 3,1 minutos (CLAE analítica) e 16,0 minutos (CLAE semipreparativa).....	Anexo 2
Figura 53. Índice de similaridade da fração PD1 coletada por CLAE semipreparativa, antes e após dessecação em evaporador rotatório, comparada com pico de referência (PD1 hidrólise básica).....	Anexo 2
Figura 54. Índice de similaridade da fração coletada por CLAE semipreparativa, antes e após dessecação em evaporador rotatório, comparada com pico de referência (PD2 hidrólise básica).	Anexo 2
Figura 55. Espectro de RMN – HETCOR do voriconazol.....	Anexo 5
Figura 56. Espectro de RMN – HETCOR do produto de degradação (PD1).....	Anexo 5

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos espectros de RMN de ¹ H do voriconazol (400 MHz, em DMSO-D6).....	75
Tabela 2. Dados dos espectros de RMN de ¹³ C do voriconazol (400 MHz, em DMSO-D6).....	78
Tabela 3. Valores de absorvância (A) das curvas padrão de voriconazol, determinadas em 255 nm, realizadas em três dias diferentes.....	85
Tabela 4. Teste de recuperação da solução da SQR de voriconazol adicionada à solução de comprimidos de voriconazol, através do método de espectrofotometria no UV.....	86
Tabela 5. Teores percentuais da amostra de comprimidos de voriconazol, determinados por espectrofotometria no UV.....	87
Tabela 6. Condições e resultados do estudo de degradação forçada realizada com voriconazol como solução metanólica ou como pó de comprimidos triturados.....	91
Tabela 7. Áreas absolutas das curvas padrão de voriconazol, obtidas através de CLAE, realizadas em três dias.....	93
Tabela 8. Exatidão do método de CLAE, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções dos comprimidos de voriconazol.....	94
Tabela 9. Resultados experimentais da precisão intra-dia e entre dias do método de CLAE, aplicado a comprimidos de voriconazol.....	95
Tabela 10. Resultados do estudo de robustez do método de CLAE aplicado a comprimidos de voriconazol.....	96
Tabela 11. Estabilidade das soluções de trabalho (50 µg/ml), mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo ou expostas à iluminação natural.....	97
Tabela 12. Diâmetro dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico – difusão em ágar, cilindros em placas – de comprimidos de voriconazol.....	101
Tabela 13. Recuperação da SQR de voriconazol adicionada a amostras de comprimidos de voriconazol, pelo ensaio microbiológico.....	103
Tabela 14. Resultados experimentais obtidos para o doseamento de comprimidos de voriconazol, pelo ensaio microbiológico.....	104
Tabela 15. Teores percentuais obtidos no doseamento de comprimidos de voriconazol, através da CLAE, da espectrofotometria no UV e do ensaio microbiológico.....	106
Tabela 16. Teores percentuais de voriconazol em estado sólido, após exposição à lâmpada UV-C, obtidos através de CLAE.....	111

Tabela 17. Teores percentuais de voriconazol em estado sólido e em solução, após exposição à lâmpada UV-A, obtidos através de CLAE.....	112
Tabela 18. Teor percentual de voriconazol no pó de comprimidos triturados, mantido a 60 °C, determinado através de CLAE.....	114
Tabela 19. Índice de similaridade dos picos de degradação com tempos de retenção 2,6 minutos e 3,1 minutos, em comparação com picos obtidos pela hidrólise básica.....	117
Tabela 20. Teores percentuais das soluções para infusão de voriconazol em cloreto de sódio 0,9% (79 dias) e glicose 5% (37 dias), analisadas pelos métodos de CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico.....	122
Tabela 21. Dados dos espectros de RMN de ¹ H do PD1 (400 MHz, em DMSO-D6).....	134
Tabela 22. Dados dos espectros de RMN de ¹³ C do PD1 (400 MHz, em DMSO-D6).....	137
Tabela 23. Teores obtidos no doseamento de soluções da SQR do voriconazol submetidos à hidrólise básica (NaOH 0,1 M/15 minutos) e radiação UV-C (1 hora).....	140
Tabela 24. Análise estatística (ANOVA) das absorvâncias determinadas para obtenção da curva padrão do voriconazol por espectrofotometria no UV.....	Anexo 1
Tabela 25. Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas obtidas para as curvas padrão de voriconazol, por CLAE.....	Anexo 1
Tabela 26. Análise de variância dos dados experimentais do ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos, pelo método de difusão em ágar - cilindros em placas.....	Anexo 1
Tabela 27. Análise de variância dos resultados experimentais do doseamento do voriconazol em comprimidos, pelos métodos de CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar, cilindros em placa.....	Anexo 1
Tabela 28. Teores percentuais de voriconazol em bolsas para infusão com cloreto de sódio 0,9%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas por CLAE.....	Anexo 3
Tabela 29. Teores percentuais de voriconazol em bolsas para infusão com glicose 5%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas por CLAE.....	Anexo 3

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Custo médio diário de terapias antifúngicas	22
Quadro 2. Resumo dos métodos analíticos cromatográficos (CLAE) para determinação do voriconazol, em diferentes fluidos biológicos.....	29
Quadro 3. Informações sobre a estabilidade do voriconazol	31
Quadro 4. Esquema de preparo das soluções para o teste de exatidão, método espectrofotometria no UV.....	42
Quadro 5. Esquema de preparação das soluções para curva padrão de voriconazol, método de CLAE.....	48
Quadro 6. Condições testadas nos ensaios preliminares para ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos.....	52
Quadro 7. Preparação das soluções para a determinação da exatidão do ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos.....	57
Quadro 8. Frequências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho do voriconazol.....	72
Quadro 9. Condições experimentais para realização de estudos de estabilidade de fármacos e formulações que não necessitam de refrigeração.....	109
Quadro 10. Quadro comparativo das condições de degradação do voriconazol empregados neste estudo e da formação dos produtos de degradação com tempo de retenção 2,6 e 3,1 minutos.....	117
Quadro 11. Frequências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho do PD1.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
APT: *Attached Proton Test*
ATCC: American Type Culture Collection
CAS: Chemical Abstracts Service
CCD: cromatografia em camada delgada
CLAE: cromatografia a líquido de alta eficiência
DMSO-D6: dimetilsulfóxido deuterado
DPR: desvio padrão relativo
EMA: European Medicine Agency
FDA: Food and Drug Administration
HETCOR: Heteronuclear Correlation Spectroscopy
ICH: International Conference on Harmonization
IV: infravermelho
MS/MS: espectrometria de massas
PD1: produto de degradação 1
PD2: produto de degradação 2
PVC: cloreto de polivinila
Rf: fator de retenção
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SQR: Substância Química de Referência
TEMED: tetrametiletilenodiamina
THF: tetraidrofurano
TR: tempo de retenção
UTIs: Unidades de Terapia Intensiva
UV: ultravioleta
VCZ: voriconazol
VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

RESUMO

Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do voriconazol

Este trabalho apresenta estudo sobre o voriconazol, antifúngico de amplo espectro liberado para tratamento de infecções fúngicas invasivas no ano de 2002, focado no controle de qualidade e estudo de estabilidade. Foram realizados testes, ainda não citados na literatura, que visaram à caracterização do fármaco tais como: espectrofotometria na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono. Os seguintes métodos de análise quantitativa do fármaco em comprimidos foram desenvolvidos e validados: espectrofotometria na região do UV, cromatografia a líquido de alta eficiência e ensaio microbiológico - método de difusão em ágar. Todos os métodos foram avaliados frente aos parâmetros de linearidade, exatidão e precisão. A especificidade foi avaliada nos métodos de CLAE e UV, pela análise de placebo (CLAE e UV) e testes de degradação forçada (CLAE). A robustez foi avaliada no método de CLAE. Os resultados obtidos através destes métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA, que indicou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos; no entanto, os métodos por CLAE e ensaio microbiológico possibilitam a quantificação do voriconazol em amostras degradadas. Foram estudadas as estabilidades térmica, fotoquímica e química do voriconazol. Quimicamente, o fármaco é degradado intensamente em meio alcalino e em menor extensão em meios ácido, oxidante e neutro. Na temperatura testada (60 °C), o voriconazol é estável em estado sólido e instável em solução metanólica (teor de 25% em 21 dias). O fármaco é instável às radiações UV-C, em maior grau, e UV-A (degradação menos intensa), tanto em solução quanto em estado sólido. Em ambas, a degradação é favorecida se o fármaco estiver em solução. Também foi estudada a estabilidade da formulação injetável, como produto reconstituído e em soluções para infusão. Verificou-se que o prazo de validade da solução reconstituída de 24 horas, proposto pelo laboratório produtor, pode ser estendido para oito dias. As soluções para infusão do voriconazol em cloreto de sódio 0,9% ou glicose 5%, preparadas em bolsas de

PVC, devem ser administradas logo após sua preparação, se mantidas em temperatura ambiente. Mantidas sob refrigeração, são estáveis por 11 e nove dias, respectivamente. Isolou-se e identificou-se o produto de degradação majoritário observado durante os estudos de estabilidade, que corresponde a 1-(2,4-difluorfenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-1-etanona. Foi constatado que os produtos de degradação do voriconazol não apresentam atividade antifúngica; sendo assim, cuidados em relação à temperatura e luz devem ser tomados ao armazenar soluções do fármaco.

Palavras-chave: voriconazol, controle de qualidade, validação de métodos analíticos, estudo de estabilidade.

ABSTRACT

Chemical-Pharmaceutical Analysis and Stability Study of Voriconazole

This study is focused on quality control and stability evaluation of voriconazole, a broad spectrum antifungal agent, approved for treatment of invasive fungal infections in 2002. The drug was characterized by tests as IV spectrophotometry, nuclear magnetic resonance spectrometry of hydrogen and carbon, not referred until the moment. The following methods, applied to the assay of voriconazole in tablets were developed and validated: UV spectrophotometry, HPLC assay and microbiological assay, using the cylinder-plate method. All of them were evaluated in the following parameters: linearity, accuracy and precision. The specificity was evaluated in HPLC and UV assays, by analysis of excipients and/or degraded samples. The robustness was evaluated in the HPLC assay. The results obtained in the three methods were compared by ANOVA, which indicated that they are equivalent. However, only HPLC and microbiological assays could be used in the quantitation of voriconazole in degraded samples. The stability of voriconazole under temperature, radiation and different chemical mediums was evaluated. The drug is extensively degraded under alkaline medium, being degraded in less extension under acidic, neutral and oxidant mediums. Voriconazole is stable in the tested temperature (60 °C) in solid state, but is unstable in solution (loss of 75%, in 21 days). The drug is unstable to UV-C and UV-A radiations, both in solution or in solid state, being the degradation on UV-C more intense. The degradation is higher if the drug is in solution. The stability of the injectable formulation was studied, as reconstituted product and infusion solutions in PVC bags. Voriconazole reconstituted product was stable for eight days, stored at 4-7 °C. As infusion solution, in 0.9% sodium chloride or in 5% dextrose, stored at room temperature, the drug should be administered only just after preparation. Stored at 4-7 °C, the infusion solutions were stable for 11 and 9 days, respectively. The main degradation product observed in the stability studies was isolated and identified. It corresponds to 1-(2,4-difluorophenyl)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-1-ethanone. It was comproved that the voriconazole degradation

products don't have antifungal activity. So, special care should be taken in relation to temperature and radiation, when solutions of voriconazole are stored.

Key words: voriconazole, quality control, validation of analytical methods, stability studies.

O aumento na incidência de sérias infecções fúngicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos, indica a necessidade de terapias mais efetivas. Os agentes terapêuticos atuais apresentam limitações, como: espectro de ação restrito, disponibilidade de poucas formas farmacêuticas, janela terapêutica estreita e rápido desenvolvimento de resistência (WATKINS; RENAU, 2000).

A anfotericina B tem sido usada como terapia antifúngica para reduzir infecções fúngicas sistêmicas, em pacientes com neutropenia e febre persistente. O uso de formas lipídicas da mesma parece estar relacionado à diminuição da nefrotoxicidade e de reações adversas decorrentes da infusão, com eficácia similar. Porém, o alto custo tem limitado seu uso (WALSH *et al.*, 2002). O desenvolvimento de resistência ao fármaco, contudo, é raro (ELLIS, 2002).

Os antifúngicos triazólicos são agentes promissores para terapia antifúngica empírica. O fluconazol apresenta uso limitado pelo seu espectro de ação estreito. O itraconazol também vem sendo investigado, entretanto, sua administração oral é limitada pela biodisponibilidade variável das cápsulas e efeitos gastrintestinais adversos da solução oral. Em relação à formulação injetável do itraconazol, as experiências clínicas são restritas (MAERTENS, 2004). A nova geração de antifúngicos triazólicos, que inclui o voriconazol, apresenta amplo espectro de ação *in vitro*, potente atividade *in vivo*, perfil de segurança favorável e excelente biodisponibilidade (WALSH *et al.*, 2002).

A grande vantagem do voriconazol é sua atividade contra espécies de *Aspergillus*, cuja terapia efetiva era representada pela anfotericina B (FROMTLING, 1996). Vários estudos demonstraram sua eficácia e segurança no tratamento de infecções fúngicas graves (DENNING *et al.*, 2002; HERBRECHT *et al.*, 2002; WALSH *et al.*, 2002).

O voriconazol obteve a aprovação do FDA (Food and Drug Administration) para comercialização, em maio de 2002. No Brasil, obteve registro junto a ANVISA, em novembro de 2002. Foi sintetizado pelos laboratórios Pfizer e é comercializado na forma de comprimidos, pó para solução para infusão intravenosa e pó para suspensão oral (licenciado em 2004), sob o nome de VFEND®.

Por representar uma alternativa ao tratamento com anfotericina B, o uso do voriconazol vem crescendo. Sendo assim, considerando a inexistência de métodos oficiais para o controle de qualidade deste medicamento, há a necessidade de desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação do fármaco como matéria-prima e incorporado a formulações.

A ICH (International Conference on Harmonization) recomenda que os métodos analíticos aplicados a novas substâncias devam ser validados e adequados para detecção e quantificação de produtos de degradação (ICH, 2005). Estes, entre outros, são requisitos necessários para obtenção de registro de formas farmacêuticas nos países regidos pelas normas da ICH. No Brasil, exige-se relatório contendo informações sobre rotulagem, estudo de estabilidade, teste de toxicidade, ensaios clínicos que demonstrem a eficácia do medicamento, métodos de análise da matéria-prima e do produto acabado, entre outros (BRASIL, 2003a).

No início deste trabalho, os métodos analíticos para quantificação do voriconazol publicados referiam-se exclusivamente a estudos de farmacocinética (STOPHER; GAGE, 1997; GAGE; STOPHER, 1998; PEREA *et al.*, 2000; CREGO *et al.*, 2001b; ZHOU *et al.*, 2002). A única citação sobre a estabilidade do fármaco constava na bula da formulação injetável, que alertava sobre a instabilidade do mesmo em diluentes com pH levemente alcalino (VFEND[®]).

Admite-se que, para novos fármacos, informações sobre a estabilidade da molécula e métodos empregados nos estudos de estabilidade e no controle de qualidade são usualmente mantidos em sigilo pelos detentores da patente do fármaco (BAKSHI; SINGH, 2002). Desta forma, pressupõe-se que estes estudos já tenham sido realizados, mas não foram disponibilizados. Sendo assim, enquanto é aguardada a publicação destes estudos, a qualidade do produto é dependente da idoneidade do laboratório produtor e dos órgãos responsáveis pela liberação do registro do medicamento.

Sendo o voriconazol um fármaco recentemente sintetizado, o presente projeto virá a contribuir para o conhecimento de suas características físico-químicas, para o controle de qualidade da forma farmacêutica comprimidos, bem

como, para o conhecimento do comportamento do fármaco frente às condições adversas que serão adotadas nos testes de degradação forçada e subsequente identificação do(s) produto(s) de degradação majoritário(s).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

➤ Desenvolver e validar métodos analíticos para o controle de qualidade do voriconazol na forma farmacêutica comprimidos, bem como, estudar sua estabilidade química, térmica e frente a radiações.

2.2 Objetivos específicos

➤ Desenvolver métodos para análise qualitativa do voriconazol na forma farmacêutica comprimidos;

➤ Desenvolver e validar os seguintes métodos para análise quantitativa do voriconazol em comprimidos: ensaio microbiológico, espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE);

➤ Submeter o fármaco a condições de degradação forçada, como: hidrólise ácida, básica e em meio neutro, fotólise, oxidação, calor e umidade, a fim de verificar as condições que afetam sua estabilidade;

➤ Avaliar a interferência dos produtos de degradação sobre os métodos analíticos propostos;

➤ Realizar estudo de estabilidade da forma farmacêutica injetável, como produto reconstituído e solução para infusão;

➤ Isolar os produtos de degradação majoritários;

➤ Identificar os produtos de degradação majoritários, através de espectrofotometria na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton e de carbono e espectrometria de massas;

➤ Avaliar a atividade antifúngica do produto submetido à degradação.

3.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS

Nas duas últimas décadas tem sido observado um aumento na incidência de infecções hospitalares. Dados coletados em 49 hospitais dos EUA revelaram que, no período de 1995 a 1998, cerca de 8% das infecções sistêmicas foram causadas por fungos (STONE *et al.*, 2002). Segundo KLASTERSKY (2004), o número de sepses fúngicas aumentou em mais de 200% nas duas últimas décadas. Este aumento na incidência pode ser atribuído ao aumento no número de pacientes imunodeprimidos, como os pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), pacientes com câncer sob tratamento quimioterápico e pacientes submetidos a transplantes, sob tratamento com imunossupressores (STONE *et al.*, 2002).

A eficácia dos agentes antifúngicos geralmente é estabelecida a partir de estudos de infecções por *Candida* e *Aspergillus*, responsáveis pela maioria dos casos. Espécies de *Candida* são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas hospitalares (STONE *et al.*, 2002; SPELLBERG *et al.*, 2006). *Candida albicans* é a espécie predominante (cerca de 50% dos casos), seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, cada qual com cerca de 10 a 25% de incidência. Na Europa e na América do Norte, *C. glabrata* representa a segunda causa de candidíase; na Espanha e América Latina isolados clínicos de *C. parapsilosis* figuram como segunda causa da doença (SPELLBERG *et al.*, 2006). Um estudo recente que avaliou a incidência de candidemia em hospitais do Brasil constatou que 40,9% dos achados clínicos correspondem à *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,5%) (COLOMBO *et al.*, 2006).

Espécies de *Aspergillus* são menos comuns, causando cerca de 4 a 5% das infecções fúngicas hospitalares. No entanto, apesar da baixa incidência, a aspergilose invasiva em pacientes imunocomprometidos está associada a taxas elevadas de mortalidade, chegando a 85%, mesmo com emprego de terapia antifúngica (STONE *et al.*, 2002).

O diagnóstico das infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos constitui-se em um problema, uma vez que os sintomas não são específicos, muitas vezes as culturas sangüíneas são negativas e os

pacientes não podem ser submetidos a procedimentos diagnósticos invasivos (STEVENS, 2002). Esta situação induz ao uso da terapia empírica em pacientes com alto risco de vida (STEVENS, 2002) e a mesma tem sido recomendada para pacientes com neutropenia febril persistente, os quais permanecem febris mesmo após a administração de antibióticos de amplo espectro (KLASTERSKY, 2004).

Mais de 90% dos pacientes que desenvolvem aspergilose apresentam pelo menos um dos seguintes fatores: tratamento com antineoplásicos, terapia com corticosteróides, transplante de medula ou de órgãos sólidos, SIDA ou neutropenia prolongada. Quanto mais prolongado o período de neutropenia, maiores as chances de incidência de aspergilose invasiva (STEVENS, 2002).

Embora as espécies de *Candida* sejam patógenos oportunistas, não necessariamente os pacientes acometidos são imunodeprimidos. Os fatores de risco predominantes são: tratamento com antibióticos de amplo espectro, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral, queimaduras, nascimento prematuro, internação prolongada, internação em UTIs (Unidades de Terapia Intensiva). Em segundo lugar, são fatores de risco neutropenia, tratamento com corticosteróides, infecção pelo VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana) e *diabetes mellitus* (SPELLBERG *et al.*, 2006).

Abaixo são apresentados os fármacos usados no tratamento das infecções fúngicas invasivas.

- **Anfotericina B**

Ao longo das duas últimas décadas, a terapia antifúngica empírica com anfotericina B (Figura 1), pertencente à classe dos polienos, tem sido usada como terapia padrão para reduzir as infecções fúngicas invasivas em pacientes com neutropenia e febre persistente. Ao seu uso, porém, são associadas nefrotoxicidade e reações adversas decorrentes da infusão, como dispnéia, urticária, dores abdominais e no peito e hipoxemia (WALSH *et al.*, 2002).

Estudos comparativos entre a formulação convencional de anfotericina B e as formulações lipídicas revelaram que a eficácia clínica nos dois grupos é similar: 52 e 40%, respectivamente. A nefrotoxicidade parece ser menor com o uso das formulações lipídicas de anfotericina B em relação à formulação convencional (21% *versus* 29%); o efeito comprovado é a menor incidência de problemas relacionados à infusão, como febre e calafrios: 14% e 43%, para formulações lipídicas e formulação convencional, respectivamente (KLASTERSKY, 2004).

Este mesmo autor sugere que, devido ao custo elevado da anfotericina lipossomal (cerca de 80 vezes superior à formulação convencional), o tratamento seja iniciado pela anfotericina B convencional nos pacientes que não apresentam contra-indicação evidente para seu uso, e que haja a substituição pela anfotericina lipossomal apenas se houver problemas de toxicidade (KLASTERSKY, 2004). Porém, KLEINBERGH (2006) avalia que outros custos resultantes da terapia com a formulação convencional, como hemodiálise, tratamento dos danos renais e período maior de internação também sejam considerados no momento de escolher a terapia antifúngica.

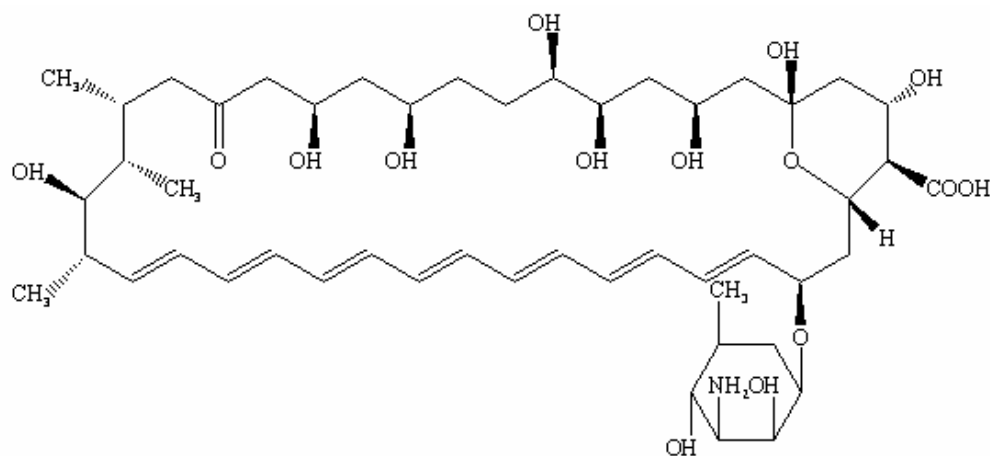


Figura 1. Estrutura química da anfotericina B.

- **Azóis**

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

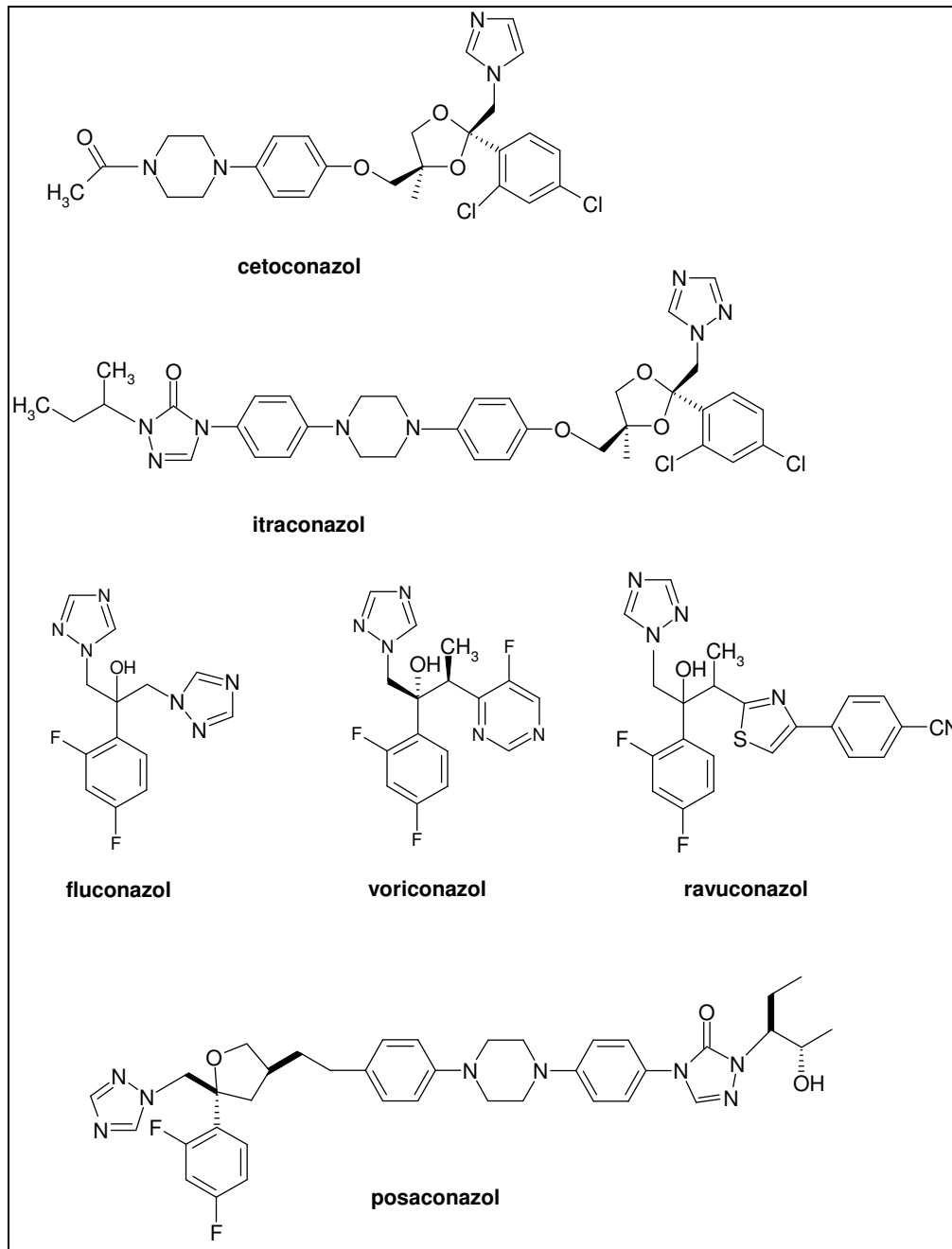


Figura 2. Estrutura química de fármacos antifúngicos da classe dos imidazóis e triazóis.

O cetoconazol foi aprovado pelo FDA em 1981, e por quase uma década, foi indicado como fármaco de escolha no tratamento da candidíase mucocutânea crônica e como alternativa à anfotericina B em pacientes não imunocomprometidos, para o tratamento da blastomicose, histoplasmose e paracoccidioidomicose. No entanto, é ineficaz na aspergilose e mucormicose. O tratamento com cetoconazol apresenta como desvantagens: absorção variável entre indivíduos e influenciada fortemente pelo pH gástrico; inexistência de forma farmacêutica injetável; pouca penetração na barreira hematoencefálica; ineficácia em pacientes imunocomprometidos; efeitos gastrintestinais severos. Estes fatores motivaram a pesquisa dos triazóis, sendo o fluconazol aprovado para uso no início dos anos 90 (MAERTENS, 2004).

O fluconazol apresenta baixa incidência de efeitos colaterais e também atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, com exceção de *C. krusei* e *C. glabrata*, mas é ineficaz contra espécies de *Aspergillus* (KLASTERSKY, 2004). *C. krusei* é naturalmente resistente ao fluconazol devido à presença de isoenzima alterada do citocromo P-450. A resistência de *C. glabrata* ocorre por efluxo do fármaco (SPELLBERG, 2006). O fármaco é recomendado para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica, vaginal, peritonial, geniturinária e candidíase disseminada, bem como meningite criptocócica (MAERTENS, 2004).

Em 1992, foi aprovado o uso do itraconazol o qual, comparado ao cetoconazol, é menos tóxico e apresenta espectro de ação mais amplo. Por sua baixa solubilidade, o itraconazol foi inicialmente formulado apenas como cápsula e foi amplamente usado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e superficiais, aspergilose e candidíase sistêmica. Devido à sua absorção variável, seu uso foi associado a falhas no tratamento. Foi desenvolvida então uma formulação líquida, para uso oral, em associação com o agente solubilizante hidroxipropil- β -ciclodextrina, cuja biodisponibilidade foi cerca de 60% maior do que com as cápsulas. Recentemente, foi desenvolvida formulação injetável, a qual agregou mais flexibilidade no uso do itraconazol (MAERTENS, 2004).

O voriconazol foi desenvolvido no final dos anos 80 e originou-se da idéia de obter um fármaco com espectro de ação mais amplo do que o fluconazol. O

mesmo apresenta elevada potência contra uma ampla variedade de fungos, incluindo os patogênicos encontrados clinicamente, como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium* e *Fusarium* spp. (DONNELLY; DE PAUW, 2004). Além disso, muitas publicações têm evidenciado sua ação em relação a patógenos novos e raros, em comparação com outros fármacos da classe (WATKINS; RENAU, 2000).

O posaconazol é um triazol estruturalmente relacionado ao itraconazol. Sintetizado pelo laboratório Schering-Plough, foi aprovado para uso pelo FDA, em 2006 e apresenta-se como suspensão oral (Noxafil®), estando em desenvolvimento formulação injetável (DOCTORFUNGUS, 2007). A atividade *in vitro* do posaconazol é semelhante a do voriconazol (WATKINS; RENAU, 2000; DONNELLY; DE PAUW, 2004), mas por ser pouco solúvel, exigirá formulação especial para uso intravenoso (WATKINS; RENAU, 2000).

O ravuconazol é um triazol estruturalmente relacionado ao fluconazol e ao voriconazol. Foi desenvolvido pelo laboratório Bristol-Myers Squibb, para uso oral. Apresenta espectro de ação mais amplo do que o fluconazol e o itraconazol (MAERTENS, 2004). Encontra-se na etapa de estudos clínicos, fase II (DOCTORFUNGUS, 2007).

- **Equinocandinas**

A caspofungina (Figura 3) foi o primeiro fármaco da classe das equinocandinas a ser aprovado para uso em seres humanos. É um derivado semi-sintético da pneumocandina B₀, que por sua vez, é um produto isolado da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis* (STONE *et al.*, 2002). A esta classe também pertencem a micafungina e anidulafungina.

A caspofungina apresenta atividade contra vários fungos e leveduras de importância clínica, entre eles, *Candida* e *Aspergillus*. Possui atividade limitada contra *Cryptococcus neoformans* (STONE *et al.*, 2002; DONNELLY; DE PAUW,

2004;). Foi aprovada pelo FDA para o tratamento da aspergilose invasiva em pacientes refratários ou intolerantes à terapia convencional (SABLE *et al.*, 2002).

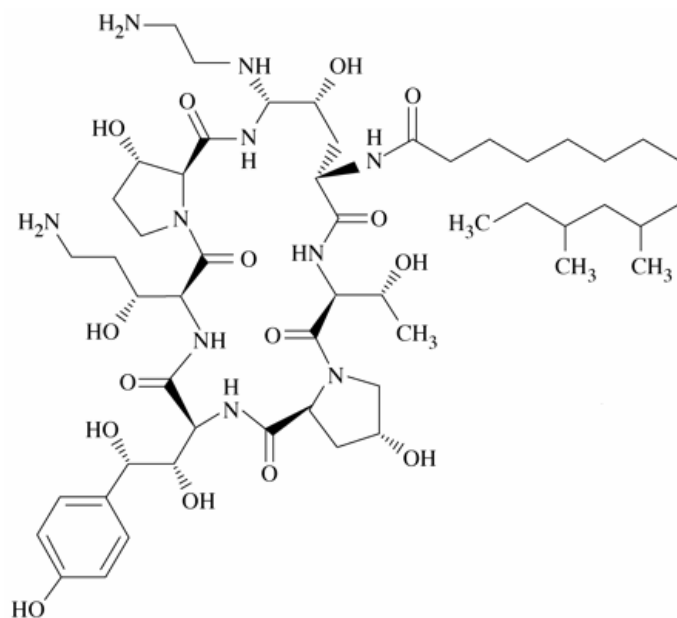


Figura 3. Estrutura química da caspofungina.

Os efeitos adversos mais freqüentes são febre (12-26%), flebite no local da infusão (12-18%) (SABLE *et al.*, 2002) e dor de cabeça (STONE *et al.*, 2002). Calafrios, *rash* e broncoconstrição também foram relatados. A maioria dos efeitos adversos é transitória, de intensidade suave a moderada e raramente provoca o abandono da terapia (SABLE *et al.*, 2002). A incidência total de efeitos adversos nos estudos já realizados é de 24,8% (STONE *et al.*, 2002).

A caspofungina atua inibindo a enzima β -1,3-glicano sintetase, uma enzima que forma os polímeros de glicano na parede celular do fungo (WATKINS; RENAU, 2000). A parede celular dos fungos consiste de uma camada externa de manoproteínas e uma camada interna composta por uma malha de β -1,3-glicano e quitina, entrelaçados com algumas moléculas de manoproteínas. O β -1,3-glicano é responsável pela integridade da parede celular; a malha formada pelo glicano e pela quitina confere rigidez à mesma (STONE *et al.*, 2002). A vantagem deste modo de ação é que a caspofungina atua sobre componentes da parede

celular de fungos, ausentes nas células de mamíferos (SABLE *et al.*, 2002; STONE *et al.*, 2002). Na Figura 4 são apresentados os alvos de ação dos agentes antifúngicos mais usados.

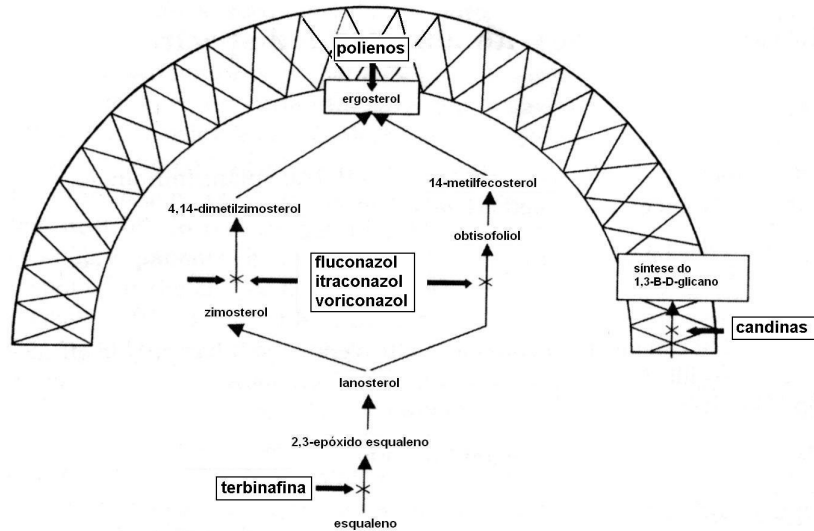


Figura 4. Biossíntese do ergosterol, apresentando os alvos das várias classes de antifúngicos (adaptado de DONNELLY; DE PAUW, 2004).

3.2 ESTUDOS FARMACOECONÔMICOS DO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

São fármacos ativos contra espécies de *Aspergillus* a anfotericina B convencional e suas formulações lipídicas, itraconazol, caspofungina e voriconazol. Destes agentes, apenas a anfotericina B convencional e o voriconazol são indicados como terapia de 1ª escolha pelo FDA (Food and Drug Administration) (LEWIS *et al.*, 2005).

No tratamento da candidíase, considerando fatores como eficácia, segurança e baixo custo, o fluconazol é o agente de escolha para pacientes não-neutropênicos, a menos que haja suspeita de infecção por espécies resistentes ao fármaco (*C. krusei* e *C. glabrata*). Para pacientes neutropênicos, fármacos com espectro de ação mais amplo (anfotericina B, equinocandinas e voriconazol) devem ser empregados. Recomenda-se também a remoção de cateteres sempre

que possível e a terapia antifúngica deve ser continuada até 14 dias após o desaparecimento dos sintomas da infecção (SPELLBERG *et al.*, 2006).

WILSON e colaboradores (2002) realizaram estudo no qual foram determinados os custos diretos das quatro infecções fúngicas sistêmicas preponderantes (candidíase, aspergilose, criptococose e histoplasmose). Além do custo da terapia antifúngica, foram computados custos com exames laboratoriais, internação, medicamentos usados para tratamento dos efeitos adversos e custo de pessoal. Como grupo controle considerou-se pacientes com as mesmas doenças de base, mas sem infecções fúngicas. Observou-se que a candidíase é a infecção fúngica mais freqüente, e a histoplasmose a mais rara. Apesar da menor incidência, a aspergilose apresenta os maiores custos de tratamento médio por paciente: US\$ 36.867,00, podendo chegar a US\$ 86.635,00 em pacientes transplantados. O custo médio de pacientes com candidíase é de US\$ 14.804,00. Deve-se ressaltar, no entanto, que os custos com a terapia antifúngica representam cerca de 17% do total dos custos do tratamento; 47% devem-se ao custo das taxas hospitalares.

Resultados semelhantes foram encontrados por JANSEN e colaboradores (2006), em estudo realizado na Alemanha, que avaliou os custos totais (internação, exames, terapia antifúngica e tratamento dos efeitos adversos) do tratamento da aspergilose invasiva com anfotericina B convencional e voriconazol. O custo médio da terapia foi de € 29.616 (voriconazol) e de € 30.686 (anfotericina B convencional). O período médio de internação dos pacientes tratados com voriconazol foi de 40 dias e da anfotericina 46 dias. Neste estudo permitiu-se a substituição da terapia inicial em decorrência de intolerância ou ineficácia.

LEWIS e colaboradores (2005) realizaram estudo comparativo dos custos da terapia com voriconazol e com anfotericina B convencional, no tratamento da aspergilose invasiva. Permitiu-se a substituição por outros medicamentos, em ambos os grupos, em decorrência da falta de resposta ou toxicidade. No total das 12 semanas do estudo, permaneceram na terapia inicial 43% dos pacientes tratados com voriconazol e 1,5% dos pacientes tratados com anfotericina B convencional. Como a substituição da terapia, neste último caso, geralmente é

feita para formulações lipídicas da anfotericina B, há uma elevação no custo da terapia. Os custos da terapia/paciente foram US\$ 5.447 para o voriconazol e US\$ 6.407 para a anfotericina B convencional.

Estes estudos sugerem que devem ser avaliados não apenas o custo inicial da terapia, mas também os custos decorrentes da necessidade de substituição da mesma, devido à toxicidade ou ineficácia. O Quadro 1 apresenta uma estimativa dos custos diários das terapias antifúngicas.

Quadro 1. Custo médio diário de terapias antifúngicas (KLASTERSKY, 2004).

Medicamento	Dose	Custo (€)
Anfotericina B convencional	1 mg/kg	8
Anfotericina B lipossomal	3 mg/kg	629
Anfotericina B complexo lipídico	5 mg/kg	405
Fluconazol	400 mg IV	60
Fluconazol	200 mg VO	11
Itraconazol	40 mg VO	40
Voriconazol	40 mg IV	407
Voriconazol	40 mg VO	84
Caspofungina	70 mg IV	644

3.3 VORICONAZOL

3.3.1 Descrição

Nome químico: (2*R*,3*S*)-2-(2,4-difluorfenil)-3-(5-flúor-4-pirimidinil)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-2-butanol.

CAS: [137234-62-9]

Fórmula molecular: C₁₆H₁₄F₃N₅O

Estrutura química: ver Figura 5.

Massa molecular: 349,3.

Características físico-químicas: $[\alpha]_D^{25}$: -62° (c 2, MeOH) (FROMTLING, 1996). O voriconazol é um pó cristalino, não higroscópico. Em relação à classificação biofarmacêutica, apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (Classe II). Não há evidências de polimorfismo ou de solvatos do fármaco (EMEA, 2005).

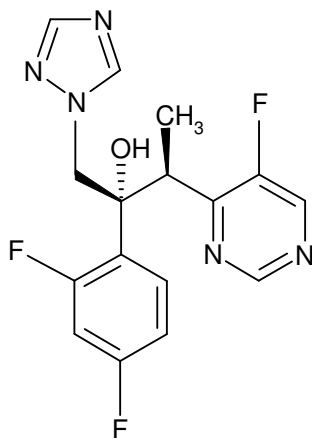


Figura 5. Estrutura química do voriconazol.

3.3.2 Atividade antimicótica

O tratamento de infecções fúngicas sistêmicas continua sendo um problema na clínica médica. Pacientes imunocomprometidos são especialmente susceptíveis a infecções fúngicas oportunistas. Espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus neoformans* estão entre os causadores mais comuns de infecções fatais nestes pacientes (FROMTLING, 1996).

A atividade mais significativa do voriconazol é representada pela potente atividade contra espécies de *Aspergillus*. O fluconazol é o fármaco de escolha para infecções severas causadas por espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, todavia, tem fraca atividade contra espécies de *Aspergillus* (FROMTLING, 1996). Além da atividade contra *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., o fármaco mostrou-se potente, *in vitro*, contra *Cryptococcus neoformans*,

Blastomyces dermatidis, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e espécies de *Fusarium*, entre outros (SPINEL-INGROFF *et al.*, 2001).

3.3.3 Mecanismo de ação

Os imidazóis e triazóis inibem a enzima esterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático dependente do citocromo P₄₅₀. Desta forma, prejudicam a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de α -metil-esteróis, que acabam por induzir mudanças na permeabilidade da membrana, desorganização celular e inibição do crescimento (WEINGBERG, 1995; BELANGER *et al.*, 1997). O voriconazol mostrou-se mais seletivo às enzimas do citocromo P₄₅₀ fúngicas do que aos sistemas enzimáticos semelhantes de mamíferos (VFEND[®]).

Outro mecanismo de ação vem sendo cogitado. As espécies de *Aspergillus* reproduzem-se através de esporos assexuados altamente pigmentados, chamados conídios. A formação destes esporos é essencial para a disseminação da espécie. A transmissão da aspergilose, inclusive, se dá por conídios carregados pelo ar (PELCZAR *et al.*, 1980; LEVINSON; JAWETZ, 1998). Observou-se que o voriconazol inibe a formação de conídios em colônias de *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus* e *A. niger*, produzindo colônias brancas. O ravuconazol, agente triazólico em fase de estudos clínicos e estruturalmente semelhante ao voriconazol, inibe a conidiação em colônias de *A. flavus* e *A. fumigatus*. Anfotericina B, caspofungina e nistatina não apresentaram este efeito e outros triazóis, como o itraconazol e o posaconazol, foram apenas fracos inibidores da conidiação (VARANASI *et al.*, 2004).

O ponto de partida da síntese do voriconazol foi o fluconazol (ambos são patenteados pela mesma indústria farmacêutica), como tentativa de ampliar o espectro do fluconazol, principalmente contra infecções causadas por *Aspergillus*. Verificou-se que a substituição de hidrogênio por metila na cadeia alquila aumentou a potência antifúngica. Estudos de relação estrutura-atividade revelaram que a substituição do segundo anel triazólico por um anel piridínico ou

pirimidínico aumentou a atividade contra *Aspergillus*, mas tornou o composto metabolicamente vulnerável. A introdução de um átomo de flúor na posição 5 do anel pirimidínico aumentou a atividade *in vitro* e *in vivo*, se comparado ao composto contendo o anel não substituído (FROMTLING, 1996).

3.3.4 Farmacocinética

A farmacocinética do voriconazol é não-linear, devido à saturação de seu metabolismo. A variabilidade interpacientes na farmacocinética do mesmo é alta. As propriedades farmacocinéticas do voriconazol pela via oral e pela via intravenosa são similares. A concentração plasmática máxima (C_{max}) é atingida 1 hora após administração intravenosa e 1,4 a 1,8 horas após administração oral. A biodisponibilidade oral é estimada em cerca de 90% (PURKINS *et al.*, 2002). A C_{max} e a área sob a curva são diminuídas pela administração concomitante com alimentos gordurosos. A administração simultânea com fármacos que alteram o pH gástrico não afeta a absorção do voriconazol (VFEND[®]). O fármaco é extensivamente distribuído nos tecidos; a ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 58% (VFEND[®]).

Estudos *in vitro* mostraram que o voriconazol é metabolizado pelas enzimas hepáticas do complexo do citocromo P450, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. Estudos *in vivo* indicam que a CYP2C19 está envolvida significativamente no metabolismo do voriconazol. Esta enzima exibe polimorfismo genético. Sabe-se, por exemplo, que 15-20% dos asiáticos são metabolizadores lentos do fármaco. Para negros e caucasianos, a percentagem de metabolizadores lentos é de 3-5% (PURKINS *et al.*, 2002). Esta menor metabolização leva a uma exposição 4 vezes maior ao fármaco nestes indivíduos (VFEND[®]). O principal metabólito do fármaco, um derivado n-óxido, é destituído de atividade antifúngica significativa, não contribuindo para a eficácia do voriconazol (DONNELLY; DE PAUW, 2004). O fármaco é eliminado via metabolismo hepático, com menos de 2% da dose excretada pela urina, na forma não modificada (VFEND[®]).

3.3.5 Efeitos adversos

Os efeitos adversos mais comumente relacionados ao uso do voriconazol são distúrbios visuais, que ocorre em cerca de 30% dos pacientes (visão turva, alteração da visão de cores, fotofobia), aumento nos níveis das enzimas hepáticas transaminase e fosfatase alcalina, *rash* cutâneo, febre, vômitos, náuseas, diarreia, dores de cabeça, sepse, edemas periféricos, dores abdominais e desordens respiratórias (DENNING; GRIFFITHS, 2001; DENNING *et al.*, 2002; PURKINS *et al.*, 2002; DONNELLY; DE PAUW, 2004).

3.3.6 Preparações farmacêuticas

Encontra-se disponível sob forma de injetável, comprimidos revestidos e pó para suspensão oral. O injetável apresenta-se como pó para solução para infusão. Os frascos contêm 200 mg de voriconazol e 3200 mg de sulfobutiléter de β -ciclodextrina sódica. Após reconstituição com água estéril para injeção, é obtida solução contendo 10 mg/ml de voriconazol e 160 mg/ml de sulfobutiléter de β -ciclodextrina sódica. Esta solução deve ser diluída antes da infusão intravenosa com diluentes adequados (VFEND[®]). Estudos têm demonstrado que a possibilidade de substituição da forma IV pela oral reduz a duração média de hospitalização em pacientes com alto risco (WALSH *et al.*, 2002).

Os comprimidos podem conter 50 ou 200 mg de voriconazol e os excipientes incluem lactose monoidratada, amido pré-gelatinizado, croscarmelose sódica, povidona e estearato de magnésio. O revestimento é constituído por hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, lactose monoidratada e triacetina (VFEND[®]).

O pó para suspensão oral está contido em frasco de 100 ml de polietileno. Cada frasco contém 45 g de pó para suspensão oral, que, após reconstituição com 46 ml de água, origina 75 ml de suspensão contendo 40 mg/ml de voriconazol. Os excipientes incluem dióxido de silício coloidal, dióxido de titânio,

goma xantana, citrato de sódio, benzoato de sódio, ácido cítrico anidro, aroma natural de laranja e sacarose (VFEND®).

3.3.7 Usos

O voriconazol é indicado no tratamento de infecções fúngicas graves, progressivas e passíveis de causar a morte (EMEA, 2005). Estudos representativos evidenciaram a importância do voriconazol no tratamento de infecções causadas por *Aspergillus* (HERBRECHT *et al.*, 2002; DENNING *et al.*, 2002). O voriconazol é indicado nos seguintes casos (EMEA, 2005):

- Tratamento de aspergilose invasiva;
- Tratamento da candidemia em pacientes não neutropênicos;
- Tratamento de infecções invasivas graves por espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol;
- Tratamento de infecções fúngicas graves causadas por *Scedosporium apiospermum* e *Fusarium* spp.

3.3.8 Determinação quantitativa

Vários métodos analíticos para o voriconazol foram desenvolvidos, visando à sua quantificação em fluidos biológicos, principalmente. Na sua maioria, consistem em métodos por CLAE, os quais são sumarizados no Quadro 2.

PEREA e colaboradores (2000) realizaram estudo comparativo entre métodos por CLAE (Quadro 2) e microbiológico para determinação do voriconazol em plasma. Para o método microbiológico empregaram cepa de *Candida kefyr*, ATCC 46764. A faixa de linearidade de ambos os métodos (0,2 a 10 µg/ml, para CLAE e 0,25 a 20 µg/ml, para microbiológico) inclui as concentrações consideradas clinicamente relevantes. No entanto, os autores concluíram que a

maior precisão e exatidão do método cromatográfico o tornam mais adequado para estudos de farmacocinética.

CREGO e colaboradores (2001a) desenvolveram dois métodos de eletroforese de zona capilar, os quais empregaram tampão fosfato (pH 2,3) ou ácido fórmico (pH 2,15) como eletrólitos. Os métodos possibilitaram a análise simultânea de sete antifúngicos, como matérias-primas. Em outra publicação, estes autores avaliaram a aplicação da eletroforese de zona capilar na separação de antifúngicos azólicos e seus metabólitos após incubação com microssomos hepáticos humanos (CREGO *et al.*, 2001b). O método mostrou-se útil para estudos de estabilidade *in vitro* dos fármacos avaliados, bem como para análise dos compostos em formas farmacêuticas.

FERRETTI e colaboradores (1998) desenvolveram método por CLAE para determinação quali e quantitativa das principais impurezas do voriconazol como matéria-prima. Foram empregadas coluna de fase reversa amino e coluna quiral de amilose, acopladas, e detector de arranjo de díodos, o que possibilitou a detecção e quantificação de impurezas provenientes da síntese em nível de 0,2%.

BABU e RAJU (2007) desenvolveram um método por espectrofotometria no UV para a determinação do voriconazol como matéria-prima e em comprimidos, sendo que o método foi linear na faixa de 5 a 80 µg/ml.

Quadro 2. Resumo dos métodos analíticos cromatográficos (CLAE) para determinação do voriconazol, em diferentes fluidos biológicos.

Aplicação	Extração	Coluna	Fase móvel	Deteção	Autores
plasma	Plasma injetado diretamente	CLAE multidimensional, 3 colunas: Sephadex G-25 (100 x 10 mm) / C18 (37,5 µm) / C18 (5 µm)	Coluna 1: tampão fosfato de amônio pH 6,5. Coluna 2: metanol. Coluna 3: ACN:TEMED, pH 7,0	UV, 255 nm	STOPHER; GAGE, 1997
plasma	ACN	C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm - Kromasil)	ACN:tampão fosfato de amônio pH 6,0 (1:1)	UV, 255 nm	GAGE; STOPHER, 1998; PEREA <i>et al.</i> , 2000.
humor aquoso	Não requerida	C-18 (300 x 3,9 mm, 15 µm - Delta PAK/Waters)	ACN: água: THF (70:29,99:0,01)	Detector de massas	ZHOU <i>et al.</i> , 2002
plasma	Fase sólida	C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm - Luna)	TEMED:ACN (55:45), pH 7,4	UV, 254 nm	PENNICK <i>et al.</i> , 2003
plasma	Plasma injetado diretamente	C-18	ACN: tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0 (17:83)	UV, 255 nm	PEHOURCQ <i>et al.</i> , 2004
soro	Precipitação com ACN e sulfato de zinco	C-18 (4,0 x 2,0 mm)	Gradiente: metanol 50 a 100%, com acetato de amônio 2 mM e ácido fórmico 0,1%	Detector de massas	KEEVIL <i>et al.</i> , 2004
plasma	Realizada em coluna de extração (LiChroCART 25 mm x 4 mm) empacotada com LiChrospher ADS C8	Nucleodur 100-5 C18ec (125 x 4,6 mm, 5 µm)	Ácido fórmico 0,1% em água: ACN (1:1)	Detector de massas	EGLE <i>et al.</i> , 2005
plasma	Extração líquido-líquido, seguida de centrifugação e evaporação	C-18e (100 x 4,6 mm - Chromolith® Performance)	Tampão fosfato de amônio monobásico (pH 5,8): ACN: THF (74:25:1)	UV, 255 nm	WENK <i>et al.</i> , 2006

UV: deteção com emprego de detector ultravioleta; ACN: acetonitrila; TEMED: tetrametiletilenodiamina; THF: tetraidrofurano

3.3.9 Estabilidade

Estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação em permanecer com suas características químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Quando este trabalho foi iniciado, as informações existentes sobre a estabilidade do fármaco eram unicamente as que constavam na bula da formulação injetável e alertavam sobre a instabilidade do fármaco em diluentes alcalinos.

No ano de 2004, no relatório do produto emitido pela Agência Europeia de Medicamentos, houve a citação de produto de degradação formado em amostras da suspensão oral (UK-51,060) o qual ao reagir com um produto de degradação da sacarose (excipiente da formulação), formava um terceiro produto (UK-519,140). Testes de genotoxicidade *in vitro* com a impureza formada apresentaram resultado negativo. Devido a este resultado e à baixa concentração desta impureza em amostras submetidas a testes de estabilidade acelerada e de longa duração (inferior a 10 ppm), seu potencial tóxico foi considerado irrelevante (EMEA, 2004). No ano seguinte, outro relatório reafirmou a instabilidade do fármaco em meio aquoso, principalmente em meio alcalino, bem como em meio oxidante. Havia a informação de que os produtos de degradação foram identificados (EMEA, 2005), mas os mesmos não foram especificados neste relatório.

No Quadro 3 são apresentadas, resumidamente, as recomendações do fabricante quanto a condições de estocagem e validade das formulações de voriconazol.

De acordo com o fabricante, o injetável deve ser reconstituído com água para injeção imediatamente antes do uso. Do ponto de vista microbiológico, é recomendado o descarte de soluções remanescentes, já que o produto é de dose única; no entanto, se o produto reconstituído não for usado imediatamente, sugere-se que seja mantido em geladeira e usado em até 24 horas, período para o qual a estabilidade química e física da solução foi estudada. Após reconstituição, o voriconazol pode ser diluído para administração intravenosa com os seguintes diluentes: dextrose 5%, cloreto de sódio 0,9 ou 0,45%, isolado ou associado à

dextrose 5%; Ringer lactato, isolado ou em associação à dextrose 5%. Entretanto, há a ressalva de que o voriconazol não deve ser diluído com solução de bicarbonato de sódio, uma vez que o caráter levemente alcalino deste diluente provoca alguma degradação do fármaco após 24 horas, em temperatura ambiente (VFEND®).

HOPPE-TICHY e colaboradores (2005) avaliaram a estabilidade do produto reconstituído e de soluções para infusão de voriconazol, diluídas em cloreto de sódio 0,9%. Concluiu-se que ambos são estáveis por até 32 dias, mantidos em temperatura de 2-8 °C. SAHRAOUI e colaboradores (2006) realizaram trabalho semelhante, porém avaliaram adicionalmente a estabilidade de soluções do fármaco diluídas com glicose 5%. Concluíram que as soluções em cloreto de sódio 0,9% são estáveis por 8 dias e as preparadas em glicose 5% por 6 dias, mantidas sob refrigeração. Ambos os estudos empregaram bolsas isentas de PVC (cloreto de polivinila), que é reconhecidamente incompatível com vários fármacos (MOORHATCH; CHIOU, 1974). CADROBBI e colaboradores (2006) atribuíram estabilidade de 15 dias para soluções de voriconazol em glicose 5%, em bolsas de PVC, na concentração de 4 mg/ml, mantidas sob refrigeração. Cabe ressaltar que o laboratório produtor não informa quanto à incompatibilidade do voriconazol com polímeros que compõem as bolsas para infusão.

Quadro 3. Informações sobre a estabilidade do voriconazol (VFEND®).

Forma farmacêutica	Condições de estocagem	Validade	Condições de estocagem após reconstituição	Validade após reconstituição
Pó para solução para infusão	15 - 30 °C	24 meses	2 - 8 °C	24 horas
Comprimido	15 - 30 °C	24 meses	-	-
Pó para suspensão oral	2 - 8 °C	18 meses	15 - 30 °C	14 dias

Em relação ao fluconazol, análogo do voriconazol, os estudos publicados referem-se à sua estabilidade em diversos diluentes de uso hospitalar (HUNT-FUGATE *et al.*, 1993), bem como, em combinação com fármacos que são administrados concomitantemente. INAGAKI e colaboradores (1993) estudaram a estabilidade de soluções do fluconazol em combinação com vários antibióticos e

com aciclovir, mantidas em temperatura de 25 °C. O fluconazol mostrou-se estável por um período de 72 horas, que foi o período máximo estudado; entretanto, não foi avaliada a estabilidade dos antibióticos combinados. Observou-se que houve redução do teor de fluconazol, em presença de solução ácida, alcalina e oxidante, em cerca de 5, 14 e 31 %, respectivamente.

A mistura de aminofilina e fluconazol, em solução de dextrose 5% ou em solução fisiológica, mostrou-se estável física e quimicamente por até 3 horas, a 24°C (JOHNSON *et al.*, 1993). O fluconazol mostrou-se estável por duas horas em combinação com soluções parenterais contendo aminoácidos (COUCH *et al.*, 1992). YAMREUDEEWONG e colaboradores (1993) estudaram a estabilidade de uma preparação líquida extemporânea para uso oral, obtida a partir de comprimidos de fluconazol triturados, misturados com água desionizada. A preparação manteve-se estável por 15 dias, estocada em temperaturas que variaram de 4 a 45° C.

A estabilidade de suspensão extemporânea para uso oral de itraconazol também foi avaliada. A suspensão foi obtida através da mistura de comprimidos macerados e xarope simples. Observou-se que, mantida a 4° C, a preparação mantém-se estável por até 35 dias (JACOBSON *et al.*, 1995).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA E FORMULAÇÕES

A substância química de referência e os produtos farmacêuticos empregados no estudo estão descritos a seguir.

4.1.1 Substância química de referência (SQR)

Empregou-se matéria-prima de voriconazol, com pureza de 99,75% (lote 20040104; fabricação: janeiro/2004; validade: janeiro/2007, fabricada por Gencor Pacific Limited – Hong Kong), gentilmente doada pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brasil).

4.1.2 Formas farmacêuticas

✓ *Comprimidos revestidos de 50 mg* (VFEND[®], Heinrich Mack Nachf. GmbH & Co., Alemanha): lote 310268733, fabricados em 05/2003 e válidos até 05/2005. Empregados na validação dos métodos e estudos preliminares de estabilidade.

✓ *Pó para solução para infusão intravenosa*, frasco-ampola de 200 mg (VFEND[®], DSM Pharmaceuticals, EUA): lote 5163904, fabricado em 03/2005 e válido até 03/2007. Empregado no estudo de estabilidade de soluções para infusão.

Todas as amostras empregadas foram adquiridas junto ao Hospital São Vicente de Paulo (Passo Fundo/RS), uma vez que este medicamento é de uso restrito a hospitais.

4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA SQR

4.2.1 Ponto de fusão

Empregou-se equipamento Mettler Toledo, modelo FP90, que dispõe de capilares introduzidos em célula de aquecimento. Realizaram-se 3 determinações, com a SQR dessecada, empregando rampa de aquecimento de 2 °C/minuto.

4.2.2 Poder rotatório específico

Preparou-se solução 0,2% (p/V) da SQR, em metanol. A solução foi examinada em polarímetro Perkin Elmer 341. Foram feitas três medidas e calculou-se a média dos valores obtidos.

Para o cálculo do poder rotatório específico utilizou-se a equação 1:

$$[\alpha]_{20}^D = \alpha / c.l$$

Equação 1

onde:

α = ângulo de rotação

c = concentração da amostra em g/ml

l = comprimento do tubo (dm)

4.2.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Realizaram-se varreduras do espectro de UV de soluções da SQR na concentração de 20 µg/ml. Partiu-se de soluções estoque metanólicas contendo 500 µg/ml, sendo a diluição subsequente realizada no solvente avaliado: hidróxido de sódio 0,1 M, ácido clorídrico 0,1 M, água e metanol. A análise foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV-1601 PC.

4.2.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

A determinação foi realizada através da dispersão de 1,5 mg da SQR em 150 mg de brometo de potássio, seguida de compressão, para obtenção de pastilha. Empregou-se espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR – 8101.

4.2.5 Espectrometria de massas

Solução aquosa 1 µg/ml da SQR foi analisada em espectrômetro de massas Micromass Quattro LC, que operou no modo *eleto spray* positivo. As condições do detector foram otimizadas de modo a maximizar a intensidade de íons com m/z 350 (massa do voriconazol: 349). Empregaram-se as seguintes condições: fluxo de nitrogênio de 37 e 404 l/h (cone e dessolvatação, respectivamente), voltagens do capilar e do cone de 3,2 KV e 36 V, respectivamente, e temperaturas da fonte e de dessolvatação de 120 e 250 °C, respectivamente. A análise foi realizada junto ao CBIM (Centro Bioanalítico de Medicamentos) da UFRGS.

4.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da SQR e do produto de degradação foram obtidos em espectrômetro de massas Varian, modelo Mercury AS 400 (400 MHz), empregando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-D6) como solvente. A análise foi realizada pelo laboratório CEPED (Centro Petroquímico de Pesquisa e Desenvolvimento) da ULBRA.

4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS

Este trabalho objetivou, desde o princípio, o desenvolvimento de métodos quali e quantitativos para análise do voriconazol em comprimidos. Sendo assim, apesar de, adicionalmente, ter sido avaliada a estabilidade do injetável, os métodos quali e quantitativos que serão descritos foram aplicados unicamente aos

comprimidos. Os resultados obtidos ao longo do trabalho motivaram a investigação da estabilidade da formulação injetável, pelo emprego dos métodos desenvolvidos para análise dos comprimidos.

4.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Realizaram-se varreduras do espectro de UV de soluções da SQR e de comprimidos de voriconazol na concentração de 20 µg/ml. Preparou-se solução estoque 500 µg/ml, em metanol. Filtrou-se e do filtrado, transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 25 ml. Como solvente, empregaram-se alternativamente: hidróxido de sódio 0,1 M, ácido clorídrico 0,1 M, água e metanol. A análise foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS UV-1601 PC (Shimadzu).

4.3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram preparadas soluções metanólicas de 1 mg/ml da SQR, dos comprimidos e dos comprimidos submetidos à degradação em meio alcalino (2 ml de solução de comprimidos com concentração de 1 mg/ml, em contato com hidróxido de sódio 0,1 M por 30 minutos). A fim de verificar se o sistema proposto seria capaz de diferenciar moléculas semelhantes, empregou-se também solução metanólica de fluconazol 5 mg/ml. Várias proporções de solventes foram testadas até que fossem estabelecidas as condições descritas a seguir.

Como fase estacionária, utilizaram-se cromatoplasmas de gel de sílica Merck 60 F₂₅₄, com espessura da camada de sílica de 0,2 mm (cat nº 1.05554). Empregou-se fase móvel composta por acetato de etila:ácido acético R (9,5:0,5, V/V). As soluções foram aplicadas com capilares de 2,0 µl (Merck, art. 1102900001) tendo sido efetuadas 4 aplicações para amostras de voriconazol e 5 aplicações para a solução de fluconazol, totalizando 8 µg/placa e 50 µg/placa, respectivamente. As placas foram colocadas em cuba saturada e as manchas foram detectadas com luz ultravioleta.

4.3.3 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

A identificação do voriconazol em comprimidos foi realizada através da comparação de seu tempo de retenção com o tempo de retenção do voriconazol SQR, conforme método descrito nos itens 4.4.2.3 e 4.4.2.4.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS

4.4.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

4.4.1.1 Equipamento

A análise foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS UV-1601 PC (Shimadzu), sendo que a leitura das amostras foi realizada em 255 nm.

4.4.1.2 Validação

Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de linearidade, especificidade, exatidão e precisão (ICH, 2005).

4.4.1.2.1 Especificidade

Para a determinação da especificidade, foi preparado placebo contendo os excipientes descritos na bula dos comprimidos de voriconazol, em quantidades relativas às concentrações usualmente empregadas na preparação de formas farmacêuticas sólidas (KIBBE, 2000). A massa total dos excipientes do placebo foi similar à massa de excipientes nos comprimidos. Após diluição com metanol, a suspensão foi filtrada e diluída na mesma proporção descrita para o doseamento. Em seguida, realizou-se varredura na faixa de absorção do ultravioleta.

Os excipientes empregados foram: lactose monoidratada, amido, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, povidona, triacetina e dióxido de titânio.

4.4.1.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir de curvas padrão da SQR, conforme descrito a seguir: preparou-se solução estoque de 500 µg/ml em metanol. Transferiram-se 10,0 ml desta solução para balão volumétrico de 50 ml e o volume foi completado com água. A partir desta solução, alíquotas de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 ml foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, com auxílio de bureta. Completaram-se os volumes com água, obtendo-se soluções de 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0; 22,0 e 24,0 µg/ml.

A curva padrão foi realizada em três dias, sendo que cada ponto da curva foi lido em duplicata. Com as médias das absorvâncias obtidas nos diferentes dias, plotou-se gráfico de *absorvância x concentração de voriconazol (µg/ml)*. A equação da reta foi obtida através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e sua validade estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA).

4.4.1.2.3 Exatidão

Para avaliação da exatidão do método, realizou-se o teste de recuperação. Quantidades crescentes de solução da SQR (em 3 níveis) foram adicionadas a soluções da amostra, cuja concentração foi constante, e o percentual de recuperação da SQR foi calculado ao final do processo. A preparação das soluções é descrita a seguir.

A) Preparação da solução SQR

A partir de solução estoque metanólica 500 µg/ml, foram preparadas duas soluções aquosas, contendo 75 µg/ml (adicionada às soluções R1, R2 e R3) e 20 µg/ml, usada para o cálculo da concentração das soluções amostra, R1, R2 e R3.

B) Preparação da solução amostra

Pesou-se, exatamente, a partir do pó de 20 comprimidos triturados, o equivalente a 6 mg de voriconazol, em balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se cerca de 40 ml de metanol. Agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol. Filtrou-se em papel e, do filtrado, foram transferidos 5,0 ml para balão volumétrico de 50 ml. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com 12 µg/ml.

C) Preparação das soluções R1, R2 e R3

Transferiram-se 5,0 ml do filtrado obtido no item B para cada um de três balões volumétricos de 50 ml. A cada um dos balões foram adicionados os seguintes volumes de solução da SQR (75 µg/ml): 1,0; 4,0 e 7,0 ml, a partir de bureta. Completou-se o volume com água. Estas soluções foram denominadas R1, R2 e R3, respectivamente. As concentrações obtidas foram de 13,5; 18 e 22,5 µg/ml, correspondendo a 75, 100 e 125% da concentração usual de análise, que é de 18 µg/ml. Cada nível de concentração foi feito em triplicata. No Quadro 4 é apresentado o esquema de preparo das soluções.

Quadro 4. Esquema de preparo das soluções para o teste de exatidão, método espectrofotometria no UV.

	Sol. amostra 120 µg/ml (ml)	Sol. SQR 75 µg/ml (ml)	Sol. SQR 500 µg/ml (ml)	balão volum. (ml)	Conc. final (µg/ml)
SQR	-	-	1,0	25	20,0
A	5,0	-	-	50	12,0
R1	5,0	1,0	-	50	13,5
R2	5,0	4,0	-	50	18,0
R3	5,0	7,0	-	50	22,5

(SQR) solução da substância química de referência; (A) solução amostra; (R1, R2 e R3) soluções da amostra acrescidas de SQR, em seus três níveis de concentração.

D) Cálculo do percentual de recuperação

O percentual de recuperação (R%) foi calculado a partir da equação 2, descrita pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000):

$$R\% = [(C_{AF} - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Equação 2

onde:

C_{AF} = concentração do fármaco na amostra acrescida de SQR (µg/ml)

C_A = concentração do fármaco na amostra (µg/ml)

C_{SQR} = concentração de SQR adicionada à amostra (µg/ml)

4.4.1.2.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois diferentes níveis: repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre dias). Para a repetibilidade, avaliou-se o DPR obtido da análise de 6 amostras independentes contendo 100% da concentração usual de análise, em um dia. Para a precisão intermediária, calculou-se o DPR de um total de 18 análises (n=6/dia, 3 dias diferentes).

A) Preparação da solução SQR

Pesou-se, exatamente, cerca de 18 mg da SQR. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml, diluindo com metanol. Desta solução foram transferidos 5,0 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água destilada, a fim de obter solução com 18 µg/ml.

B) Preparação da solução amostra

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 4,5 mg de voriconazol, a partir do pó de comprimidos triturados, em balão volumétrico de 25 ml. Foram adicionados 15 ml de metanol e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Completou-se o volume e filtrou-se em filtro de papel. Transferiram-se 5,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com água. Obteve-se solução com 18 µg/ml.

C) Cálculo do teor percentual de voriconazol nos comprimidos

A determinação do teor de voriconazol nos comprimidos foi calculada de acordo com a equação 3.

$$\% \text{ voriconazol} = \frac{A_a \cdot C_{SQR} \cdot 100}{A_{SQR} \cdot C_a}$$

Equação 3

onde:

A_a = absorvância da solução da amostra

C_{SQR} = concentração da solução da SQR (µg/ml)

A_{SQR} = absorvância da solução da SQR

C_a = concentração teórica da solução da amostra

4.4.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência

4.4.2.1 Equipamento

Empregou-se cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), provido de bomba LC-10AD VP, injetor manual Rheodyne, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10A VP, degaseificador DGU-14A e central de controle SCL-10A, com software CLASS-VP para estimar a área dos picos e realizar cálculos de pureza e similaridade.

4.4.2.2 Reagentes

Foram empregados solventes de grau CLAE e água obtida por sistema Millipore®.

4.4.2.3 Fase móvel

A fase móvel constituiu-se em mistura de metanol:solução de trietilamina 0,6%, pH 6,0 (50:50, V/V). O pH da fase aquosa foi ajustado com ácido fosfórico 18% (V/V), previamente à mistura com a fase orgânica. Antes do uso, a fase móvel foi degaseificada através do emprego simultâneo de vácuo e ultra-som, seguida de degaseificação no próprio cromatógrafo. O pH da fase móvel (6,0) foi estabelecido com base em relatos de artigos. No teste de robustez, variações em torno deste valor foram avaliadas. As demais condições (coluna, fluxo, proporção dos solventes) foram estabelecidas neste estudo.

4.4.2.4 Condições cromatográficas

➤ Coluna: LiChrospher® 100 C-8 (125 x 4,6 mm, 5 µm), lote 471016 (Merck)

- Fluxo: 1ml/minuto
- Comprimento de onda: 255 nm
- Volume de injeção: 20 µl

4.4.2.5 Validação

Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de linearidade, especificidade, exatidão, precisão e robustez (ICH, 2005).

4.4.2.5.1 Especificidade

A especificidade do método foi estabelecida através de estudos de degradação forçada. Soluções dos comprimidos ou o pó de comprimidos triturados foram submetidos à degradação nas seguintes condições: meios ácido, básico, neutro e oxidante, calor, umidade e luz UV 352 nm. Avaliou-se também a interferência dos excipientes sobre o método de análise, através da preparação de uma solução placebo, contendo os excipientes descritos na bula dos comprimidos.

A determinação da especificidade foi verificada pela resolução do pico do voriconazol em relação aos picos dos produtos de degradação e pela determinação da pureza do pico relativo ao voriconazol, empregando-se detector de arranjo de diodos. A seguir, serão descritos os procedimentos empregados para promover a degradação do fármaco.

A) Degradação em meios ácido, básico e neutro

Dez mililitros de soluções metanólicas contendo 500 µg/ml de voriconazol foram transferidos para frasco de vidro e acrescidos de 5 ml de HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M ou água (hidrólises ácida, básica e neutra, respectivamente).

Foram empregadas as seguintes condições em cada uma das reações:

- Hidrólise ácida: 80 °C / 2 horas;
- Hidrólise básica: temperatura ambiente / 30 minutos;
- Hidrólise em meio neutro: refluxo / 4 horas.

Após o tempo de reação, as soluções foram resfriadas e o pH das soluções foi ajustado à neutralidade, se necessário. Em seguida, as soluções foram diluídas com água ultrapura até concentração de 100 µg/ml e filtradas em filtro de papel.

B) Degradação em meio oxidante

Cinco mililitros de solução metanólica com 1mg/ml de voriconazol foram acrescidos de 5 ml de solução de permanganato de potássio 5%. Esta solução foi mantida em agitação, por 3 horas, em temperatura ambiente. Após o tempo de reação, a solução foi diluída com água até concentração de 100 µg/ml e filtrada em filtro de papel. Paralelamente, submeteu-se apenas metanol ao mesmo procedimento, como controle da reação.

C) Degradação por ação do calor e umidade

O pó de comprimidos triturados foi disposto em fina camada, sobre vidro de relógio, e mantido nas seguintes condições:

- Temperatura ambiente/ 75% de umidade relativa (UR) / 48 horas;
- Estufa a 70 °C / 48 horas;
- Estufa a 70 °C / 80% UR / 48 horas.

Para obter a atmosfera com o percentual de umidade desejado, a amostra foi mantida dentro de dessecador, o qual continha solução saturada de cloreto de sódio.

Após o tempo especificado, foram preparadas soluções contendo 500 µg/ml de voriconazol em metanol, seguida de filtração em filtro de papel e diluição até 100 µg/ml com água.

D) Degradação por ação da luz UV 352 nm

Dois mililitros de solução 1mg/ml de voriconazol foram dispostos em cubeta transparente, a qual foi exposta à lâmpada *Blacklight blue lamp*, marca *Orion*, 30 W, 130 V (352 nm, UV-A) por 22 horas, em câmara com superfícies internas espelhadas (17 x 17 x 100 cm). Amostras submetidas às mesmas condições, porém protegidas da luz, foram empregadas para determinar o efeito do aquecimento decorrente da radiação; as mesmas foram denominadas *controle escuro*. Após o tratamento, o conteúdo da cubeta foi transferido para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água.

4.4.2.5.2 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir de curvas padrão da SQR, preparadas conforme procedimento descrito a seguir: pesaram-se, exatamente, cerca de 25 mg da SQR, em balão volumétrico de 50 ml. Dissolveu-se com metanol, obtendo solução de 500 µg/ml. A partir desta solução, foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 µg/ml, diluídas em água ultrapura. No Quadro 5 é apresentado o esquema de preparação das soluções.

A curva padrão foi realizada em três dias, sendo que cada ponto da curva foi injetado em triplicata. A partir das médias das áreas obtidas nos diferentes dias, construiu-se um gráfico plotando-se a *área média x concentração de voriconazol (µg/ml)*. A equação da reta foi obtida através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e sua validade estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA).

Quadro 5. Esquema de preparação das soluções para curva padrão de voriconazol, método por CLAE.

Ponto da curva	Volume SQR 500 µg/ml (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração final (µg/ml)
1	1,0	25	20,0
2	3,0	50	30,0
3	2,0	25	40,0
4	1,0	10	50,0
5	3,0	25	60,0
6	4,0	25	80,0
7	2,0	10	100,0

4.4.2.5.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, pela adição de solução da SQR a soluções da amostra, totalizando concentrações de 70, 100 e 130 % da concentração usual de análise (50 µg/ml). O procedimento foi realizado em triplicata.

A) Preparação da solução SQR

Preparou-se solução da SQR em metanol, na concentração de 500 µg/ml, com posterior diluição em água à concentração de 50 µg/ml.

B) Preparação da solução amostra

Determinou-se o peso médio a partir de 20 unidades. Pesou-se o equivalente a 12,5 mg de voriconazol, a partir do pó de comprimidos triturados. Transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionaram-se 15 ml de metanol e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol (solução 500 µg/ml). Filtrou-se em filtro de papel e do filtrado, foram transferidos 2,0 ml para balão volumétrico de 50 ml e diluiu-se com água (solução 20 µg/ml).

C) Preparação das soluções R1, R2 e R3

A partir do filtrado obtido no item B, foram transferidos dois mililitros para cada um de três balões volumétricos de 50 ml. Aos balões foram adicionados, respectivamente, os seguintes volumes da solução da SQR 500 µg/ml: 1,5; 3,0 e 4,5 ml, com auxílio de bureta. Completou-se o volume com água. Estas soluções foram denominadas soluções R1, R2 e R3. As concentrações obtidas foram de 35; 50 e 65 µg/ml, correspondendo a 70, 100 e 130% da concentração usual de análise (50 µg/ml).

D) Cálculo do percentual de recuperação

O percentual de recuperação foi calculado a partir da equação 2, descrita pela AOAC (2000) (item 4.4.1.2.3.D).

4.4.2.5.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pela determinação do desvio padrão relativo (DPR). Foram realizadas 6 análises independentes por dia, sendo que o procedimento foi repetido em 3 dias. A repetibilidade foi avaliada através do DPR dos resultados intra-dia (n=6) e a precisão intermediária através do DPR dos resultados dos 3 dias (n=18, DPR entre dias).

A) Preparação da solução SQR

Preparou-se solução estoque de 500 µg/ml em metanol. Alíquota de 1,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com 50 µg/ml.

B) Preparação da solução amostra

Preparou-se solução contendo 500 µg/ml, conforme descrito no item 4.4.2.5.3.B. A partir do filtrado, foram transferidos 5,0 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com água (solução 50 µg/ml). Este procedimento foi realizado em três dias, com 6 amostras independentes por dia.

C) Cálculo do teor percentual de voriconazol na amostra

A determinação do teor de voriconazol nos comprimidos foi calculada de acordo com a equação 4.

$$\% \text{ voriconazol} = \frac{A_a \cdot C_{\text{SQR}} \cdot 100}{A_{\text{SQR}} \cdot C_a}$$

Equação 4

onde:

A_a = área média da solução amostra (média de 3 injeções)

C_{SQR} = concentração da solução SQR (µg/ml)

A_{SQR} = área média da solução SQR (média de 3 injeções)

C_a = concentração teórica da solução amostra

4.4.2.5.5 Robustez

Para a determinação da robustez do método foram avaliadas modificações na fase móvel e a estabilidade das soluções.

A) Modificações na fase móvel

Foram modificados dois parâmetros da fase móvel: pH e percentual de fase orgânica. O pH da fase móvel foi alterado em uma (1) unidade de pH acima e abaixo do pH original (pH 6,0). O percentual de fase orgânica foi alterado para 47 e 53%, sendo o original 50%.

Para estabelecer o efeito destas variações sobre o método, duas amostras foram quantificadas em cada condição analítica, bem como, foram avaliadas as modificações ocorridas nos parâmetros cromatográficos.

B) Estabilidade da solução de trabalho de voriconazol

Prepararam-se soluções da SQR na concentração usual de análise (50 µg/ml) e as mesmas foram analisadas nos tempos zero, 24, 48 e 72 horas após o preparo. As mesmas foram mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo ou expostas à luz. As soluções foram consideradas estáveis caso não houvesse mudanças significativas entre as áreas absolutas da mesma solução avaliada em dias diferentes (DPR inferior a 2%).

C) Estabilidade da solução estoque da SQR

Preparou-se solução estoque da SQR (500 µg/ml), a qual foi mantida em geladeira e analisada periodicamente em um período de 58 dias. A estabilidade foi monitorada frente a uma solução da SQR recentemente preparada.

4.4.3 Ensaio microbiológico

Para realizar a quantificação do voriconazol por este método, ensaios preliminares foram realizados, até que fossem estabelecidas condições que possibilitassem o doseamento do fármaco em comprimidos.

4.4.3.1 Ensaios preliminares

Os parâmetros analíticos testados são apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Condições testadas nos ensaios preliminares para ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos.

Parâmetro	Condições
Microrganismo teste	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601
Concentração das soluções	1; 2 e 4 µg/ml 2; 5 e 12,5 µg/ml 2,5; 5 e 10 µg/ml 3; 6 e 12 µg/ml
Disposição do meio de cultura nas placas	Monocamada e bicamada
Volume das soluções adicionado nos cilindros	100 e 200 µl
Solução diluente	Soluções tampão pH 5,0; 6,0 e 7,0
Concentração do inóculo	0,5; 0,75; 1,0 e 1,5%
Tempo de incubação	18 e 24 h

4.4.3.2 Execução do ensaio

A partir dos resultados dos ensaios preliminares, foram estabelecidas as condições para o ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos, apresentadas abaixo.

- ✓ Microrganismo teste: *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601
- ✓ Meio de cultura: Sabouraud dextrose 2%
- ✓ Concentração do inóculo: 1,0%
- ✓ Disposição do meio de cultura nas placas: bicamada (base: 20 ml; superfície: 5 ml)

- ✓ Delineamento: 3 x 3
- ✓ Método: difusão em ágar, cilindros em placas
- ✓ Concentração das soluções padrão e amostra: 3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml
- ✓ Volume das soluções adicionado às placas: 100 µl
- ✓ Diluente inicial: metanol p.a.
- ✓ Solução diluente: solução tampão pH 6,0 ± 0,1
- ✓ Tempo de incubação: 22 - 24 h
- ✓ Temperatura de incubação: 30 °C ± 1 °C

4.4.3.2.1 Material

Os reagentes utilizados na preparação da solução fisiológica e do tampão foram de grau analítico. Ágar Sabouraud dextrose 2% (Merck) foi empregado para manutenção, repique e preparo das camadas base e superfície. Como microrganismo teste empregou-se cepa de *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601. Foram empregadas placas de petri de vidro com dimensões de 20 mm x 100 mm e cilindros de aço inoxidável com dimensões de 6,0 mm x 8,0 mm x 10 mm (diâmetro interno x diâmetro externo x altura).

As soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical Phoenix (121 °C/15 minutos) e placas, vidrarias não volumétricas e cilindros foram esterilizados em estufa Biomatic (180 °C/2 h).

Para padronização da suspensão microbiana empregou-se espectrofotômetro Analyser, modelo 5042. As placas foram incubadas em estufa microbiológica (Biopar). A medida dos halos de inibição foi efetuada com auxílio de lupa Biomatic, através de paquímetro digital, com precisão de 0,01 mm (Starret). Parte do ensaio foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal (Veco).

4.4.3.2.2 Preparação do meio de cultura

Ágar Sabouraud-dextrose 2% foi preparado através de pesagem e reconstituição em água, nas quantidades recomendadas pelo fabricante, seguido de solubilização sob aquecimento e esterilização em autoclave. Após a esterilização, o volume correspondente à camada base foi distribuído nas placas e a quantia destinada à camada semeada foi mantida em banho-maria, a 48 °C.

4.4.3.2.3 Preparação da solução tampão

Dissolveram-se 2,0 g de fosfato de potássio dibásico e 8,0 g de fosfato de potássio monobásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH foi ajustado, se necessário, entre 5,9 e 6,1, com ácido fosfórico 16 M ou hidróxido de potássio 10 M (tampão nº 1, FARMACOPÉIA, 1988). A solução resultante foi esterilizada em autoclave e empregada para diluição das soluções.

4.4.3.2.4 Preparação do inóculo

Cultura de *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 foi repicada para meio de cultura inclinado (Sabouraud dextrose 2%), e mantida a 20-25 °C por 48 horas. No dia do ensaio, a cultura obtida foi transferida para solução fisiológica. Esta suspensão foi diluída com solução fisiológica estéril até obter transmitância de $25 \pm 2\%$, em espectrofotômetro em 580 nm. Após a padronização, o inóculo foi adicionado ao meio de cultura empregado como camada superfície, na concentração de 1% (V/V). O inóculo padronizado foi mantido em geladeira e empregado por até 4 semanas, conforme recomendação da FARMACOPÉIA (1988).

4.4.3.2.5 Preparação da solução SQR

Preparou-se solução estoque da SQR de voriconazol, com concentração exata de 300 µg/ml, em metanol. Alíquotas de 1,0 ml foram transferidas para balões

volumétricos de 100, 50 e 25 ml e diluídas com solução diluente, obtendo-se soluções com 3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml, respectivamente (P₁, P₂ e P₃).

4.4.3.2.6 Preparação da solução amostra

Pesou-se exatamente, a partir dos comprimidos pulverizados, massa equivalente a 15 mg de voriconazol. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se 25 ml de metanol e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol e filtrou-se em filtro de papel. Do filtrado, transferiram-se alíquotas de 1,0 ml para balões volumétricos de 100, 50 e 25 ml, diluiu-se com solução diluente, obtendo-se soluções com 3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml, respectivamente (A₁, A₂, A₃).

4.4.3.2.7 Ensaio

Em cabine de fluxo laminar (Veco) foram adicionados 20 ml de meio de cultura liquefeito a cada uma de 6 placas de Petri. Após sua solidificação, adicionaram-se 5 ml de meio de cultura liquefeito acrescido de suspensão padronizada do microrganismo teste, constituindo as camadas base e superfície, respectivamente. Em seguida, foram dispostos sobre a superfície do ágar seis cilindros de aço inoxidável, mantendo distância equivalente entre os mesmos. A cada cilindro foram adicionados 100 µl das soluções padrão e amostra, alternadamente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 ± 1 °C, durante 22 a 24 h. Após este período, os halos de inibição do crescimento foram medidos com paquímetro.

4.4.3.3 Validação

Avaliaram-se os seguintes parâmetros de validação: linearidade, precisão e exatidão.

4.4.3.3.1 Linearidade

A curva padrão é inerente ao ensaio microbiológico, ou seja, em cada ensaio realizado obtém-se uma curva padrão. Foram realizados seis ensaios, em três dias diferentes, e a partir das médias dos diâmetros dos halos de inibição das soluções da SQR e da amostra, construíram-se retas em gráfico logaritmo da concentração *versus* diâmetro dos halos de inibição.

A equação da reta para a SQR foi determinada pelo estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. A validade estatística do ensaio foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), para o ensaio 3x3. Para que o ensaio seja válido, o item *regressão* deve apresentar diferença significativa e os itens *desvio de paralelismo* e *desvio de linearidade (quadrático e diferença de quadrático)* não devem apresentar diferença estaticamente significativa (FARMACOPÉIA, 1988).

4.4.3.3.2 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo teste de recuperação. Soluções da amostra foram acrescidas de diferentes volumes da solução da SQR, a fim de obter 70, 100 e 130% da concentração média da curva padrão (6,0 µg/ml). A exatidão foi expressa como percentagem de recuperação da SQR, para cada nível de concentração avaliado. No Quadro 7 é apresentado o esquema de preparação das amostras para este teste.

A) Preparação da solução SQR

As soluções da SQR foram preparadas conforme descrição do item 4.4.3.2.5.

B) Preparação da solução amostra

Pesou-se exatamente, a partir dos comprimidos pulverizados, massa equivalente a 15 mg de voriconazol. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Adicionaram-se 25 ml de metanol e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com 300 µg/ml, e filtrou-se em filtro de papel. Transferiu-se alíquota de 1 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com solução tampão.

C) Preparação das soluções R1, R2 e R3

A solução amostra descrita no item anterior foi adicionada de solução SQR 300 µg/ml, a partir de bureta, conforme descrição do Quadro 7. Todas as soluções obtidas foram dispostas em placa de Petri, de modo que cada placa fosse uma réplica. Foram realizados três ensaios, com 8 placas cada um.

Quadro 7. Preparação das soluções para a determinação da exatidão do ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos.

Solução	Sol. amostra 300 µg/ml (ml)	Sol. SQR 300 µg/ml (ml)	b.v.	Concentração adicionada de SQR (µg/ml)	Conc. final (µg/ml)
A	1,0	-	100	-	3,0
R1	2,0	0,8	200	1,2	4,2
R2	1,0	1,0	100	3,0	6,0
R3	1,0	1,6	100	4,8	7,8

(A) amostra; (R1, R2, R3) amostra acrescida de SQR, em seus três níveis; (b.v.) balão volumétrico.

D) Cálculo do percentual de recuperação

Em cada ensaio obteve-se uma equação da reta, empregada para estimar a concentração das soluções amostra, R1, R2 e R3. Em seguida, o percentual de recuperação foi calculado através da equação 2, descrita no item 4.4.1.2.3.D.

4.4.3.3.3 Precisão

A atividade percentual do voriconazol foi determinada conforme HEWITT (1977). Foram realizados 6 ensaios independentes, em três dias (2 ensaios/dia), com 6 placas cada um, e a partir do desvio padrão relativo (DPR) da potência de cada ensaio, avaliaram-se a repetibilidade e a precisão intermediária do mesmo.

A validade estatística do ensaio foi determinada a partir da média dos halos dos 6 ensaios, ou seja, com um total de 36 placas, conforme descrito no item 4.4.3.3.1.

4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Avaliou-se a estabilidade do voriconazol, como substância ativa, à temperatura e às radiações UV-C e UV-A. A estabilidade química do fármaco pôde ser avaliada durante a validação do método por CLAE, no parâmetro de especificidade, quando foram empregadas condições como: meios alcalino, ácido, neutro e oxidante. Realizou-se também o estudo de estabilidade da formulação injetável, tanto do produto reconstituído quanto das soluções para infusão.

4.5.1 Estabilidade fotoquímica

4.5.1.1 Condições

As amostras foram expostas às seguintes radiações, em câmara espelhada internamente, com dimensões de 100 x 16 x 16 cm:

- lâmpada UV-C (*Light express LE*, 30 W)
- lâmpada UV-A (*Blacklight blue lamp – Orion* 30 W, 130 V)

A temperatura da câmara foi monitorada diariamente. Amostras do fármaco em solução e em estado sólido foram expostas à distância de 10 cm das lâmpadas. As mesmas foram preparadas conforme descrito a seguir.

4.5.1.2 Amostra em solução

Um mililitro de solução metanólica 1mg/ml da SQR, foi acondicionado em cubeta (UV-cuvette micro[®], Brand, transparente a partir de 220 nm), com tampa. Após o período de exposição, transferiu-se volumetricamente o conteúdo das cubetas para balão volumétrico de 10 ml, obtendo-se solução com concentração final teórica de 100 µg/ml. Amostras idênticas, porém protegidas da luz, foram denominadas *amostras controle*.

As soluções expostas à luz UV-C foram analisadas nos tempos 0, 20 e 60 minutos. As expostas à luz UV-A foram analisadas nos tempos zero, 3, 7, 10 e 14 dias, em triplicata.

4.5.1.3 Amostra em estado sólido

Distribuiu-se sobre vidro de relógio, camada fina da SQR. No dia da análise, o conteúdo total foi homogeneizado e pesou-se quantidade equivalente a 10 mg de voriconazol, em balão volumétrico de 10 ml. Diluiu-se com metanol e transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com água, obtendo solução com concentração teórica de 100 µg/ml. As amostras foram avaliadas nos tempos 0, 3, 7, 10 e 14 dias, em triplicata.

4.5.1.4 Comprimidos

Visando a verificar se o revestimento dos comprimidos protege os comprimidos das radiações, expôs-se comprimido íntegro à luz UV-C por 14 dias. Diariamente, inverteu-se a face exposta à radiação, a fim de assegurar que todas as

superfícies fossem irradiadas. Após este período, o mesmo foi pulverizado, diluído até concentração de 100 µg/ml e analisado.

4.5.2 Estabilidade térmica

As amostras foram mantidas em estufa, a 60 °C (Biomatic), cuja temperatura foi monitorada durante todo o período de análise (21 dias em solução e 50 dias em estado sólido).

4.5.2.1 Amostra em solução

Preparou-se solução metanólica de voriconazol 1mg/ml, a partir de comprimidos triturados. Filtrou-se e 2,0 ml do filtrado foram transferidos para balão volumétrico de 25 ml. Após o período de exposição, completou-se o volume do balão volumétrico com água. As amostras em solução foram avaliadas nos tempos zero, 7, 14 e 21 dias. O teor da solução obtido no tempo zero foi considerado como 100%. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.5.2.2 Amostra em estado sólido

Pó de comprimidos triturados foi transferido para frasco de vidro, com tampa de borracha. As amostras foram avaliadas nos tempos zero, 10, 20, 30, 40 e 50 dias. Considerou-se como 100% o teor obtido no tempo zero, para fins de comparação dos resultados subseqüentes. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.5.3 Estabilidade da preparação extemporânea injetável

4.5.3.1 Amostra

Empregaram-se frascos contendo 200 mg de voriconazol, lote 5163904, fabricados em março/2005 e válidos até março/2007. O produto apresenta-se como pó para solução para infusão, ou seja, o produto deve ser reconstituído com água estéril para injeção e posteriormente diluído em diluentes adequados, para permitir sua infusão.

4.5.3.2 Preparação das soluções

A reconstituição do injetável, a preparação das soluções para infusão e a remoção do conteúdo para análise foram realizadas em cabine de fluxo laminar (Veco), com materiais estéreis, visando à manutenção da esterilidade do produto.

4.5.3.3 Reconstituição do injetável

Os frascos-ampola de voriconazol foram reconstituídos conforme indicação do fabricante (19 ml de água estéril para injeção), obtendo-se 20 ml de solução 10 mg/ml. Parte da solução foi usada na preparação de bolsas para infusão. O restante foi mantido sob refrigeração na embalagem original e analisado pelo método por CLAE, nos tempos zero, 1, 2, 3, 6 e 8 dias após a preparação.

No dia da análise, 1,0 ml do produto reconstituído foi transferido para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml e o volume foi completado com água. Esta análise foi realizada em duplicata.

Determinou-se o teor no tempo zero, o qual foi considerado como 100% para fins de comparação com os teores subseqüentes.

4.5.3.4 Preparação da solução para infusão em cloreto de sódio 0,9%

Foram empregadas bolsas flexíveis de PVC contendo 50 ml de cloreto de sódio 0,9% (Halex Istar, lote IB 607/05 e lote IB 639/03, válidas até outubro e novembro/2008, respectivamente).

Primeiramente, foram removidos 2,5 ml do conteúdo das bolsas, com auxílio de seringa estéril. Em seguida, adicionaram-se 2,5 ml do produto reconstituído (10 mg/ml), obtendo-se solução com concentração estimada de 0,5 mg/ml. Foram preparadas cinco bolsas, sendo que três foram mantidas em geladeira e duas em temperatura ambiente. Todas as bolsas foram mantidas ao abrigo da luz. No dia da análise, removeu-se 1,0 ml de cada bolsa para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com água. Cada bolsa foi analisada em duplicata, nos tempos zero, 2, 4, 7, 9, 11, 14 e 21 dias após o preparo, pelo método de CLAE.

4.5.3.5 Preparação da solução para infusão em glicose 5%

Foram empregadas bolsas flexíveis de PVC contendo 100 ml de glicose 5% (Halex Istar, lote IB 631/03, validade: novembro/2008).

Primeiramente, retiraram-se, com auxílio de seringa estéril, 52,5 ml do conteúdo das bolsas. Em seguida, foram adicionados 2,5 ml do produto reconstituído (10 mg/ml), obtendo-se solução com concentração estimada de 0,5 mg/ml. Os demais procedimentos são idênticos aos descritos no item anterior.

Na Figura 6 são apresentados o injetável após reconstituição e as bolsas para infusão.



Figura 6. Pó para solução injetável de voriconazol, após reconstituição com água estéril para injeção, e bolsas para infusão contendo 0,5 mg/ml de voriconazol em glicose 5% ou cloreto de sódio 0,9%.

4.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Esta etapa pode ser resumida nos seguintes passos: isolamento das frações, determinação da pureza das mesmas, concentração das frações e identificação dos produtos de degradação.

A fim de isolar os produtos de degradação do voriconazol, foi desenvolvido método por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa. Para identificação do produto de degradação foram empregadas as técnicas de espectrofotometria no infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS/MS).

4.6.1 Degradação da amostra

A cinco mililitros de solução de voriconazol 1 mg/ml, preparada a partir de comprimidos, foram adicionados 5 ml de NaOH 1M; manteve-se em repouso por 15 minutos. Em seguida, neutralizou-se a solução com HCl 1M.

4.6.2 Isolamento por CLAE semipreparativa

Através de testes preliminares foram estabelecidas as condições analíticas para a separação dos produtos de degradação do voriconazol. As condições usadas foram:

- **Equipamento:** cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), provido de bomba LC-10AD, injetor manual Rheodyne, detector de UV-Vis SPD-10AV, desgaseificador DGU-14A e central de controle SCL-10A, com software CLASS-VP.
- **Fase móvel:** constituída de metanol:água, na proporção 7:3, Após o preparo, a mesma foi desgaseificada pelo emprego simultâneo de vácuo e ultrassom, seguida de desgaseificação no próprio cromatógrafo.
- **Condições cromatográficas:** coluna Spherisorb[®] S5 C-8 (10 x 250 mm, 5 µm), lote PSS831885 (Waters); fluxo: 1,2 ml/minuto; comprimento de onda: 255 nm, volume de injeção: 200 µl.

4.6.3 Determinação da pureza das frações

Com o objetivo de verificar a pureza das duas frações coletadas através da CLAE semipreparativa, antes de concentrá-las, ambas foram analisadas pelo método por CLAE analítica, no qual a pureza do pico cromatográfico de cada fração foi determinada. Empregou-se o mesmo sistema cromatográfico (equipamento, fase móvel e condições) utilizado no doseamento do voriconazol (itens 4.4.2.1 a 4.4.2.4). A pureza das frações foi novamente determinada após a evaporação do solvente em evaporador rotatório.

4.6.4 Concentração das frações

As frações foram levadas à secura em evaporador rotatório (Büchi-RE 111), acoplado a banho-maria (Büchi 461), em temperatura de 50 °C ± 2 °C, sob pressão

reduzida. Uma vez que as frações continham 30% de água como diluente, foi necessária a adição de butanol para permitir a evaporação total dos solventes.

A fim de verificar se durante o processo de concentração os produtos de degradação mantinham-se estáveis, as 2 frações foram ressuspensas com 400 µl de metanol (grau CLAE). Pequena porção de cada suspensão foi diluída e analisada por CLAE analítica. Após, as frações foram novamente dessecadas, sob corrente de nitrogênio e mantidas em dessecador sob vácuo, protegidas da luz.

4.6.5 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

Preparou-se pastilha através da dispersão de 1,5 mg do PD1 em 150 mg de brometo de potássio, com posterior compressão. Empregou-se espectrofotômetro de infravermelho marca Bomem-Hartmann & Braun, modelo MB100. A análise foi realizada no Instituto de Física da UFRGS.

4.6.6 Espectrometria de massas

Solução metanólica do PD1 foi analisada em espectrômetro de massas Micromass Quattro LC, que operou no modo eletrospray positivo. As condições do detector foram otimizadas a fim de maximizar a intensidade de íons com massa inferior a 349 (massa do voriconazol). Empregaram-se as seguintes condições: fluxo de nitrogênio de 38 e 403 l/h (cone e dessolvatação, respectivamente), voltagens do capilar e do cone de 3,2 KV e 42 V, respectivamente, e temperaturas da fonte e de dessolvatação de 120 e 250 °C, respectivamente.

4.6.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Realizado da mesma maneira que para a SQR (descrito no item 4.2.6).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS PRODUTOS SUBMETIDOS À DEGRADAÇÃO

Soluções da SQR degradadas foram avaliadas pelos três métodos desenvolvidos. Expôs-se solução da SQR 1mg/ml às seguintes condições de degradação: hidrólise básica por 15 minutos, com NaOH 0,1M e luz UV-C por 1 hora, em triplicata para cada condição.

Após o término de cada reação, as soluções foram diluídas a concentrações presumidas de 100, 50 e 20 µg/ml com metanol, e a 10 µg/ml, em tampão fosfato pH 6,0. As soluções 100 µg/ml foram analisadas por CLAE; as soluções com 50 e 20 µg/ml foram analisadas por espectrofotometria no UV e as soluções contendo 10 µg/ml foram avaliadas pelo ensaio microbiológico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA SQR

Os testes apresentados a seguir visaram tanto a identificação da matéria-prima empregada como SQR neste trabalho, bem como a fornecer dados que até o momento não estão disponíveis na literatura.

O voriconazol é um pó cristalino, branco, não higroscópico. O laboratório detentor da patente afirmou que não há evidências de polimorfismo ou de solvatos e que o mesmo é muito solúvel em metanol, clorofórmio e acetonitrila e insolúvel em água (EMEA, 2005).

5.1.1 Ponto de fusão

A determinação desta constante física auxilia na avaliação da pureza e identidade de substâncias. A presença de impurezas, via de regra, produz uma redução do ponto de fusão. Na literatura são relatados os seguintes valores: 127 °C (FROMTLING, 1996); 128 a 134 °C (GHANNOUM; KUHN, 2002) e 127 a 130 °C (DRUG BANK, 2007). O ponto de fusão apresentado foi 130,8 °C, próximo ao valor indicado no certificado de análise do laboratório produtor (130 °C).

5.1.2 Poder rotatório específico

A atividade óptica é função da estrutura química da substância e de sua concentração. A determinação do poder rotatório serve para estabelecer a identidade e a pureza de substâncias (FARMACOPÉIA, 1988). Por apresentar dois centros estereogênicos, o voriconazol pode existir como 4 diastereoisômeros, sendo que a atividade biológica deve-se, quase na totalidade, ao enantiômero 2*R*, 3*S*. Nas condições empregadas, recomendadas na literatura, o valor encontrado foi -59,3 °, sendo o valor de referência -62 ° (FROMTLING, 1996). O valor citado no certificado de análise do laboratório produtor é de -58,49 °.

5.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

A Figura 7 apresenta o espectro de absorção na região do ultravioleta da SQR do voriconazol, diluída inicialmente em metanol e em seqüência, alternativamente, em água, metanol, ácido clorídrico 0,1M e hidróxido de sódio 0,1M. Observou-se que o comprimento de onda de máxima absorção do fármaco é em 255 nm e que não houve alteração do mesmo após diluição em ampla faixa de pH. Isto é conseqüência da inexistência de grupamentos ionizáveis ligados diretamente aos grupos cromóforos da molécula do fármaco.

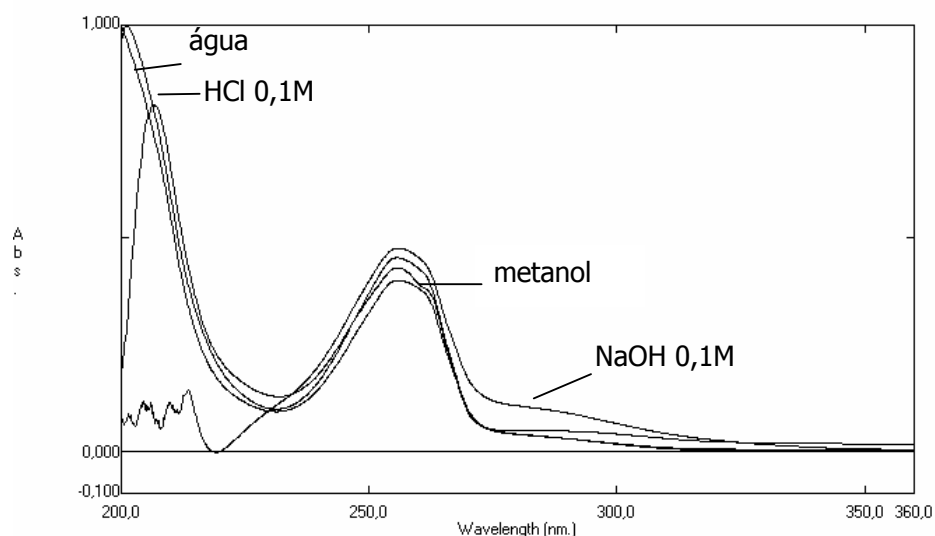


Figura 7. Espectro na região do ultravioleta da SQR de voriconazol diluída em água, metanol, hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M (20 µg/ml).

Constatou-se, porém, que o perfil do espectro em meio alcalino foi diferente dos demais, e que o mesmo modificava-se com o passar do tempo. Este dado, aliado à informação da bula do produto, que alerta sobre a instabilidade do fármaco em soluções levemente alcalinas, motivou a verificação do comportamento do fármaco em solução de NaOH 0,1M, em diferentes tempos após o preparo (Figura 8).

Os espectros obtidos demonstraram que o voriconazol é bastante instável em meio alcalino. Observou-se que os produtos de degradação absorvem mais intensamente do que o próprio fármaco (efeito hiperacrômico) e em comprimento de onda inferior (deslocamento hipsocrômico). Deste modo, a identificação do fármaco

neste meio não é recomendada. Para maiores detalhes sobre a degradação em meio alcalino, ver item 5.32.1.

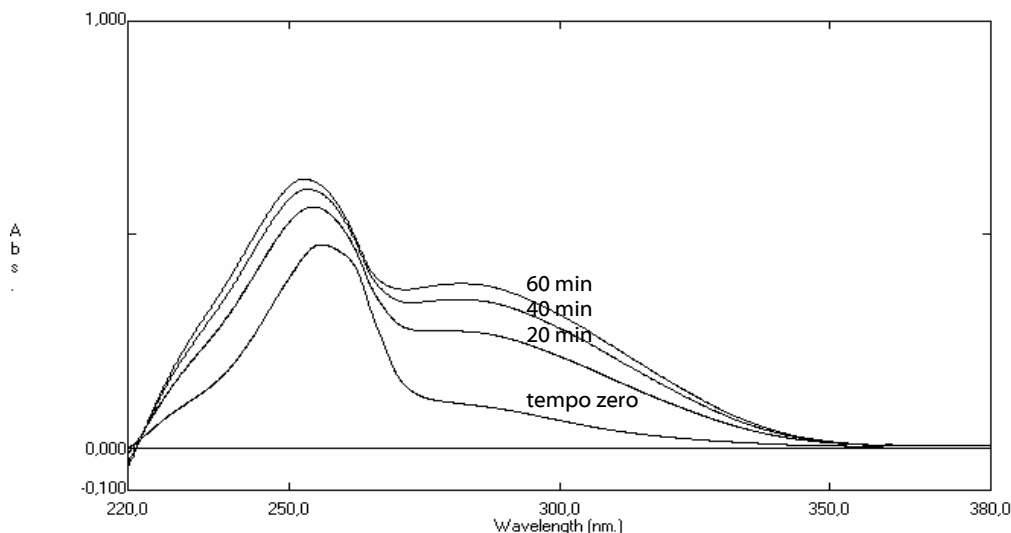


Figura 8. Espectro na região do ultravioleta de solução de SQR de voriconazol diluída em hidróxido de sódio 0,1 M (20 µg/ml) e avaliada nos tempos zero, 20, 40 e 60 minutos após o preparo.

5.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Quase todos os compostos que possuem ligações covalentes, sejam inorgânicos ou orgânicos, absorvem várias freqüências de radiação eletromagnética na região dos raios infravermelho do espectro eletromagnético. Certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma freqüência, independentemente do tipo de molécula. No entanto, considerando duas moléculas com o mesmo grupamento, em cada estrutura a mesma ligação estará em ambiente diferente, e, por isso, não há possibilidade de duas moléculas terem o mesmo espectro de infravermelho. Desta forma, o espectro de infravermelho pode ser usado na identificação de moléculas da mesma forma que a impressão digital é usada nos seres humanos (PAVIA *et al.*, 2001).

Até o momento, não há na literatura espectro de infravermelho disponível para comparação. No entanto, sendo o voriconazol congênere do fluconazol, algumas bandas de absorção são coincidentes, e para o fluconazol há dados

relatados (CYR *et al.*, 1996). O espectro de infravermelho do voriconazol é apresentado na Figura 9 e as atribuições das principais bandas de absorção constam no Quadro 8.

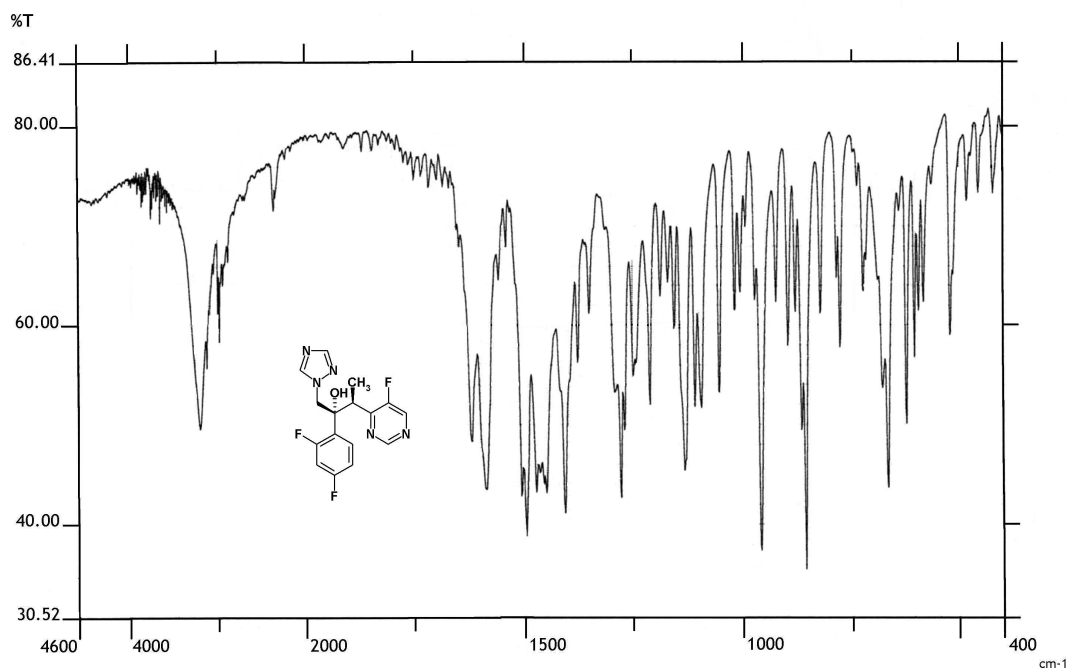


Figura 9. Espectro na região do infravermelho da SQR do voriconazol, em brometo de potássio.

Quadro 8. Freqüências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho do voriconazol.

Freqüência (cm ⁻¹)	Atribuição
3198	Deformação axial de O – H
2980	Deformação axial simétrica de metila
1618	Deformação axial das ligações C = C do anel benzênico
1587	Deformação axial de C = N
1508	Deformação axial simétrica do anel triazólico
1473	Deformação angular simétrica de metileno
1449	Deformação angular assimétrica de metila
1379	Deformação angular simétrica de metila
1277	Deformação axial de C – N
1132	Deformação axial de C – O de álcool terciário
958	Deformação angular no plano de C – H do anel triazólico
858	Deformação angular fora do plano de C – H do anel triazólico

Fontes: NAKANISHI; SOLOMON, 1977; CYR *et al.*, 1996; PAVIA *et al.*, 2001.

5.1.5 Espectrometria de massas

Na técnica de impacto de elétrons (EI), comumente a mais usada, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). O feixe de elétrons converte parte das moléculas da amostra em íons positivos. A remoção de um elétron de uma molécula fornece um íon cuja massa é a massa da molécula original. Este íon é chamado *íon molecular*, simbolizado por M^+ . Logo, esta técnica permite determinar a massa molecular da substância em análise (PAVIA *et al.*, 2001).

O método empregado para separação dos íons foi MS/MS (espectrometria de massas em seqüência), que consiste em espectrômetro acoplado a uma câmara de colisões, onde o campo elétrico não atua e em seguida, acoplado a um segundo espectrômetro de massas. Determinados íons (“íons-principais”) são separados no primeiro espectrômetro e passam, um de cada vez, para a câmara de colisão onde se formam os “íons secundários” (também chamados “daughters”), gerados pela colisão com um gás inerte. Estes “íons secundários” formados passam então pelo segundo espectrômetro de massas, onde se obtém espectro dos “íons secundários” (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). As condições do detector foram otimizadas de modo a maximizar a intensidade de íons com m/z 350, visto que a massa do voriconazol é 349,3.

A Figura 10 apresenta o espectro de massas obtido. Pode ser observado o pico do íon molecular do voriconazol, com m/z 349,8. O padrão de fragmentação observado coincide com relatos de literatura (KEEVIL *et al.*, 2005), sendo que o fragmento com m/z 280,9 corresponde à perda do anel triazólico. O fragmento de m/z 223,9 é compatível com a perda da cadeia alquila e do anel fluorpirimidínico.

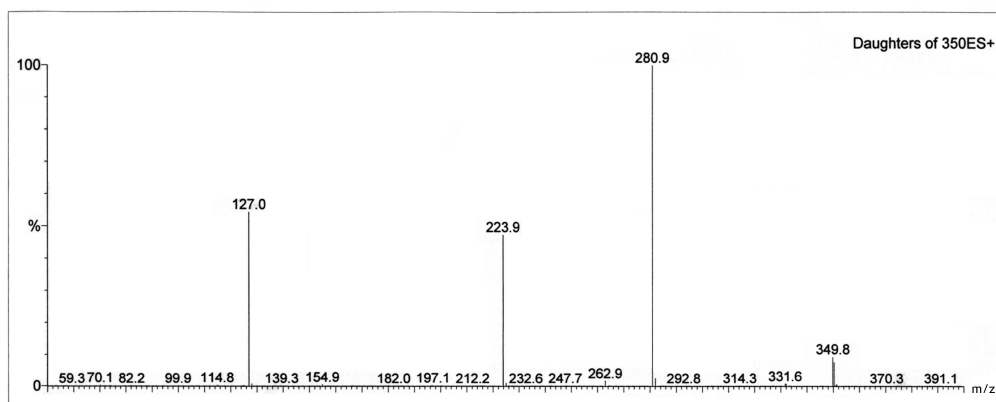


Figura 10. Espectro de massas (MS/MS) do voriconazol.

5.1.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Na Tabela 1 constam os deslocamentos químicos dos hidrogênios do voriconazol e o espectro de RMN de ^1H do mesmo é apresentado na Figura 11. Os valores dos deslocamentos químicos observados são os mesmos da literatura (BUTTERS *et al.*, 2001); estes autores, no entanto, não realizaram a atribuição dos sinais do espectro. A numeração das posições dos hidrogênios e carbonos não seguiu a nomenclatura química do fármaco, mas sim, foi estabelecida de modo a facilitar a comparação com os espectros do produto de degradação.

Em campo alto (1,12 e 3,93 ppm) foram constatados picos dos grupos CH_3 e CH , cujo acoplamento foi evidenciado pelo mesmo valor de J (7 Hz). Os dupletos em 4,80 e 4,34 referem-se aos dois hidrogênios do CH_2 , os quais, devido à proximidade com centro estereogênico (2*R*, posição 7), encontram-se em ambiente químico diferente e por isso apresentam-se como dois dupletos, com mesma constante de acoplamento ($J= 14,2$ Hz). Em 5,99 ppm foi observado pico correspondente ao hidrogênio da hidroxila alcoólica.

Os picos na faixa de 6,93 a 7,27 ppm são atribuídos aos hidrogênios do anel benzênico trissubstituído. Além do acoplamento esperado com os hidrogênios em *orto* e *para*, também ocorre acoplamento com os átomos de flúor, o que torna mais complexos a multiplicidade e os acoplamentos observados. Os picos relativos aos

hidrogênios do anel triazólico são observados em 7,61 e 8,23 ppm, evidenciados como simpletos. Em 8,85 e 9,03 ppm são observados dois dupletos, atribuídos aos 2 hidrogênios do anel fluorpirimidínico.

Tabela 1. Dados dos espectros de RMN de ^1H do voriconazol (400 MHz, em DMSO-D6).

Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Nº de hidrogênios	Atribuição	Posição (Figura 11)
1,12	d, $^3J_{AX} = 7$ Hz	3	CH ₃	22
3,93	q, $^3J_{AX} = 7$ Hz	1	CH, cadeia alifática	14
4,80 e 4,34	d, $^2J_{AM} = 14,2$ Hz	2	CH ₂	8
5,99	s	1	OH	21
6,93	m	1	CH, anel benzênico trissubstituído	5
7,18	m	1	CH, anel benzênico trissubstituído	3
7,27	q, $J = 2$ Hz	1	CH, anel benzênico trissubstituído	6
7,61	s	1	CH, anel triazólico	11 ou 13
8,23	s	1	CH, anel triazólico	11 ou 13
8,85	d, $^2J_{AM} = 2$ Hz	1	CH, anel fluorpirimidínico	17
9,04	D, $^2J_{AM} = 2$ Hz	1	CH, anel fluorpirimidínico	19

*s: simpleto; d: dupletto; q: quarteto; m: multipletto.

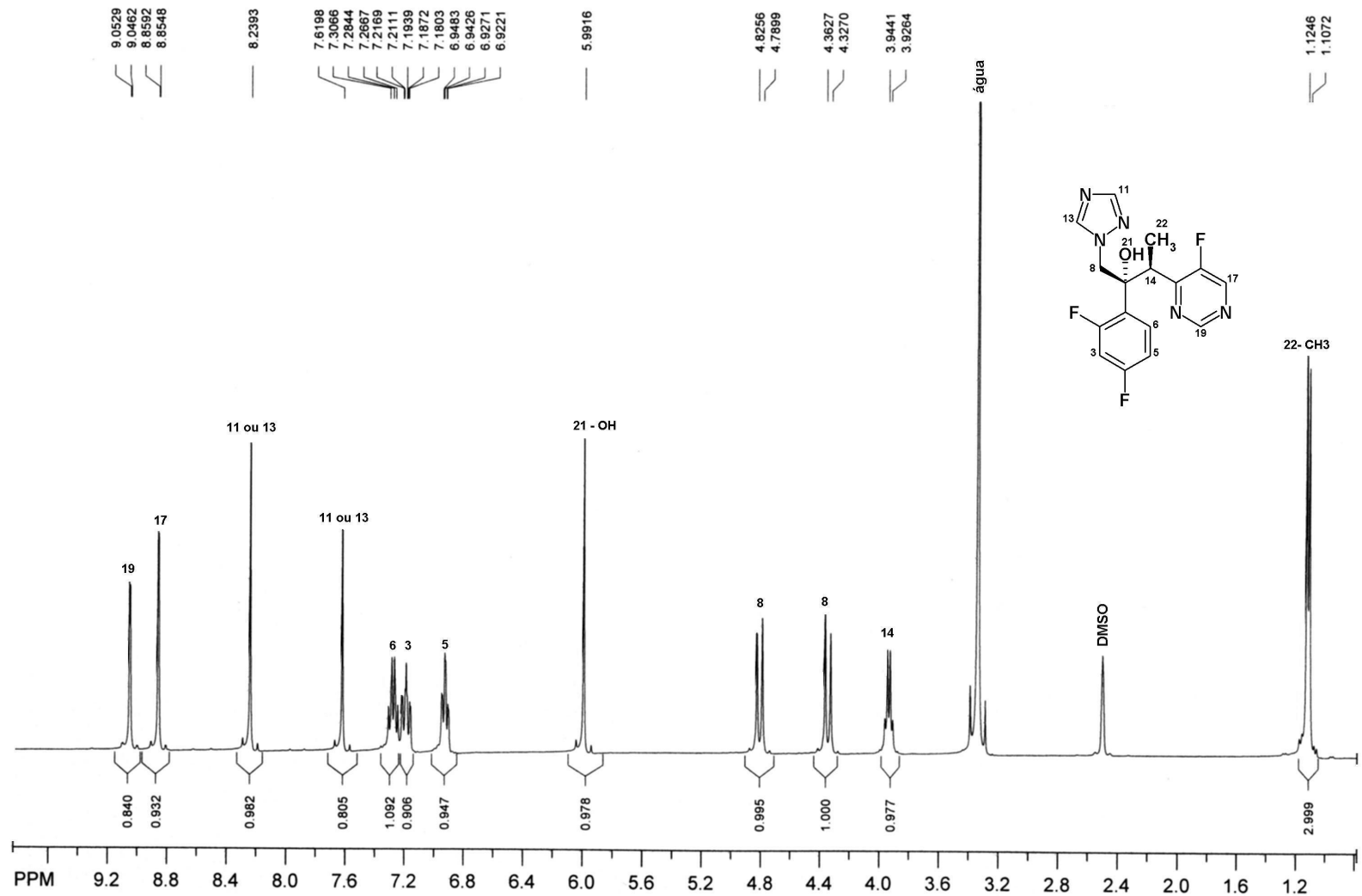


Figura 11. Espectro de RMN de ¹H do voriconazol (400 MHz, em DMSO-D₆).

5.1.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Na Tabela 2 constam os deslocamentos químicos dos carbonos do voriconazol e na Figura 12 é apresentado o espectro de RMN de ^{13}C . Ao invés de apenas um pico relativo a cada carbono, foram observados vários, o que se deve ao acoplamento dos átomos de carbono com os átomos de flúor da molécula do fármaco. Isto ocorre porque o núcleo do F^{19} , a exemplo dos núcleos do H^1 , C^{13} e P^{31} , apresenta spin 1/2, possuindo dois momentos magnéticos: $-1/2$ e $+1/2$. Desta forma, estes núcleos podem absorver energia eletromagnética quando submetidos à análise de ressonância magnética, produzindo sinais no espectro de RMN (PAVIA *et al.*, 2001).

Os valores dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento carbono-flúor (J_{CF}) estão de acordo com a literatura (PRETSCH *et al.*, 1985) e dados semelhantes foram relatados para o fluconazol, congênere do voriconazol (CYR *et al.*, 1996).

Observou-se que os únicos carbonos que não acoplam com os átomos de flúor são os do anel triazólico (posições 11 e 13) e a metila (posição 22), que apresentaram simpletos em 150,3, 144,8 (ver espectro expandido) e 13,7 ppm, respectivamente. Em campo baixo (158,6 e 161,8 ppm) foram observados dois duplos dupletos, atribuídos aos carbonos das posições 2 e 4, que acoplam com o flúor adjacente ($^1J_{\text{CF}} = 246$ Hz) e com o flúor em posição *para* ($^3J_{\text{CF}} = 12$ Hz). Em 156,3 ppm, observou-se duplete relativo ao carbono acoplado com flúor, do anel fluorpirimidínico ($^1J_{\text{CF}} = 263$ Hz). Na faixa de 130 a 103 ppm são encontrados os sinais relativos aos demais carbonos do anel benzênico trissubstituído. Apesar de não ter sido visualizado o carbono da posição 14, atribuído ao CH ligado à metila, o sinal correspondente ao próton deste grupamento foi detectado no espectro de RMN de ^1H .

As atribuições foram confirmadas pelo espectro em uma dimensão (1D) APT (*Attached Proton Test*) e pelo espectro bidimensional heteronuclear (^1H , ^{13}C) HETCOR (*Heteronuclear Correlation Spectroscopy*). No espectro APT, os sinais do ^{13}C dos átomos de carbono da molécula exibem diferentes fases, dependendo

do número de hidrogênios ligados a cada carbono. Deste modo, é possível atribuir os sinais a CH₃, CH₂, CH e C. O espectro HETCOR evidencia as correlações entre átomos de carbono e hidrogênio (PAVIA *et al.*, 2001); o mesmo é apresentado no Anexo 5.

Tabela 2. Dados dos espectros de RMN de ¹³C do voriconazol (400 MHz, em DMSO-D6).

Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade ^a e constante de acoplamento (J)	APT ^b	Atribuição	Posição (Figura 12)
13,7	s	CH ₃	CH ₃	22
55,3	d, ⁴ J _{CF} = 4,9 Hz	CH ₂	CH ₂ , cadeia alifática	8
76,8	d, ³ J _{CF} = 5,0 Hz	C	C-OH, cadeia alifática	7
103,9	dd, ² J _{CF} = 26,1 e 28,2 Hz	CH	anel benz. trissubst.	3
110,8	dd, ² J _{CF} = 20,6 Hz; ⁴ J _{CF} = 2,7 Hz	CH	anel benz. trissubst.	5
124,4	dd, ² J _{CF} = 12,6 Hz; ⁴ J _{CF} = 3,6 Hz	C	anel benz. trissubst.	1
130,4	dd, ³ J _{CF} = 6,1 e 9,5 Hz	CH	anel benz. trissubst.	6
144,8	s	CH	anel triazólico	11 ou 13
145,0	d, ² J _{CF} = 22,6 Hz	CH	anel fluorpirimidínico	17
150,3	s	CH	anel triazólico	11 ou 13
153,9	d, ⁴ J _{CF} = 7,7 Hz	CH	anel fluorpirimidínico	19
156,3	d, ¹ J _{CF} = 263,4 Hz	C	CF, anel fluorpirimidínico	16
156,8	d, ² J _{CF} = 12,0 Hz	C	anel fluorpirimidínico	15
158,6	dd, ¹ J _{CF} = 246,6 Hz; ³ J _{CF} = 12,2 Hz	C	CF, anel benz. trissubst.	4 ou 2
161,8	dd, ¹ J _{CF} = 246,6 Hz; ³ J _{CF} = 12,7 Hz	C	CF, anel benz. trissubst.	4 ou 2
Não visualizado	14

^as: simpleto; d: duplete; dd: duplo duplete; ^bAPT: Attached Proton Test

Os testes de identificação e elucidação apresentados permitiram a determinação da pureza e a identificação da matéria-prima que foi empregada como SQR para todos os demais ensaios.

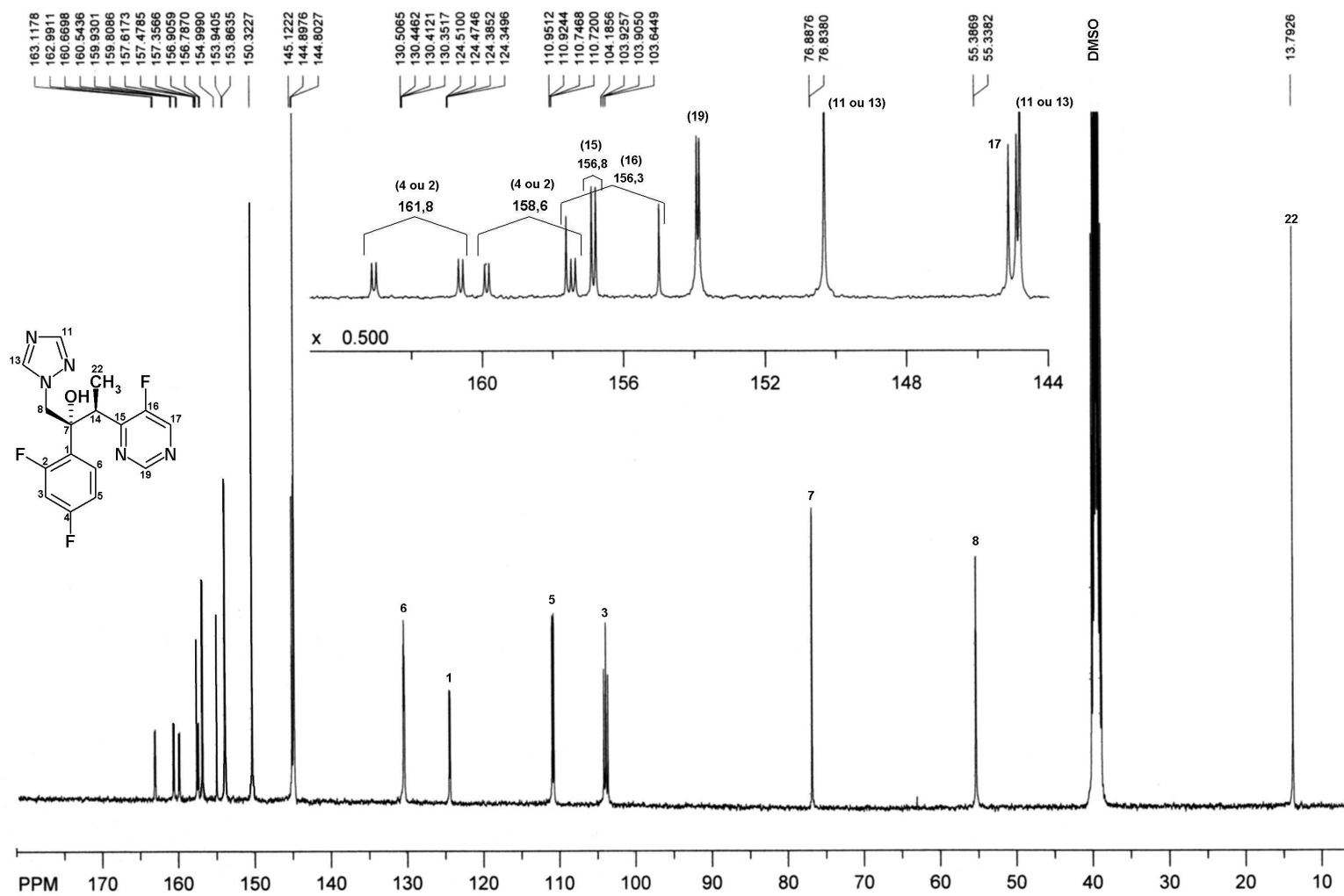


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C do voriconazol, (400 MHz, em DMSO-D₆). Valores em ppm no topo da figura referem-se aos deslocamentos químicos dos picos do espectro total; a figura menor é uma expansão da porção do espectro compreendida entre 170 e 144 ppm.

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS

5.2.1 Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Através da comparação dos espectros na região do UV da SQR e dos comprimidos em diferentes solventes, foi realizada a identificação do voriconazol na amostra avaliada (Figura 13).

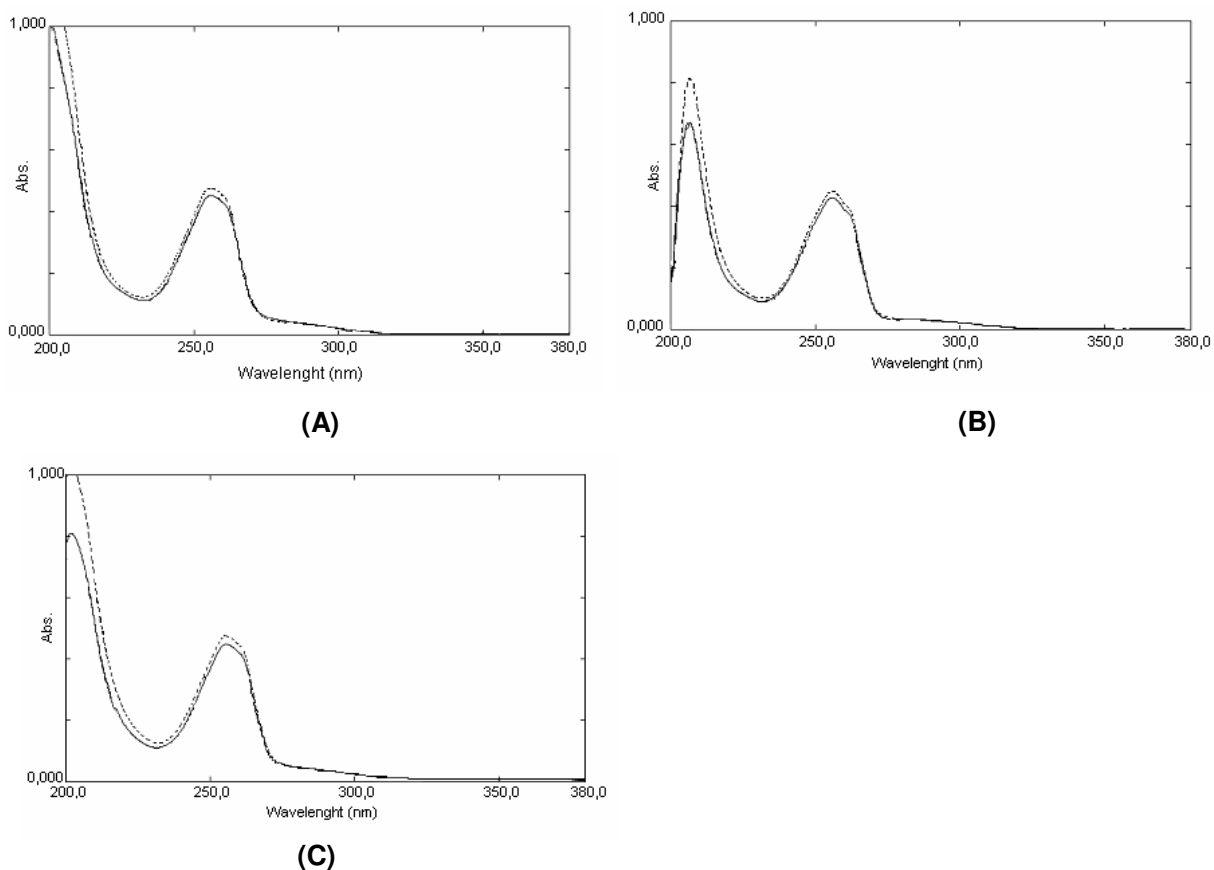


Figura 13. Espectro de UV do voriconazol SQR (linha contínua) e em comprimidos (linha tracejada), em diferentes solventes, na concentração de 20 µg/ml. Diluente inicial em todos os testes: metanol. Diluente final: água (A), metanol (B) e ácido clorídrico 0,1M (C).

A semelhança dos espectros da SQR e dos comprimidos indicou a presença do voriconazol na formulação avaliada e a não interferência dos excipientes, tornando o método adequado para a identificação do fármaco em comprimidos.

5.2.2 Cromatografia em camada delgada

Sabendo-se da instabilidade do fármaco em meio alcalino, buscou-se o desenvolvimento de sistema cromatográfico que possibilitasse a identificação do voriconazol em comprimidos, tanto em amostras íntegras quanto em amostras degradadas nessa condição. Adicionalmente, procurou-se desenvolver sistema que diferenciasse o voriconazol de fármacos semelhantes, como o fluconazol. Exemplo de placa obtida é apresentado na Figura 14.

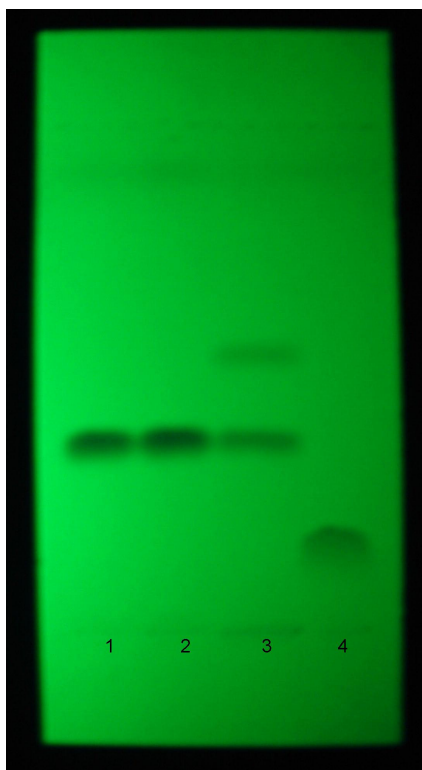


Figura 14. Placa cromatográfica (CCD), visando à identificação do voriconazol em comprimidos e em amostras submetidas à degradação. (1) solução SQR, (2) solução de comprimidos, (3) solução de comprimidos degradada (NaOH 0,1M, 15 minutos), (4) solução de fluconazol. Fase móvel: acetato de etila:ácido acético (9,5:0,5, V/V). Detecção: luz UV, 254 nm.

Os valores de Rf para a SQR e comprimidos e comprimidos submetidos à degradação foram semelhantes: 0,364, 0,361 e 0,361 respectivamente (média de 5 placas). Os valores de Rf do produto(s) de degradação e do fluconazol foram de 0,503 e 0,165, respectivamente. Verificou-se que o sistema desenvolvido possibilitou a diferenciação do voriconazol do fluconazol e a detecção dos produtos de degradação.

5.2.3 Cromatografia a líquido de alta eficiência

A Figura 15 apresenta os cromatogramas das soluções de voriconazol SQR e comprimidos, respectivamente. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da solução amostra (8,5 minutos), obtida no método por CLAE, descrito nos itens 4.4.2.1 a 4.4.2.4 e 4.4.2.5.4 para a quantificação do voriconazol em comprimidos, correspondeu àquele do pico principal da solução padrão.

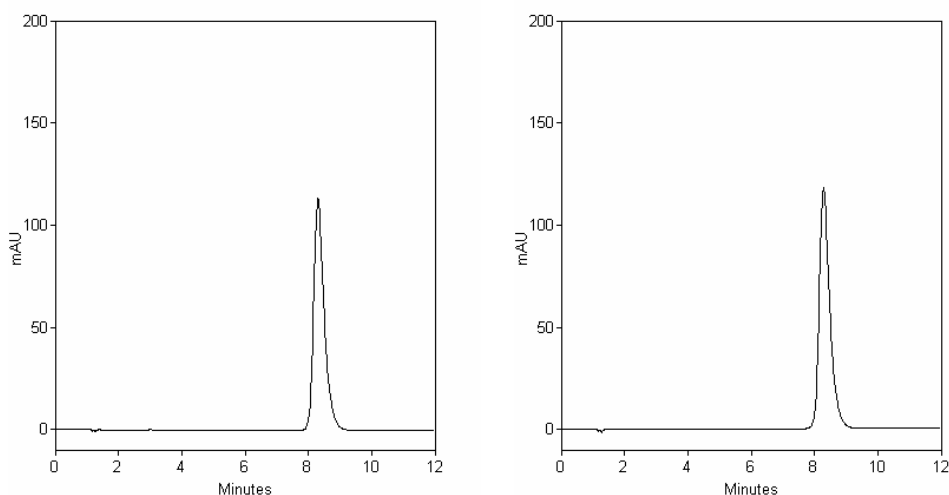


Figura 15. Cromatogramas da SQR de voriconazol e dos comprimidos de voriconazol, respectivamente. Concentração: 100 µg/ml. Condições: detecção em 255 nm, coluna C-8 (Merck), fase móvel metanol: solução de trietilamina 0,6%, pH 6,0 (1:1), fluxo 1ml/minuto.

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDOS

Não existem métodos descritos na literatura voltados à análise do voriconazol em formulações. Assim, neste trabalho foram desenvolvidos três métodos para quantificação do fármaco em comprimidos: espectrofotometria no ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico.

5.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Este método tem como vantagens sua robustez, simplicidade e amplo emprego no doseamento de formas farmacêuticas cujos excipientes não interfiram na análise. Por ser um método rápido e de simples execução, pode ser empregado na análise de produtos em processamento, bem como, no teste de dissolução. Sua maior limitação é sua baixa seletividade, o que restringe sua aplicação na análise de misturas (WATSON, 2005).

Como comprimento de onda da análise empregou-se 255 nm, ponto de absorção máxima do fármaco. O solvente inicial, metanol, foi escolhido devido à alta solubilidade do voriconazol neste solvente. As diluições subseqüentes foram feitas com água.

5.3.1.1 Especificidade

A especificidade do método desenvolvido foi avaliada através da varredura do espectro de ultravioleta de solução contendo os excipientes dos comprimidos. A quantidade empregada de cada excipiente teve por base o indicado na literatura para produção de comprimidos (KIBBE, 2000), uma vez que as quantidades exatas não são citadas pelo fabricante. O espectro obtido é apresentado na Figura 16. Observou-se que os excipientes não interferiram na quantificação do voriconazol, em 255 nm.

Os testes de degradação forçada não foram realizados neste método, pois, conforme apresentado na análise qualitativa do voriconazol (item 5.1.3), os

produtos de degradação do mesmo, em meio alcalino, absorvem intensamente próximo a 255 nm, indicando a pouca especificidade deste método na análise de amostras degradadas.

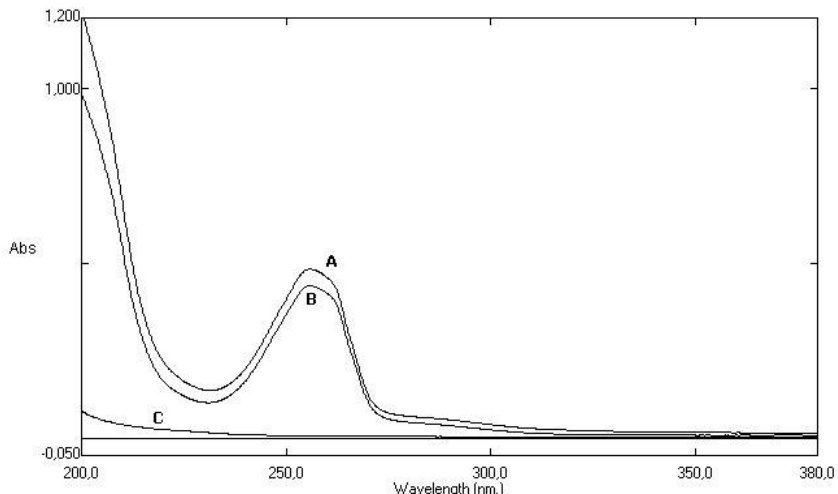


Figura 16. Espectro na região do ultravioleta da solução amostra (A), solução da SQR (B), ambas em concentração aproximada de 18 µg/ml, e solução placebo (C).

5.3.1.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise. A linearidade pode ser determinada pela elaboração de curvas padrão com no mínimo cinco concentrações (ICH, 2005).

Na Tabela 3 são apresentados os valores de absorvância observados para soluções da SQR do voriconazol, em concentrações de 12,0 a 24,0 µg/ml. A Figura 17 representa a curva padrão e a equação da reta, obtida por regressão linear através do método dos quadrados mínimos. A análise estatística dos resultados (ANOVA - Tabela 24, Anexo 1) indicou ausência de desvio de linearidade e regressão significativa na faixa de concentração testada.

Tabela 3. Valores de absorvância (A) das curvas padrão de voriconazol, determinadas em 255 nm, realizadas em três dias diferentes.

		Concentrações (µg/ml)						
		12	14	16	18	20	22	24
(A)	dia 1	0,277	0,322	0,368	0,413	0,454	0,506	0,548
	dia 2	0,276	0,319	0,364	0,411	0,456	0,504	0,554
	dia 3	0,276	0,324	0,366	0,413	0,462	0,504	0,555
	Média	0,276	0,322	0,366	0,412	0,457	0,505	0,552
	DPR	0,2	0,78	0,55	0,28	0,91	0,23	0,68

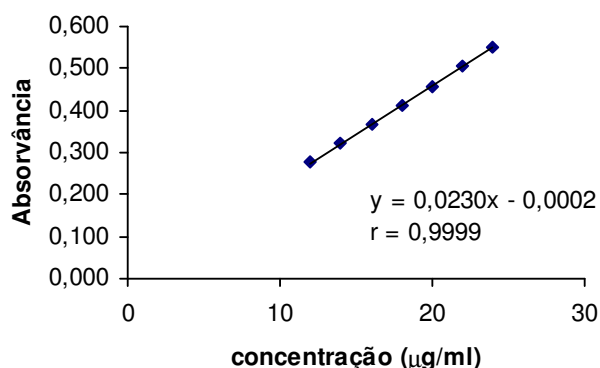


Figura 17. Representação da curva padrão de voriconazol, método por espectrofotometria de absorção no UV, na faixa de 12 a 24 µg/ml.

5.3.1.3 Exatidão

A exatidão de métodos analíticos voltados à análise quantitativa de fármacos em formulações pode ser avaliada através de quatro modos distintos: A) pela análise de placebo da formulação, ao qual tenha sido adicionada quantidade conhecida da substância ativa; B) pelo teste de recuperação, no qual quantidades conhecidas da substância ativa são adicionadas à formulação e seu percentual de recuperação ao término do processo é medido; C) pela comparação dos resultados do método em teste com os obtidos por método previamente estabelecido, cuja exatidão tenha sido determinada; D) a exatidão pode ser inferida desde que a linearidade, a especificidade e a precisão do método tenham sido estabelecidas (ICH, 2005).

Neste trabalho, optou-se por avaliar a exatidão pelo teste de recuperação. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003b), o percentual de recuperação de métodos analíticos para quantificação de formulações deve ser avaliado na faixa de 80 a 120% do valor usual de análise. Os resultados são apresentados na Tabela 4, sendo que o percentual médio de recuperação do método foi de 99,79%.

Tabela 4. Teste de recuperação da solução da SQR de voriconazol adicionada à solução de comprimidos de voriconazol, através do método de espectrofotometria no UV.

Amostra	Nível (%)	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)	Recuperação (%)
R1	75	1,5	1,5402	102,68
			1,4742	98,28
			1,5181	101,21
R2	100	6,0	6,0066	100,11
			5,9628	99,38
			5,8968	98,28
R3	125	10,5	10,4727	99,74
			10,4286	99,32
			10,4076	99,12
Recuperação média (%)				99,79
DPR				1,41

(R1, R2, R3): amostras acrescidas de SQR.

5.3.1.4 Precisão

A precisão de um método analítico é a proximidade entre os resultados individuais quando o procedimento analítico é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma amostra homogênea. É expressa como desvio padrão relativo (DPR) de uma série de determinações (ICH, 2005).

A precisão do método espectrofotométrico foi avaliada através de seis determinações da amostra de comprimidos no mesmo dia (repetibilidade) e em dias diferentes (precisão intermediária). Os resultados das análises são apresentados na Tabela 5. Os valores de DPR intra-dia variaram de 0,9 a 1,2% e o DPR entre dias foi de 1,0%.

Tabela 5. Teores percentuais da amostra de comprimidos de voriconazol, determinados por espectrofotometria no UV.

Amostra	% do valor declarado		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	98,99	98,64	98,75
2	100,12	100,30	99,38
3	100,71	100,42	100,20
4	101,60	100,75	100,23
5	101,75	100,96	101,69
6	101,75	101,16	101,74
Média intra-dia (n=6)	100,82	100,37	100,33
DPR intra-dia	1,10	0,90	1,20
Média entre dias (n=18)	100,52		
DPR entre dias	1,04		

5.3.1.5 Validade do ensaio

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de três curvas padrão. A análise de regressão linear forneceu a equação da reta $y = 0,0230x - 0,0002$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise estatística dos resultados evidenciou que o método em estudo apresenta linearidade na faixa de 12 a 24 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$).

O método foi considerado exato, uma vez que o percentual médio de recuperação foi de 99,79%. Logo, o método não apresenta erros sistemáticos, que poderiam levar a resultados distantes da concentração verdadeira ou real. Os baixos valores de DPR intra e entre dias indicaram que o método é preciso.

A especificidade do método foi avaliada através da varredura de solução contendo os excipientes, tendo sido constatado que os mesmos não interferem na quantificação do fármaco, no comprimento de onda empregado. Uma vez que os produtos de degradação absorvem intensamente próximo a 255 nm (ver Figura 8) concluiu-se que o método é específico para o fármaco, desde que empregado na análise de amostras íntegras. Este método pode ser usado durante a produção de lotes do medicamento, bem como, nos testes de dissolução, pela simplicidade e rapidez em relação aos demais métodos desenvolvidos. Neste caso, a presença

de impurezas pode ser pesquisada por métodos qualitativos, como CCD (ver item 5.2.2 - CCD na análise de amostras degradadas), ou por CLAE.

5.3.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência

A combinação da CLAE com detecção UV/visível origina métodos exatos, precisos e específicos para análise quantitativa de produtos farmacêuticos e representa o método de escolha na indústria farmacêutica para este propósito (WATSON, 2005). É considerado o método de escolha em estudos de estabilidade, devido à sua alta capacidade de resolução, sensibilidade e especificidade (WATSON, 2005; BAKSHI; SINGH, 2002).

Os métodos descritos para o voriconazol, para sua quantificação em fluidos biológicos, empregam sistema em fase reversa, com detecção no UV (255 nm) e fase móvel com pH 6,0, aproximadamente.

Tanto o solvente para solubilização inicial do voriconazol (metanol) quanto o pH da fase móvel (6,0) foram escolhidos com base nos relatos encontrados em artigos (STOPHER; GAGE, 1997; GAGE; STOPHER, 1998; PEREA *et al.* 2000) tendo em vista as escassas informações sobre o fármaco, na época. Posteriormente, obteve-se a informação de que o pKa do voriconazol é 1,76 (CAPTISOL[®], 2005), confirmando que o fármaco é uma base muito fraca e que no pH da fase móvel utilizada está na forma não ionizada.

Os parâmetros cromatográficos avaliados para determinação das condições analíticas foram: assimetria do pico, número de pratos teóricos e fator de capacidade. Além disso, foi considerado o tempo de corrida e o custo dos reagentes, de modo que foi empregado metanol como solvente orgânico, em função de seu menor custo, se comparado à acetonitrila.

Sendo o voriconazol uma base fraca e pelo fato das colunas testadas não serem desativadas, adicionou-se trietilamina à fase móvel. A amina fica adsorvida aos grupos silanóis livres da coluna, evitando que substâncias de caráter básico interajam com estes grupamentos, e por consequência, diminui a assimetria do

pico do analito (WATSON, 2005). A adição de trietilamina elevou o pH da fase aquosa para aproximadamente 11,0. Uma vez que as colunas empregadas apresentam maior durabilidade na faixa de pH de 2,0 a 8,0 e que o voriconazol é instável em meio alcalino, ajustou-se o pH da fase aquosa para 6,0 antes da mistura com a fase orgânica, com ácido ortofosfórico.

Os primeiros testes foram realizados com coluna C-18 e fases móveis que consistiam em misturas de metanol e solução de trietilamina, em diferentes proporções. No entanto, os fatores cromatográficos não foram satisfatórios, sendo o tempo de corrida muito longo e o pico assimétrico. Substituiu-se a coluna C-18 por C-8, que apresentou tempo de análise e parâmetros cromatográficos adequados.

5.3.2.1 Especificidade

Para ser considerado específico, um método analítico deve demonstrar que é capaz de separar e quantificar o analito de interesse em meio a excipientes e produtos de degradação (ICH, 2005).

A especificidade do método foi determinada pela análise de solução contendo os excipientes e pelos testes de degradação forçada. Para tanto, soluções metanólicas ou o pó de comprimidos foram expostos a condições exageradas dos fatores degradantes.

O detector de arranjo de diodos (DAD) é de particular importância nos estudos de estabilidade e de especificidade de métodos, uma vez que determina a pureza de picos. Em toda a extensão de um pico, vários espectros de UV/visível são adquiridos. A pureza do pico pode ser monitorada pela comparação dos espectros ao longo do mesmo com o espectro de referência, no caso, o espectro do ápice do pico. Quanto mais próximo de 1,0 for o índice de pureza, mais puro é o pico cromatográfico (WATSON, 2005).

Os resultados e as condições analíticas são apresentados na Tabela 6 e na Figura 18 são apresentados os cromatogramas obtidos após a exposição da amostra às condições de degradação.

Tabela 6. Condições e resultados do estudo de degradação forçada realizada com voriconazol como solução metanólica ou como pó de comprimidos triturados.

Condição	Tempo	% VCZ	TR dos produtos de degradação (min)	Pureza do pico VCZ
Meio alcalino (NaOH 0,1 M, 25 °C)	30 min	23,5	2,6; 3,1	1,0000
Meio ácido (HCl 0,1 M, 80 °C)	2 h	88,8	2,6	0,9999
Meio neutro (água, refluxo)	4 h	99,0	2,6; 3,0	0,9999
Meio oxidante (KMnO ₄ 5%, 25 °C)	3 h	83,3	2,5; 3,0; 3,4; 4,6; 7,7	1,0000
Calor (70 °C, pó)	48 h	99,0	Não detectado	1,0000
Calor e umidade (70 °C, 80% UR, pó)	48 h	99,0	Não detectado	1,0000
Umidade (75% UR, 25 °C, pó)	48 h	100,8	Não detectado	1,0000
Luz UV (352 nm, solução)	72 h	99,0	Não detectado	1,0000

VCZ: voriconazol; TR: tempo de retenção.

A análise da Figura 18-1, na qual são apresentados os cromatogramas da solução amostra (1A) e do placebo (1B), indicou que os excipientes dos comprimidos não interferem na quantificação do voriconazol.

Os dados apresentados na Tabela 6 e a análise dos cromatogramas apresentados nas Figuras 18-2 a 18-6 indicaram que a condição mais adversa para o voriconazol foi o meio alcalino, visto que o mesmo é rapidamente degradado, mesmo em temperatura ambiente (Figura 18-2). Em meio ácido (Figura 18-3) e meio neutro (Figura 18-4) também ocorre degradação, sendo necessário, no entanto, aquecimento.

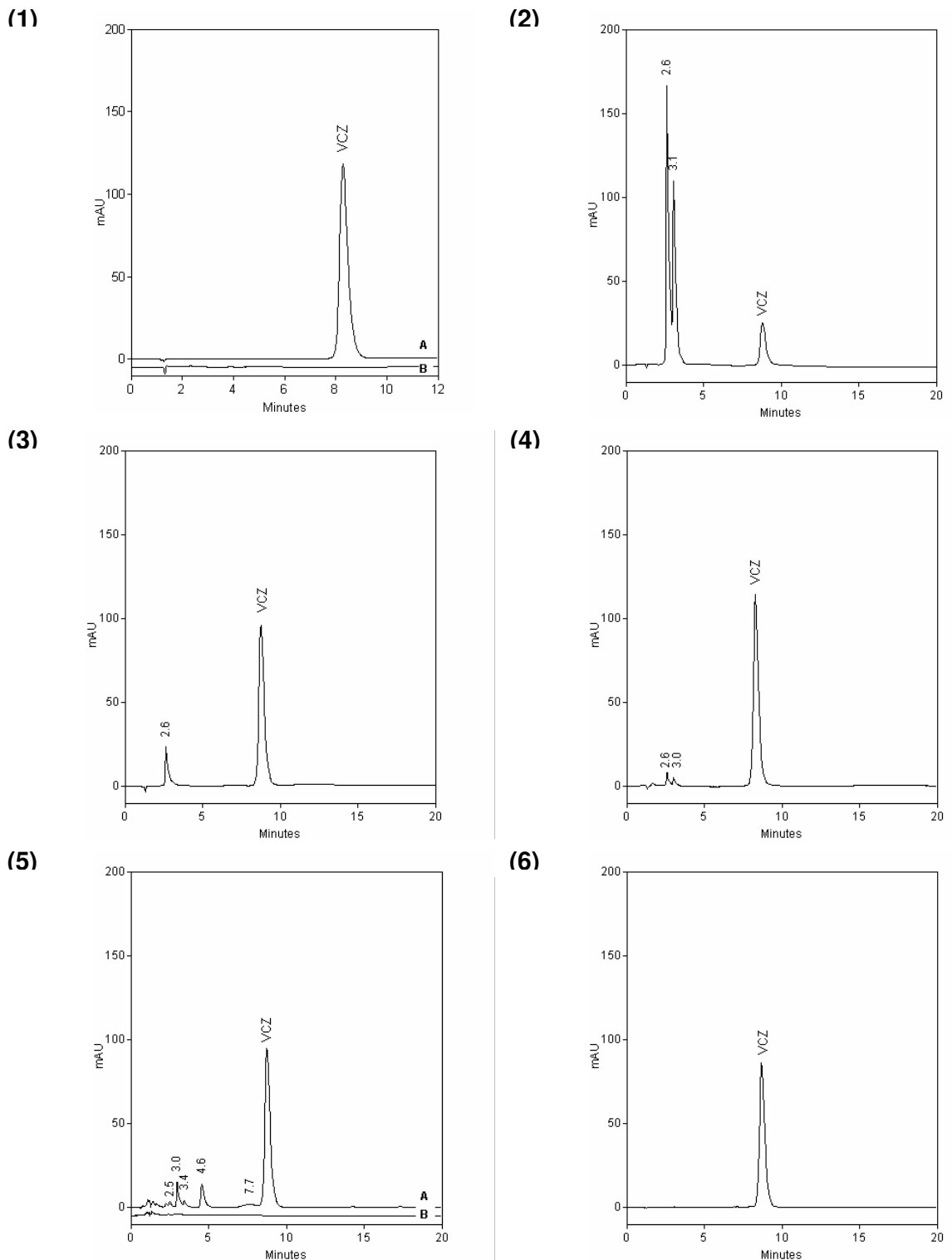


Figura 18. Cromatogramas da solução metanólica de comprimidos de voriconazol (VCZ): (1A) solução 100 µg/ml; (1B) solução placebo; (2) degradação em meio alcalino (30 minutos); (3) degradação em meio ácido (2 h); (4) degradação em meio neutro (4h) (5A) degradação em meio oxidante-amostra; (5B) branco da reação de oxidação (3h); (6) após exposição à luz UV-A (72 h). Condições: detecção em 255 nm, coluna C-8 (Merck), fase móvel metanol: solução de trietilamina 0,6%, pH 6,0 (1:1).

O agente oxidante mais comumente empregado nos estudos de degradação forçada é o peróxido de hidrogênio. Deste modo, submeteu-se solução do fármaco à ação de peróxido de hidrogênio 30% por 4 horas, a 60 °C. Não foram observados picos adicionais no cromatograma e o teor de voriconazol aproximou-se de 100%. Buscou-se a oxidação com permanganato de potássio 5%, sendo que nesta condição foram visualizados vários picos de produtos de degradação e teor remanescente de aproximadamente 83% (Figura 18-5). Este resultado não era esperado, pelo fato do fármaco ser um álcool terciário. Foram observados dois picos com tempos de retenção semelhantes aos observados na hidrólise em meio neutro, em condições de tempo e temperatura semelhantes, porém com menor degradação (1%). Poderá ter ocorrido uma reação de hidrólise, favorecida pelos compostos gerados na reação. A oxidação do fármaco também é relatada em dossiês emitidos pelo laboratório produtor (EMEA, 2005).

A exposição do fármaco em solução, à luz UV-A, induziu a um leve decréscimo do teor, mas não foram observados picos adicionais no cromatograma (Figura 18-6).

O pó de comprimidos triturados, exposto ao calor e à umidade, mostrou-se estável nas condições estudadas: o teor manteve-se próximo a 100% e não foram observados picos extras nos cromatogramas (cromatogramas não apresentados).

Os cromatogramas apresentados permitiram verificar que o pico do voriconazol ficou bem resolvido dos demais. A análise da pureza total dos picos do voriconazol, realizada pelo detector de arranjo de diodos foi igual ou superior a 0,99 (Tabela 6), indicando que não há outros compostos coeluinte com o fármaco. O conjunto de resultados apresentado permitiu inferir a especificidade do método desenvolvido. Observou-se, ainda, que os produtos de degradação do voriconazol são mais polares que o mesmo.

5.3.2.2 Linearidade

O estudo da linearidade do método foi realizado na faixa de 20 a 100 µg/ml, faixa que corresponde a 40 a 200 % da concentração usual de análise, a partir da análise de 3 curvas padrão. Na Tabela 7 são apresentados os valores das áreas observados para soluções da SQR do voriconazol.

Tabela 7. Áreas absolutas das curvas padrão de voriconazol, obtidas através de CLAE, realizadas em três dias.

Concentração (µg/ml)	Área absoluta *	Área absoluta média	DPR
20	544430	543426	1,31
	549474		
	536375		
30	824184	823938	2,01
	840414		
	807216		
40	1099803	1095579	1,02
	1104036		
	1082897		
50	1367726	1386776	1,31
	1403830		
	1388773		
60	1667331	1672745	0,39
	1680106		
	1670798		
80	2209508	2197555	1,36
	2219546		
	2163610		
100	2761937	2750048	1,22
	2776044		
	2712164		

*: cada valor representa a média de três injeções, sendo o DPR entre injeções $\leq 2\%$.

A partir das áreas absolutas médias foi construída curva padrão, que originou a equação da reta, estabelecida através do estudo de regressão linear pelo método dos quadrados mínimos, bem como, o coeficiente de regressão, representados na Figura 19.

A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a curva padrão foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), cujo resultado é apresentado na Tabela 25, do Anexo 1. A ANOVA indicou que a regressão foi significativa e não houve desvio de linearidade ($p < 0,05$).

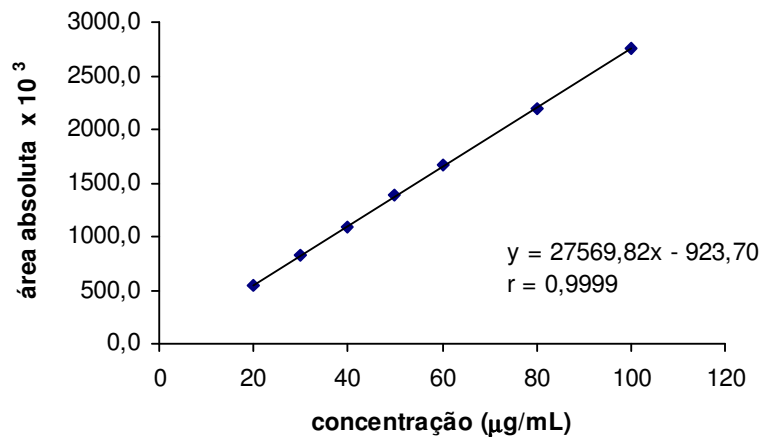


Figura 19. Representação gráfica da curva padrão de voriconazol, método por CLAE, nas concentrações de 20 a 100 µg/ml. Condições: detecção em 255 nm, coluna C-8 (Merck), fase móvel metanol: solução de trietilamina 0,6%, pH 6,0 (1:1).

5.3.2.3 Exatidão

A exatidão do método por CLAE foi avaliada através do teste de recuperação, cujos resultados podem ser observados na Tabela 8. O percentual médio de recuperação de 100,4%.

Tabela 8. Exatidão do método por CLAE, determinada pelo percentual de recuperação de SQR adicionada a soluções dos comprimidos de voriconazol.

Amostra	Nível (%)	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)	Recuperação (%)
R1	70	15,00	15,078	100,52
			15,082	100,55
			15,086	100,57
R2	100	30,00	30,555	101,85
			29,529	98,43
			30,156	100,52
R3	130	45,00	46,008	102,24
			44,190	98,20
			45,319	100,71
Recuperação média (%)				100,40
DPR				1,3

R1, R2, R3: amostras acrescidas de SQR.

5.3.2.4 Precisão

A precisão do método por CLAE foi determinada pelo estudo da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão entre dias), a partir de múltiplas análises do mesmo lote de comprimidos. A precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (DPR) de um conjunto de resultados. Os valores de DPR foram de no máximo 1,0% e o teor de voriconazol nos comprimidos foi de 100,0% (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados experimentais da precisão intra-dia e entre dias do método por CLAE, aplicado a comprimidos de voriconazol.

Amostra	% do teor declarado		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	98,37	98,74	100,10
2	98,81	98,81	100,18
3	99,01	98,97	100,72
4	99,78	99,82	100,97
5	100,15	100,04	101,02
6	100,89	101,44	101,37
Média intra-dia	99,50	99,64	100,73
DPR intra-dia	0,94	1,04	0,50
Média entre dias (n=18)	100,0		
DPR entre dias	1,0		

Na Figura 20 são apresentados os cromatogramas obtidos nas análises dos comprimidos.

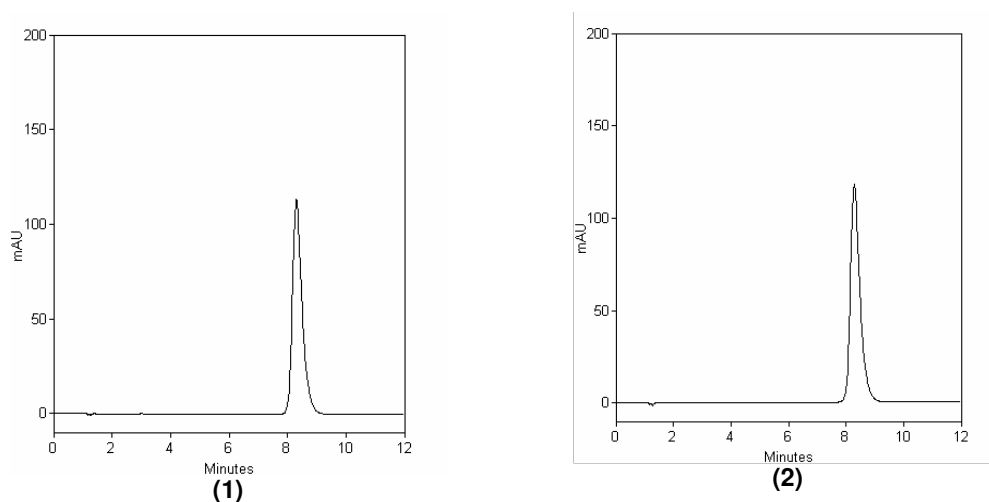


Figura 20. Cromatogramas da SQR de voriconazol (1) e de comprimidos de voriconazol, 100 µg/ml (2). Condições: detecção em 255 nm, coluna C-8 (Merck), fase móvel metanol: solução de trietilamina 0,6%, pH 6,0 (1:1).

5.3.2.5 Robustez

O estudo da robustez do método visa a demonstrar a confiabilidade da análise quando o método é submetido a pequenas variações e deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do mesmo. Se a quantificação do analito é susceptível a pequenas variações analíticas, estas devem ser cuidadosamente controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento de análise. No caso da CLAE, as variações recomendadas são: influência do pH da fase móvel, influência de variações na composição da fase móvel, diferentes colunas (lotes e fornecedores), temperatura e fluxo (ICH, 2005; BRASIL, 2003b).

A robustez do método por CLAE foi determinada através de variações na composição da fase móvel (pH e percentual de fase orgânica) e pelo estudo da estabilidade de soluções estoque da SQR e de soluções de trabalho das amostras. No primeiro caso, foi observado se ocorriam modificações nos parâmetros cromatográficos, bem como, se o teor de amostras avaliadas em cada condição sofria alterações. No segundo caso, o teor das soluções foi avaliado periodicamente, a fim de estabelecer a validade das mesmas. Na Tabela 10 são apresentados os resultados decorrentes das variações na fase móvel.

Tabela 10. Resultados do estudo de robustez do método por CLAE aplicado a comprimidos de voriconazol.

Variações	TR	Assimetria	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Teor (%)/DPR ^d
Fase móvel original ^a	8,5	1,44	2725	5,5	101,3 / 0,1
Proporção de metanol: 47% ^b	11,3	1,31	3098	7,7	101,5 / 0,4
Proporção de metanol: 53% ^b	6,4	1,64	2728	4,3	101,7 / 0,2
pH da fase aquosa: 5,0 ^c	8,6	1,45	3042	5,6	100,9 / 0,2
pH da fase aquosa: 7,0 ^c	8,4	1,45	3048	4,4	100,5 / 0,7

^a: metanol:solução de trietilamina 0,6 %, pH 6,0 (50:50, V/V).

^b: pH da fase móvel = 6,0.

^c: proporção da fase orgânica e fase aquosa: 50:50, V/V.

^d: n = 2.

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

A mudança de uma unidade de pH em torno do pH original (6,0) não teve impacto sobre as características do método, bem como, não originou a presença de picos extras. Isto indica que, na faixa de pH de 5,0 a 7,0 o voriconazol encontra-se na sua forma não-ionizada, o que está de acordo com seu pKa, de 1,76 (CAPTISOL[®], 2005).

As maiores alterações observadas foram nos tempos de retenção. A fase móvel contendo 47% de metanol determinou um tempo de eluição maior para o analito. A fase móvel contendo 53% de metanol pode prejudicar a resolução entre o voriconazol e os produtos de degradação, se estiverem presentes, os quais, por serem mais polares, apresentam tempos de retenção menores do que o voriconazol.

Em relação à estabilidade das soluções estoque da SQR (500 µg/ml), constatou-se que, sob refrigeração (4-7 °C), as mesmas permaneceram estáveis por um período de, no mínimo, 58 dias. O teor obtido ao término deste período foi de 100,9% (DPR 0,35%) e não foram evidenciados picos secundários (cromatogramas não apresentados).

Em relação à estabilidade das soluções de trabalho, verificou-se que as mesmas mantiveram-se estáveis, mesmo expostas à luz natural, por, no mínimo, três dias, visto que as variações entre as áreas foram mínimas (Tabela 11). Esta informação é importante, uma vez que muitos laboratórios dispõem cromatógrafos com injetores automáticos e a amostra pode ficar em solução por várias horas no ambiente laboratorial, até o término da análise.

Tabela 11. Estabilidade das soluções de trabalho (50 µg/ml), mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo ou expostas à iluminação natural.

Soluções	Tempo (dias)			
	0	1	2	3
Expostas à luz				
Área ^a	1376777	1387739	1389361	1393035
DPR entre áreas	0,19			
Ao abrigo da luz				
Área ^a	1367613	1372404	1366275	1376522
DPR entre áreas	0,38			

^a: cada valor corresponde à média de três injeções, sendo o DPR entre injeções ≤ 2%.

5.3.2.6 Validade do ensaio

O método desenvolvido foi específico, uma vez que permitiu quantificar o voriconazol mesmo em presença de produtos de degradação e excipientes, o que foi indicado pela pureza do pico do fármaco. Neste aspecto, o detector de arranjo de diodos foi de fundamental importância, pois permitiu verificar se compostos de polaridade semelhante, como produtos de degradação, não estariam coeluinto com o fármaco.

A análise de regressão linear forneceu a equação da reta $y = 27569,82x - 923,70$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise estatística (ANOVA) dos dados das curvas padrão indicou que o método é linear na faixa de 20 a 100 µg/ml.

O método mostrou-se exato e preciso, uma vez que seu percentual de recuperação médio foi de 100,40% e os valores de DPR foram de aproximadamente 1,0%. As condições adotadas propiciaram análise com duração adequada (12 minutos), sendo 8,5 minutos o tempo de retenção do voriconazol.

Em relação à robustez do método, as alterações no pH e no percentual orgânico da fase móvel não provocaram alterações importantes no teor obtido pelo método. Pode-se afirmar que o pH da fase móvel não é fator crítico para o desenvolvimento do método, uma vez que não foram observadas alterações importantes na faixa de 5,0 a 7,0 unidades de pH. No entanto, pequenas alterações no percentual de fase orgânica provocaram mudanças importantes no tempo de retenção do fármaco, o que pode prejudicar a especificidade do método, se produtos de degradação estiverem presentes. Os resultados da validação deste método foram publicados (ADAMS; BERGOLD, 2005) (Anexo 6).

5.3.3 Ensaio microbiológico

No ensaio microbiológico, a potência de um antifúngico é estimada pela comparação da inibição do crescimento de um microrganismo sensível, provocada pela amostra e por uma substância de referência. A amostra deve ser diluída à mesma potência presumida que as soluções padrão (PINTO *et al.*, 2001).

De acordo com a USP 29 (2006), na maioria das vezes o ensaio microbiológico prevalece como método de referência quando há dúvidas a respeito da perda de atividade. Embora os métodos microbiológicos envolvam muitas etapas e o número de réplicas deva ser maior em virtude do erro intrínseco do método, resultando em maior tempo de análise, eles podem indicar mudanças ou características sutis, não demonstráveis pelos métodos químicos (USP 29, 2006). Este ensaio ainda tem como vantagens o emprego de equipamentos simples e o uso de solventes aquosos, o que reduz a geração de resíduos químicos.

Foi desenvolvido para o voriconazol o ensaio 3x3, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1988) e na Farmacopéia Européia (Ph. Eur., 2002). Neste delineamento, em cada placa de Petri são dispostas três concentrações da SQR e três concentrações da amostra.

Previamente à validação do ensaio microbiológico, fez-se necessário o estudo das condições analíticas para seu desenvolvimento. Os testes foram iniciados pela definição dos microrganismos teste. Por tratar-se de um antifúngico, optou-se pelo emprego de cepas padrão de *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae*, sendo que o último forneceu crescimento mais homogêneo e halos de melhor visualização do que os produzidos com culturas de *Candida albicans*.

Para definição da concentração das soluções, partiu-se de método descrito na literatura por PEREA e colaboradores (2000), os quais desenvolveram método microbiológico para a determinação do voriconazol em plasma. Estes autores empregaram cepa de *Candida kefyr* ATCC 46764 e a faixa de linearidade do método foi de 0,25 a 20 µg/ml. Assim, foram testadas várias doses próximas a estas, em escala geométrica, objetivando determinar intervalo de doses cujos halos de inibição fossem proporcionais à concentração e com tamanho de aproximadamente 13 a 24 mm (PINTO *et al.*, 2000). As doses de 3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml conduziram à formação de halos de tamanho adequado e foram validadas estatisticamente.

Em relação ao inóculo, foram avaliadas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5%. Observou-se que a concentração de 1,0% produziu halos de fácil leitura e crescimento homogêneo em toda placa. Concentrações inferiores produziram halos com bordas pouco regulares e crescimento de colônias isoladas e a concentração de 1,5% foi excessiva, o que originou halos pequenos.

Visando a reduzir o número de etapas do método, avaliou-se o efeito da camada superfície na visualização dos halos. No sistema monocamada, emprega-se apenas uma camada de meio de cultura, adicionada do inóculo. No sistema bicamada, duas camadas de meio de cultura são sobrepostas: a inferior, constituída apenas por meio de cultura, serve de base para a camada superior (ou *superfície*), que contém o microrganismo disperso. Esta é adicionada à placa somente após a solidificação da camada inferior (ou *camada base*). Observou-se que, no sistema bicamada, houve um contraste maior entre as zonas de crescimento e de inibição, o que gerou halos mais nítidos. Ainda, com duas

camadas os halos de inibição foram menores. Tais observações estão em acordo com relatos da literatura (PINTO *et al.*, 2001).

Usualmente, são depositados 200 µl das soluções em cada cilindro. Observou-se que nesta condição, ao término da incubação, havia restos da solução no interior do cilindro, bem como, havia muita variação nos halos de inibição, o que foi atribuído à difusão variável da solução. Optou-se por reduzir para 100 µl, e nesta condição houve difusão completa das soluções.

Usou-se metanol como diluente inicial da amostra e da SQR, devido à alta solubilidade do fármaco neste solvente. Porém, as diluições subsequentes não devem ser feitas com solventes orgânicos, pois pode haver inibição do crescimento do microrganismo por ação do solvente. Quando as amostras foram diluídas em tampão fosfato pH 5,0 os halos ficaram menos definidos. Não houve diferenças entre o resultado da amostra diluída em pH 6,0 e em pH 7,0. Optou-se pelo tampão fosfato pH 6,0, para não haver tanto contraste com o pH do meio de cultura, que é de 5,6. Deve-se ressaltar que o pH do diluente deve ser compatível com o pH do meio de cultura e com a estabilidade e atividade da substância em análise.

5.3.3.1 Linearidade

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1988) e com a Farmacopéia Européia (Ph. Eur., 2002), para o delineamento escolhido (3x3), as duas retas dose-resposta (padrão e amostra) devem ser paralelas e lineares em toda a faixa de análise. A validade do ensaio é determinada pela análise de variância, específica para este ensaio, e engloba outros fatores além dos rotineiramente avaliados na ANOVA.

Na Tabela 12 são apresentados os valores dos halos de inibição obtidos frente às concentrações de 3,0; 6,0 e 12 µg/ml, para as soluções da SQR e da amostra. A Figura 21 representa placa obtida através do ensaio desenvolvido, com os halos da SQR e dos comprimidos de voriconazol.

A partir da média dos halos de inibição das soluções da SQR, para cada concentração, construiu-se a curva padrão e calculou-se a equação da reta, através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados (Figura 22). A sobreposição das retas da SQR e da amostra ilustra o teor médio encontrado pelo método matemático, que foi próximo a 100%.

Tabela 12. Diâmetro dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico – difusão em ágar, cilindros em placas – de comprimidos de voriconazol.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetro do halo de inibição (mm)*			Diâmetro médio (mm)	DPR
P1	3,0	13,12	13,76	14,06	13,51	2,59
		13,22	13,42	13,47		
P2	6,0	18,23	17,38	17,75	17,73	1,60
		17,61	17,62	17,80		
P3	12,0	22,21	21,24	21,67	21,74	1,73
		21,39	22,06	21,84		
A1	3,0	13,21	13,56	13,89	13,46	1,83
		13,36	13,27	13,47		
A2	6,0	18,45	16,94	17,62	17,67	2,72
		17,65	17,75	17,60		
A3	12,0	22,19	22,31	22,53	22,00	1,81
		21,65	21,53	21,81		

*cada valor representa a média de seis halos de inibição. (P) halos das soluções da SQR; (A) halos das soluções amostra.

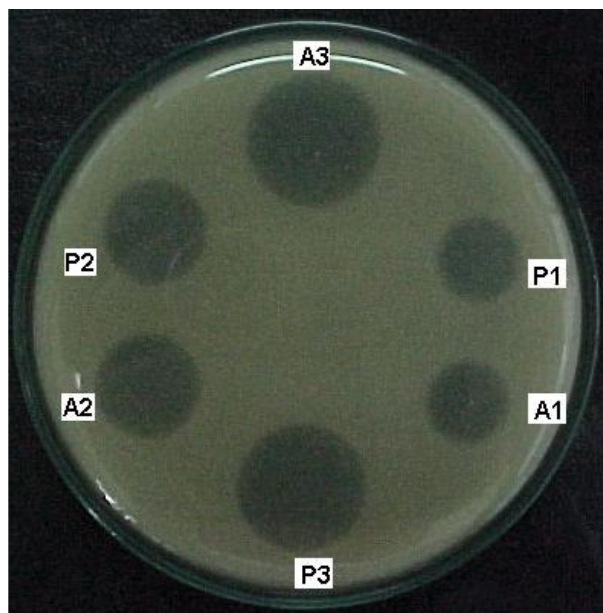


Figura 21. Fotografia de placa obtida através do doseamento microbiológico do voriconazol. P1, P2, P3: voriconazol SQR na concentração de 3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml; A1, A2, A3: comprimidos de voriconazol em concentrações presumidas de 3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml, respectivamente. Condições: método de difusão em ágar – cilindros em placas, *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 como microrganismo teste, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, incubação a 30 ± 1°C/24 horas.

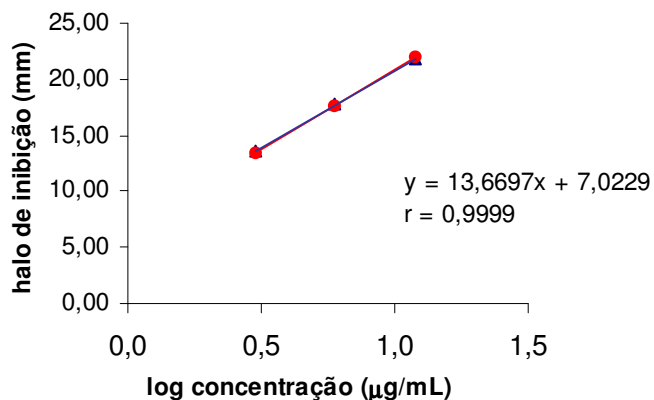


Figura 22. Representação gráfica das curvas de voriconazol, para SQR e amostra, pelo ensaio microbiológico, difusão em ágar – cilindros em placas

A validade do ensaio microbiológico foi avaliada pela análise de variância (Tabela 26 – Anexo 1), conforme preconizado pela FARMACOPÉIA (1988).

5.3.3.2 Exatidão

Na Tabela 13 são apresentados os resultados do teste de recuperação, os quais demonstram a exatidão do ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos, visto que o percentual médio de recuperação foi de 100,92%. É possível observar ainda a grande sensibilidade deste método, visto que pequenas variações na concentração do fármaco (na ordem de 1 µg/ml) já produzem variações no halo de inibição.

Na Figura 23 é apresentada fotografia de uma placa, obtida no teste de recuperação. Conforme descrito na seção material e métodos, cada placa conteve todas as soluções em análise, de modo que cada placa foi uma réplica.

Tabela 13. Recuperação da SQR de voriconazol adicionada a amostras de comprimidos de voriconazol, pelo ensaio microbiológico.

Amostra	Nível (%)	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)	Recuperação (%) [*]
R1	70	1,2	1,2059	100,49
			1,1414	95,12
			1,2106	100,88
R2	100	3,0	3,0846	103,56
			3,1485	104,95
			2,9522	98,40
R3	130	4,8	4,8692	101,44
			4,8824	101,72
			4,8806	101,68
			Recuperação média (%)	100,92
			DPR	2,82

R1, R2, R3: amostras acrescidas de SQR; ^{*} cada valor é média de oito placas.

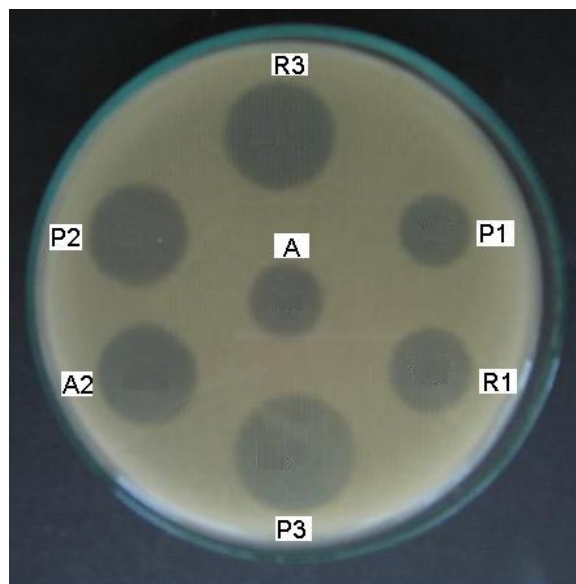


Figura 23. Fotografia dos halos inibição obtidos no teste de recuperação do ensaio microbiológico do voriconazol. P1-3: solução da SQR (3,0; 6,0 e 12,0 µg/ml); A: amostra (3,0 µg/ml); R1-3: amostra adicionada de SQR (4,2; 6,0; 7,8 µg/ml). Condições: método de difusão em ágar – cilindros em placas, *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 como microrganismo teste, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, incubação a 30 ± 1 °C/24 horas.

5.3.3.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelo ensaio de duas amostras independentes por dia, em 3 dias diferentes (6 placas/ensaio), cujos resultados constam na Tabela 14. A maior dispersão dos resultados em relação aos métodos físico-químicos era esperada, devido à variação intrínseca do método.

Tabela 14. Resultados experimentais obtidos para o doseamento de comprimidos de voriconazol, pelo ensaio microbiológico.

Amostra	Potência (%) [*]		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	101,54	102,47	103,14
2	102,50	97,07	98,78
Média intra-dia	102,02	99,77	100,96
DPR intra-dia	0,66	3,83	3,05
Média entre dias (n=6)	100,9		
DPR entre dias	2,4		

^{*}: cada valor é média de seis placas.

5.3.3.4 Validade do ensaio

O método microbiológico de difusão em ágar tem por finalidade a avaliação da potência de antimicrobianos através do halo de inibição formado pela difusão da solução do fármaco em meio inoculado com microrganismo sensível à substância em análise.

Diversos planejamentos são possíveis para os ensaios de difusão em ágar. A USP 29 (2006) preconiza o planejamento 5x1, onde são utilizadas cinco concentrações para o padrão e uma para a amostra. Foi empregado o planejamento 3x3, descrito na FARMACOPÉIA (1988), que emprega três concentrações para o padrão e três para a amostra.

Os resultados da ANOVA indicaram que o método é linear na faixa de 3 a 12 µg/ml, já que foi obtida *regressão linear* significativa, bem como, não houve diferença estatisticamente significativa nos itens *desvio de paralelismo* e *quadrático* (FARMACOPÉIA, 1988). Obteve-se a equação da reta $y = 13,6697x + 7,0229$ e coeficiente de correlação de 0,9999.

O ensaio desenvolvido foi preciso, tendo em vista os valores de DPR intra e entre dias serem inferiores ao valor máximo permitido (5%, BRASIL, 2003b) e exato, visto que seu percentual de recuperação foi de 100,92%.

Os resultados demonstraram que o ensaio microbiológico constitui-se em método alternativo para a determinação quantitativa do voriconazol em comprimidos. Os resultados deste método, comparados aos do método espectrofotométrico, foram publicados (ADAMS *et al.*, 2006) (Anexo 6).

5.3.4 Análise comparativa dos métodos

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para quantificação do voriconazol em comprimidos, realizou-se análise estatística (ANOVA) dos resultados obtidos nos diferentes métodos. Os resultados das determinações do teor de voriconazol em comprimidos através da

espectrofotometria no UV, da CLAE e do ensaio microbiológico são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Teores percentuais obtidos no doseamento de comprimidos de voriconazol, através da CLAE, da espectrofotometria no UV e do ensaio microbiológico.

	CLAE	UV	Ensaio microbiológico
Média (%)	99,9	100,5	100,9
DPR (%)	0,94	1,04	3,31
n	18	18	6

A análise estatística dos valores experimentais obtidos no doseamento do voriconazol, realizada através da análise de variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 27, do Anexo 1. Foi observado que não há evidências de diferença significativa entre os três métodos desenvolvidos, visto que o valor de “F” calculado (1,8430) foi inferior ao “F” crítico (3,2381), com nível de confiança de 95%. Os métodos desenvolvidos, portanto, são intercambiáveis.

É importante ressaltar que existem diferenças inerentes aos próprios métodos. Sendo assim, o método de espectrofotometria no UV é um método simples, rápido, de baixo custo. Porém, se mostrou inespecífico quando empregado na análise de amostras degradadas (item 5.1.3). O método por CLAE exige equipamento e solventes mais caros, maior treinamento, manutenções freqüentes, porém tem como vantagem sua especificidade. O ensaio microbiológico tem como vantagens o baixo investimento na aquisição de reagentes e equipamentos; porém, o número de etapas e o tempo de análise são desvantagens. Sua grande vantagem consiste em determinar a atividade do fármaco, através da inibição do crescimento do microrganismo estudado, o que confere especificidade e possibilidade de emprego na análise de amostras degradadas (ver item 5.6).

5.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação em permanecer com suas características

químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Os estudos de estabilidade constituem parte do programa de desenvolvimento de fármacos e representam uma das mais importantes áreas no registro de produtos farmacêuticos. Os resultados destes testes podem influenciar as especificações, os limites e os métodos de análise para o fármaco (SIMON *et al.*, 2004). Os mesmos visam a fornecer dados sobre como a qualidade de um fármaco ou de um produto varia sob influência de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, a fim de estabelecer um período de reteste para a substância ativa ou o prazo de validade para o produto acabado, bem como estabelecer condições de estocagem (ICH, 2003).

De um modo geral, a instabilidade de um produto pode afetar a eficácia, a segurança ou a aceitabilidade de um produto pelo paciente. Em termos de eficácia, o efeito mais evidente é a perda da potência do fármaco. Embora existam exceções, considera-se 90% do valor declarado como a potência ou teor mínimo aceitável. Para alguns produtos, cujos produtos de degradação são tóxicos, mais importante do que a perda da potência é o acúmulo destes. Um exemplo são os fármacos de estrutura protéica, nos quais pequenas mudanças estruturais podem causar um grande impacto na imunogenicidade (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Vários fatores podem afetar a estabilidade de um produto, incluindo a estabilidade da substância ativa, potencial de interações entre os componentes presentes na formulação, fatores ambientais (temperatura, radiações, umidade, gases atmosféricos) pH, contaminação bacteriana, processo de produção, forma farmacêutica, embalagem, condições ambientais durante o transporte e o armazenamento do produto, tempo entre a produção e o uso pelo consumidor (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999). De todos os fatores ambientais envolvidos na degradação de fármacos, a temperatura é o mais importante e não pode ser controlada pela escolha da embalagem (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

A ICH determina a realização dos seguintes estudos, para substâncias ativas e medicamentos, a fim de determinar o prazo de validade de fármacos e formas farmacêuticas (ICH, 2003):

✓ *Estabilidade de longa duração:* as amostras são mantidas nas condições previstas de estocagem (temperatura e umidade), pelo tempo proposto como prazo de validade do produto. Visam a estabelecer o período de reteste ou o prazo de validade do produto ou fármaco. Os medicamentos devem estar contidos na embalagem prevista para dispensação.

✓ *Estabilidade acelerada:* são empregadas condições mais drásticas de temperatura e umidade, com o objetivo de aumentar a velocidade de degradação química ou mudanças físicas de fármacos e medicamentos. Visam a prever o efeito de pequenos desvios nas condições ideais de armazenamento, que poderão ocorrer durante o transporte. Os medicamentos devem estar contidos na embalagem prevista para dispensação.

✓ *Testes de degradação forçada:* usados para estabelecer a estabilidade intrínseca do fármaco. São realizados em condições mais severas do que as usadas no estudo de estabilidade acelerada. Podem indicar os prováveis produtos de degradação, bem como validar o uso de um método analítico para análise de amostras degradadas. Consistem em submeter o produto a condições drásticas de temperatura, umidade, oxidação, e ampla faixa de pH. Os estudos de fotoestabilidade estão incluídos nos testes de degradação forçada e consistem em testes de degradação forçada e testes confirmatórios.

No Quadro 9 são apresentadas as condições experimentais estabelecidas pela ICH para estudos de estabilidade. A legislação brasileira (BRASIL, 2005) emprega temperatura de 30 ± 2 °C para o teste de longa duração e 40 ± 2 °C para o teste de estabilidade acelerada, Porém, recomenda o emprego de atmosfera com umidade apenas em se tratando de embalagens semipermeáveis (75 ± 5 % UR).

Quadro 9. Condições experimentais para realização de estudos de estabilidade de fármacos e formulações que não necessitam de refrigeração (ICH, 2003).

Estudo	Condições de estocagem	Tempo de realização
Longa duração	25 ± 2 °C / 60 ± 5 % UR ou 30 ± 2 °C / 65 ± 5 % UR	12 meses
Intermediário	30 ± 2 °C / 65 ± 5 % UR	6 meses
Acelerado	40 ± 2 °C / 75 ± 5 % UR	6 meses

Há ainda, condições especiais para produtos que devem ser estocados sob refrigeração ou em freezer (ICH, 2003; BRASIL, 2005).

Uma vez que o prazo de validade das preparações farmacêuticas empregadas já foi estabelecido pelo laboratório produtor, neste trabalho realizaram-se testes de degradação forçada, visando a estabelecer a estabilidade intrínseca do voriconazol. Parte dos testes foi realizada durante o estudo de validação do método por CLAE (estabilidade química), cujos resultados foram apresentados no item 5.3.2.1.

Em relação à estabilidade das formulações do voriconazol, foi avaliada a estabilidade da formulação injetável após reconstituição e após diluição em diluentes recomendados pelo laboratório produtor, bem como a estabilidade dos comprimidos frente à radiação.

O método analítico escolhido para a análise dos produtos submetidos à degradação deve ser sensível para detectar pequenas modificações na concentração do fármaco, bem como seletivo, para possibilitar a separação entre os produtos de degradação e o fármaco (ICH, 2003). Para tanto, empregou-se o método por CLAE previamente validado, o qual demonstrou atender as exigências acima descritas (ADAMS; BERGOLD, 2005).

5.4.1 Estabilidade fotoquímica

O fato de um fármaco absorver radiação na região ultravioleta ou visível do espectro eletromagnético significa que pode absorver energia suficiente para quebrar uma ligação na molécula. Deste modo, a propriedade de absorção é a

primeira indicação de que o fármaco é capaz de participar de um processo fotoquímico que pode levar à sua decomposição ou à decomposição de outros componentes da formulação (TØNESSEN, 2004).

A avaliação da fotoestabilidade, prevista nos estudos de degradação forçada (ICH, 2003), consiste em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios (ICH, 1996).

O teste de degradação forçada envolve o fármaco isolado ou em suspensão/solução, disposto em recipientes transparentes e quimicamente inertes (ICH, 1996). Soluções do fármaco são mais susceptíveis e particularmente relevantes na compreensão do comportamento do produto em solução. Podem ser usadas várias condições de exposição, que dependerão da fotossensibilidade da substância e da intensidade das fontes de radiação empregadas (MATTHEWS, 1999; TØNESSEN, 2004). Se nos estudos de degradação forçada não forem observados produtos de degradação, não são necessários estudos confirmatórios (ICH, 1996).

Os estudos confirmatórios são, normalmente, realizados de modo seqüencial, iniciando-se pelo produto totalmente exposto, o produto protegido pela embalagem primária e então pela embalagem secundária. O teste deve ser conduzido até que os resultados demonstrem que o produto esteja adequadamente protegido da luz (TØNESSEN, 2004; ICH, 1996).

Neste trabalho realizou-se o estudo de degradação forçada, com a amostra em solução e em estado sólido. Quando em solução, as amostras foram acondicionadas em cubetas, transparentes à radiação empregada. Em estado sólido, seguiu-se a recomendação da ICH (1996), que preconiza a dispersão da substância ativa sobre material inerte, em camadas finas. Foram empregadas duas fontes de radiação: luz UV-C (254 nm) e luz UV-A (352 nm).

5.4.1.1 Estabilidade à luz UV-C (254 nm)

Após 3 dias de exposição à luz UV-C, observou-se que houve modificação na cor do fármaco de branco para amarelado e queda acentuada no teor (Tabela 16). A temperatura no interior da câmara manteve-se entre 25-30 °C durante os 14 dias.

Tabela 16. Teores percentuais de voriconazol em estado sólido, após exposição à lâmpada UV-C, obtidos através de CLAE.

	Tempo (dias)			
	3	7	10	14
Teor (%)	83,85	76,51	74,68	70,31
DPR	0,40	3,03	0,17	2,38
n	3	3	3	3

A Figura 24-A apresenta o cromatograma do voriconazol após exposição à luz UV-C em estado sólido, por 14 dias. Além da queda no teor, foi possível observar a formação de vários produtos de degradação. Os teores determinados nas *amostras controle* (exposição simultânea, porém ao abrigo da luz) variaram entre 98,79 a 99,99% (3º e 14º dia, respectivamente), indicando que o efeito relatado deve-se exclusivamente à radiação.

O voriconazol, em solução metanólica, é rapidamente degradado. Logo, as coletas para análise foram feitas em intervalos de tempo menores. Após 1 hora de exposição, o teor encontrado foi de 62,2%. Houve a formação de outros produtos de degradação além dos observados em estado sólido (Figura 24-B).

A fim de verificar se o revestimento dos comprimidos protege o fármaco da luz, expôs-se um comprimido à lâmpada UV-C por 14 dias. Diariamente, a face voltada para a fonte luminosa era invertida, de modo que todas as superfícies fossem irradiadas. Simultaneamente, submeteu-se outro comprimido às mesmas condições, porém protegido da luz. Após 14 dias de exposição, o teor encontrado foi de 100,3% (Figura 24-C) e não foram evidenciados produtos de degradação. Considerando que o teor do fármaco em estado sólido, com o mesmo tempo de exposição, apresentou teor de 70,3%, o revestimento parece conferir proteção à radiação UV-C, ainda que a área superficial do pó seja maior.

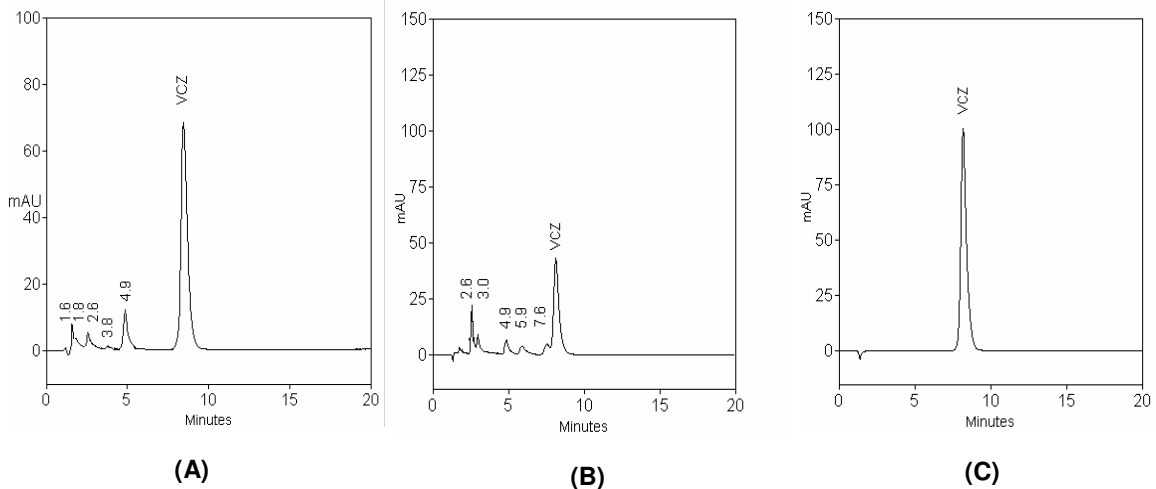


Figura 24. Cromatogramas do voriconazol exposto à luz UV-C. (A) Voriconazol em estado sólido, 14 dias. (B) Voriconazol em solução metanólica, 1 hora. (C) Comprimido íntegro, 14 dias. Condições: detecção em 255 nm, coluna de fase reversa C-8 Merck, fase móvel metanol:solução de trietilamina 0,6% pH 6,0 (1:1), fluxo 1ml/minuto.

5.4.1.2 Estabilidade à luz UV-A (352 nm)

Em estado sólido, após 14 dias de exposição, o teor de voriconazol na amostra foi de 96,9% (Tabela 17). Não foram evidenciadas alterações na cor do fármaco nem picos extras no cromatograma (Figura 25-A). A temperatura no interior da câmara manteve-se entre 25 a 30 °C durante os 14 dias.

Tabela 17. Teores percentuais de voriconazol em estado sólido e em solução, após exposição à lâmpada UV-A, obtidos através de CLAE.

	Tempo (dias)			
	3	7	10	14
Estado sólido				
Teor (%)	99,01	97,86	97,01	96,86
DPR	0,42	0,76	0,79	0,34
Em solução				
Teor (%)	99,04	98,32	93,01	93,47
DPR	1,25	0,72	0,70	2,88

n = 3 por dia.

A degradação do voriconazol em solução foi superior à amostra em estado sólido. Após 14 dias de exposição, o teor das soluções foi de 93,47% (Tabela 17, valores calculados considerando-se como 100% o teor nas amostras controle). Foram observados três picos de degradação principais, em 2,6; 3,0 e

6,1 minutos (o pico em 1,4 minutos se deve ao solvente) (Figura 25-B). Nas amostras controle observou-se decréscimo no teor de voriconazol, bem como, picos extras com tempo de retenção de 2,6 e 3,0 minutos. O teor nestas soluções variou entre 97,0 a 94,9% (3^o dia ao 14^o dia, respectivamente). Logo, apesar da temperatura na câmara ter permanecido inferior a 30 °C durante todo o experimento, sugere-se que a degradação ocorrida deva-se também à ação da mesma.

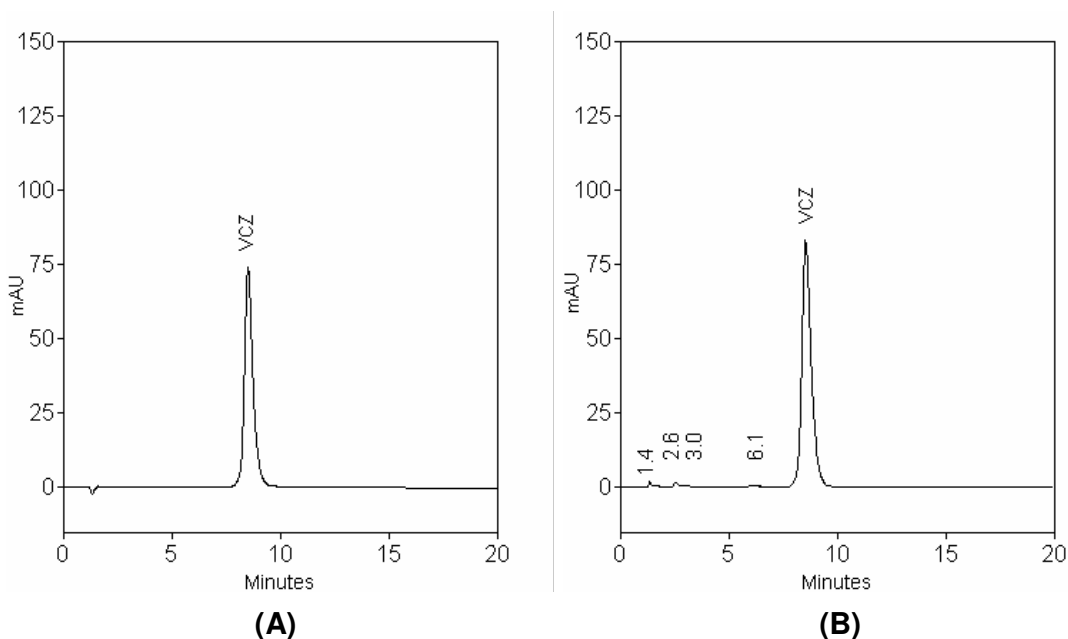


Figura 25. Cromatogramas do voriconazol exposto à luz UV-A, por 14 dias. (A) Voriconazol em estado sólido. (B) Solução metanólica. Condições: detecção em 255 nm, coluna de fase reversa C-8 Merck, fase móvel metanol:solução de trietilamina 0,6% pH 6,0 (1:1), fluxo 1ml/minuto, volume de injeção 20 µl.

A Figura 26 apresenta um comparativo dos teores do voriconazol frente à luz UV-A e UV-C. Os resultados das soluções expostas à luz UV-C não são apresentados, pois devido à degradação intensa, as mesmas foram avaliadas por no máximo 1 hora.

Concluiu-se que o fármaco foi mais instável em solução do que em estado sólido e que o fármaco é mais sensível à radiação UV-C, o que era esperado, pois esta radiação, além de mais energética, coincide com o máximo de absorção do voriconazol (255 nm). Constatou-se, através dos cromatogramas apresentados

nas Figuras 24 e 25, que os produtos de degradação formados diferem, em parte, de uma radiação para outra.

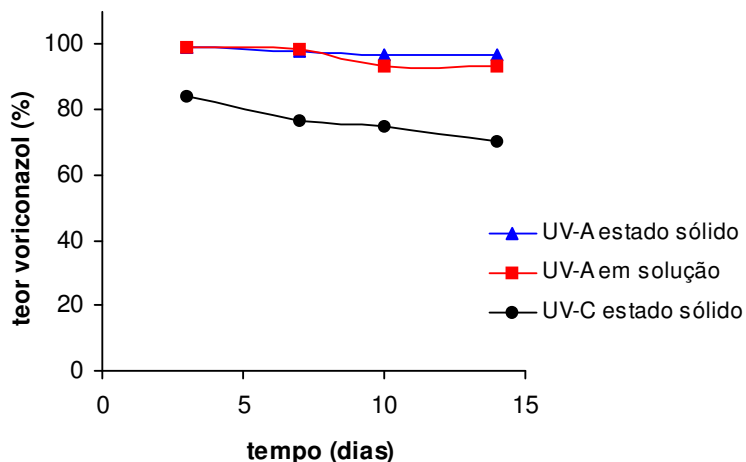


Figura 26. Teor de voriconazol em soluções e em estado sólido, após exposição à radiação UV-A e UV-C, determinado por CLAE.

5.4.2 Estabilidade térmica

De todos os fatores ambientais envolvidos na degradação de fármacos, a temperatura é o mais importante e não pode ser controlada pela escolha da embalagem (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Empregou-se temperatura de 60 °C, na tentativa de verificar a estabilidade do voriconazol a desvios nas condições usuais de estocagem e distribuição. O voriconazol, em estado sólido, nestas condições, mostrou-se estável por período de, no mínimo, 50 dias, que foi o prazo máximo avaliado. Os teores obtidos são apresentados na Tabela 18 e o cromatograma da amostra aos 50 dias na Figura 27-A.

Tabela 18. Teor percentual de voriconazol no pó de comprimidos triturados, mantido a 60 °C, determinado através de CLAE.

	Tempo (dias)				
	10	20	30	40	50
Teor (%)	101,2	100,5	101,2	100,6	101,2
DPR	0,25	1,1	1,9	1,6	0,6

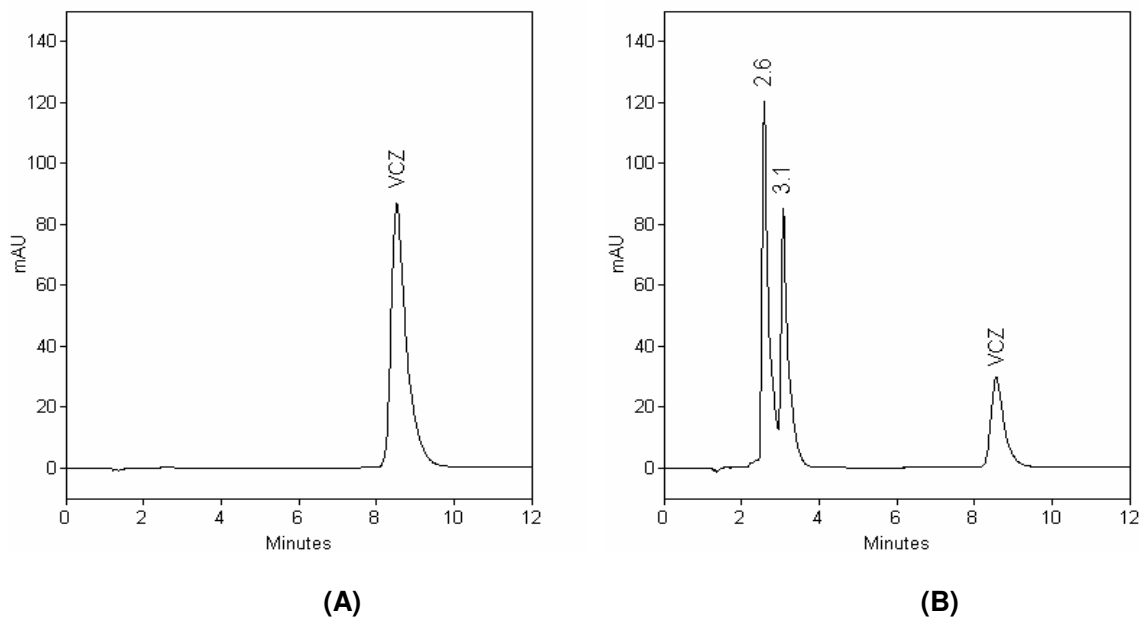


Figura 27. Cromatogramas do voriconazol, mantido a 60 °C. (A): em estado sólido, por 50 dias (B): em solução metanólica, por 21 dias. Condições: detecção em 255 nm, coluna de fase reversa C-8 Merck, fase móvel metanol:solução de trietilamina 0,6% pH 6,0 (1:1), fluxo 1ml/minuto, volume de injeção 20 µl.

Em solução, o fármaco foi degradado a compostos com tempo de retenção de 2,6 e 3,1 minutos (Figura 27-B). Os teores obtidos nos diferentes dias de análise estão representados na Figura 28. O teor das soluções no 21º dia foi de 25,3%.

A associação destes resultados com os obtidos na validação do método por CLAE (robustez), no qual soluções metanólicas mantidas em geladeira foram estáveis por 58 dias, bem como com a degradação observada nas amostras controle expostas à radiação UV-A (teor de 94,9% após 14 dias, em temperatura de até 30°C) sugerem a instabilidade do fármaco à temperatura, quando o mesmo estiver em solução.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram a opção do fabricante pelas formas farmacêuticas disponíveis do voriconazol: comprimidos e formulações de preparação extemporânea (injetável e suspensão oral).

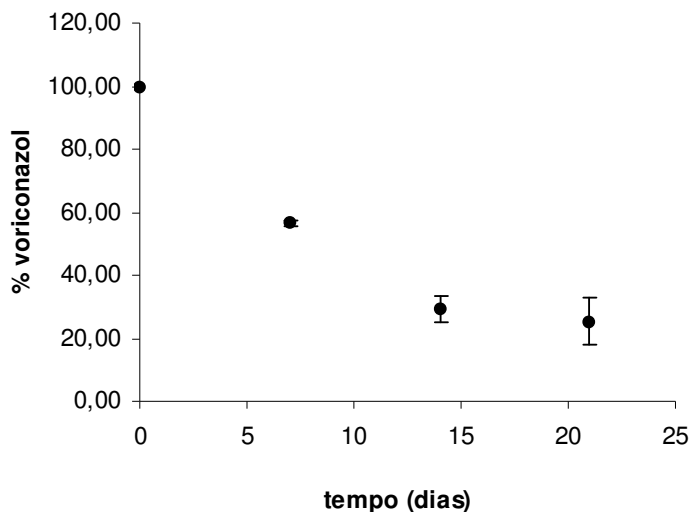


Figura 28. Teores percentuais de voriconazol em soluções metanólicas, mantidas a 60 °C, analisadas por CLAE.

5.4.3 Comparação dos produtos de degradação

Através deste estudo buscou-se estabelecer a similaridade dos produtos de degradação majoritários formados durante os estudos de estabilidade térmica, química e de fotoestabilidade.

A comparação dos cromatogramas obtidos nas diferentes condições de degradação mostrou que, em várias delas, dois compostos foram formados, com tempos de retenção em torno de 2,6 e 3,1 minutos. No Quadro 10 são sumarizados os resultados obtidos nos estudos de estabilidade.

Observou-se que as condições que provocaram a degradação mais rápida do voriconazol em solução foram o meio básico e a radiação UV-C.

O próximo passo foi avaliar se as substâncias que eluíram no mesmo tempo de retenção nas várias condições adotadas eram similares. Esta análise foi realizada através do detector de arranjo de diodos, que permite averiguar a

similaridade do espectro de UV de cada pico do cromatograma. Os picos de referência foram os obtidos pela hidrólise básica. Os índices de similaridade, obtidos pela sobreposição dos espectros de UV dos picos dos produtos de degradação, constam nas Figuras 45 a 50 (Anexo 2).

Quadro 10. Quadro comparativo das condições de degradação do voriconazol empregados neste estudo e da formação dos produtos de degradação com tempo de retenção 2,6 e 3,1 minutos.

Condição de degradação	Tempo de reação	TR 2,6 min	TR 3,1 min	VCZ (%) ^a	Figura
Hidrólise básica – temp. ambiente	30 min	D	D	23	18-2
Hidrólise ácida – 80 °C	2 h	D	ND	88	18-3
Hidrólise neutra – refluxo	4 h	D	D	99	18-4
Oxidação – temp. ambiente	3 h	D	D	83	18-5
Luz UV-A em estado sólido	14 dias	ND	ND	97	25-A
Luz UV-A, em solução	14 dias	D	D	93	25-B
Luz UV-C, em estado sólido	14 dias	D	ND	70	24-A
Luz UV-C, em solução	1 h	D	D	62	24-B
Temperatura, 60 °C, em estado sólido	50 dias	ND	ND	100	27-A
Temperatura, 60 °C, em solução	21 dias	D	D	25	27-B

TR:tempo de retenção; VCZ:voriconazol; D:detectado; ND:não detectado; ^a:concentração aproximada

Para obtenção do índice de similaridade, os espectros sob comparação são correlacionados, plotando suas absorvâncias em intervalos de 1 nm. Deste modo, calcula-se um coeficiente de correlação entre os espectros. Sobreposições perfeitas de espectros apresentam $r^2 = 1,000$, sendo considerados adequados valores de $r^2 > 0,995$ (WATSON, 2005). Os resultados dos índices de similaridade são apresentados na Tabela 19.

A análise dos dados apresentados permite inferir que a substância formada pela degradação em meio básico do voriconazol, com tempo de retenção de 2,6 minutos, foi formada em todas as condições, com exceção da radiação UV-C, em estado sólido. Do mesmo modo, a substância com tempo de retenção de 3,1 minutos foi formada em meio básico, oxidante e a 60 °C.

Tabela 19. Índice de similaridade dos picos de degradação com tempos de retenção 2,6 minutos e 3,1 minutos, em comparação com picos obtidos pela hidrólise básica.

Condição de degradação	Índice de similaridade	
	Pico TR 2,6 min	Pico TR 3,1 min
Hidrólise básica
Hidrólise ácida	0,9995	ND
Hidrólise neutra	0,9983	0,9919
Oxidação	0,9969	0,9984
Luz UV-A (solução)	0,9993	0,9248
Luz UV-C (sólido)	0,9713	ND
Luz UV-C (solução)	0,9998	0,9903
60 °C (solução)	1,0000	1,0000

ND: não detectado.

Por haver pouca quantidade de SQR disponível, os produtos de degradação foram obtidos a partir dos comprimidos. Avaliou-se então a interferência dos excipientes da formulação no processo de degradação, submetendo-se a SQR e os comprimidos à hidrólise alcalina. A semelhança dos cromatogramas obtidos indicou que os mesmos produtos de degradação são formados (cromatogramas não apresentados). Logo, para o isolamento dos produtos de degradação, soluções dos comprimidos foram expostas à degradação, e a condição de degradação foi a hidrólise básica, por ser a reação de degradação mais rápida.

5.4.4 Estabilidade da forma farmacêutica injetável

O injetável apresenta-se como pó para solução para infusão. Inicialmente o pó deve ser reconstituído com água estéril para injeção, de modo a obter solução com 10 mg/ml de voriconazol. Esta solução deve ser diluída com diluentes adequados, para somente então ser infundida no paciente (VFEND®).

A bula da formulação injetável apresenta a seguinte informação:

VFEND® IV, pó para solução para infusão, é apresentado em frascos-ampola para uso único e qualquer solução não utilizada deve ser descartada. (...) Se não for utilizado imediatamente, o período e as condições de armazenamento são de responsabilidade do usuário e normalmente não deve exceder 24 horas quando armazenado a 2-8 °C, a menos que a reconstituição e a diluição sejam realizadas em condições

assépticas controladas e validadas. A estabilidade física e química após a reconstituição foi demonstrada para 24 horas de 2 a 8 °C (VFEND®).

Considerando-se o alto custo do produto e o ajuste de dose baseado no peso corporal, o que gera sobras do produto (Anexo 3), justificam-se estudos mais aprofundados sobre a estabilidade do produto reconstituído e sobre a estabilidade das soluções para infusão.

5.4.4.1 Estabilidade do produto reconstituído

VFEND® IV não contém conservantes. Por este motivo, trabalhou-se em condições assépticas, a fim de evitar que contaminações microbianas pudessem interferir na estabilidade química do medicamento.

Após reconstituição com água estéril, a solução contendo 10 mg/ml de voriconazol manteve-se estável por, no mínimo, 8 dias em temperatura de 4 a 8 °C, não tendo sido observada redução no teor de substância ativa durante esse período (Figura 29). Vale lembrar que o fabricante recomenda seu uso em até 24 horas, se armazenada nestas condições.

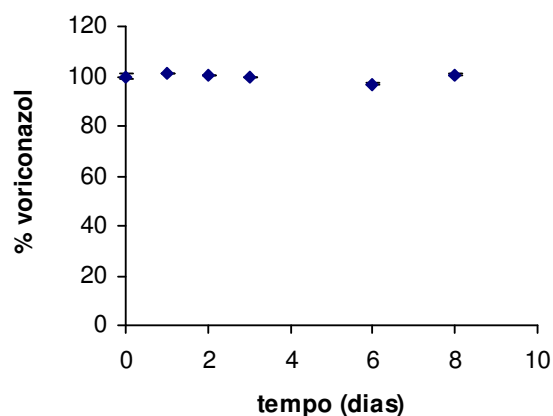


Figura 29. Estudo de estabilidade da solução reconstituída de voriconazol injetável, mantida sob refrigeração (4-8 °C), analisada por CLAE.

5.4.4.2 Estabilidade das soluções para infusão

De acordo com o fabricante, a solução reconstituída pode ser diluída para administração intravenosa até concentrações de 5 a 0,5 mg/ml, com os seguintes diluentes: glicose 5%, cloreto de sódio 0,9 ou 0,45%, isolado ou associado à glicose 5%; Ringer lactato, isolado ou em associação com dextrose 5%, glicose 5% em 20 mEq de cloreto de potássio.

Neste estudo, foram preparadas soluções para infusão de voriconazol com 0,5 mg/ml, em cloreto de sódio 0,9% e glicose 5%, por serem os diluentes mais usados na preparação de misturas intravenosas em hospitais. Os mesmos estavam contidos em bolsas flexíveis de cloreto de polivinila (PVC). Estas bolsas apresentam várias vantagens em relação aos frascos plásticos rígidos, pois consistem em sistema fechado, cujas paredes colabam sob pressão atmosférica e permitem a administração contínua do fluido, sem a necessidade de entrada de ar no recipiente. Isto reduz a possibilidade de contaminação e de embolia. Além disso, é possível adicionar outros medicamentos durante a administração, sem a exposição do sistema ao ar externo. Ainda, estas embalagens são mais leves e inquebráveis (MOORHATCH; CHIOU, 1974). Foram escolhidas para este estudo por permitirem a retirada de alíquotas das soluções periodicamente, sem a introdução de contaminantes.

As soluções foram consideradas estáveis se mais que 90% da concentração inicial fosse mantida. Embora existam exceções, esta é considerada a potência ou teor mínimo aceitável. Para alguns produtos, cujos produtos de degradação são tóxicos, mais importante do que a perda da potência é o acúmulo destes (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

Verificou-se que as soluções de voriconazol, diluídas em NaCl 0,9% e armazenadas sob refrigeração são mais estáveis do que as mantidas em temperatura ambiente. As soluções armazenadas a 4 °C apresentaram teor superior a 90,0% até 11 dias após o preparo e 87,3% aos 21 dias. Em temperatura ambiente, o teor de voriconazol, 48 horas após o preparo, foi de 88,3% (Figura 30 e Tabela 28, Anexo 4).

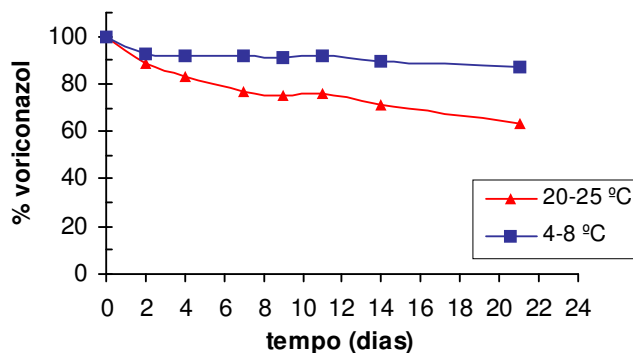


Figura 30. Estudo de estabilidade de soluções para infusão de voriconazol, diluídas em cloreto de sódio 0,9%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas por CLAE.

As soluções de voriconazol, diluídas em glicose a 5%, também não foram estáveis à temperatura ambiente. O prazo de validade das soluções mantidas sob refrigeração foi de 9 dias e o teor aos 21 dias foi 88,0% (Figura 31 e Tabela 29, Anexo 4). Observou-se que não houve mudanças na coloração e que as soluções mantiveram-se límpidas durante o tempo de avaliação, indicando a estabilidade física das soluções.

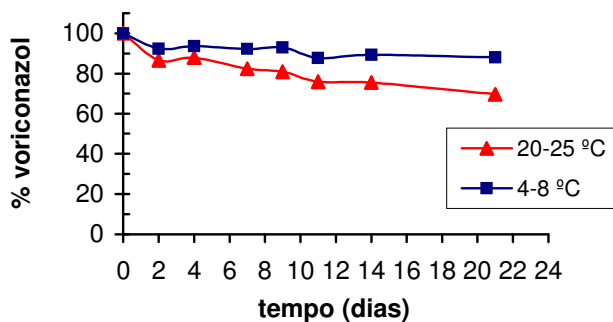


Figura 31. Estudo de estabilidade de soluções para infusão de voriconazol, diluídas em glicose 5%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas pelo método por CLAE.

Os cromatogramas obtidos no 21^o dia de preparo das soluções sob refrigeração são apresentados na Figura 32. Apesar da diminuição no teor do fármaco (87,3% em NaCl 0,9% e 88,0% em glicose 5%), não foram evidenciados picos extras no cromatograma. Análises pelo detector de arranjo de diodos

informaram que, além do voriconazol, não havia outras substâncias que absorvessem em toda a faixa UV-visível e que o pico do voriconazol estava puro. (pureza do pico > 0,9999, em todas as bolsas avaliadas). Este dado confirma também a especificidade do método para a formulação injetável.

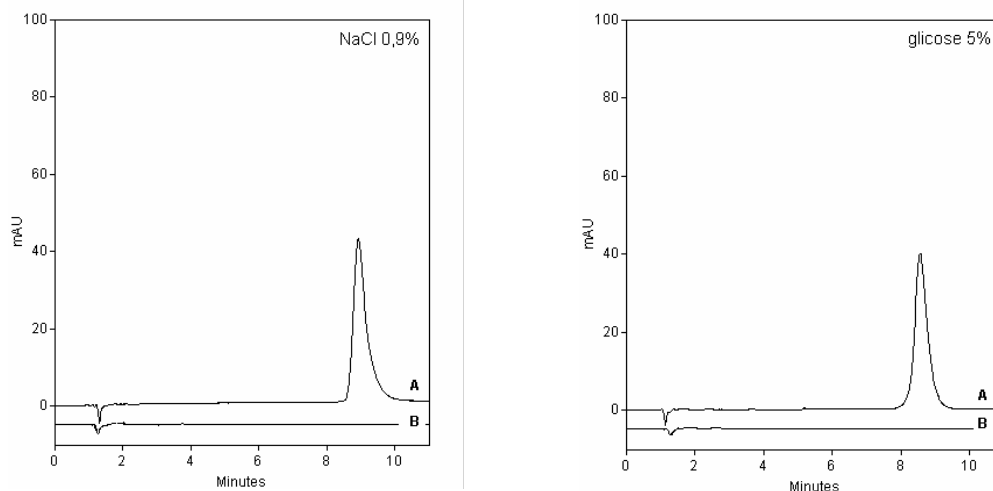


Figura 32. Cromatogramas das soluções para infusão de voriconazol em cloreto de sódio 0,9% e glicose 5%, no 21º dia após o preparo, mantidas a 4 °C. (A): solução para infusão; (B): branco (cloreto de sódio 0,9% ou glicose 5,0%). Concentração estimada: 50 µg/ml. Condições: detecção em 255 nm, coluna de fase reversa C-8 Merck, fase móvel metanol:solução de trietilamina 0,6% pH 6,0 (1:1), fluxo 1ml/minuto, volume de injeção 20 µl.

A fim de verificar se após tempos superiores de armazenamento seriam observados picos correspondentes a produtos de degradação, foram analisadas bolsas do fármaco diluído em glicose 5% (37 dias após preparo) e cloreto de sódio 0,9% (79 dias após o preparo), ambas mantidas em temperatura ambiente desde a preparação. Estas soluções foram analisadas pelos três métodos desenvolvidos, a partir da mesma solução estoque, tendo sido observados teores semelhantes pelo três métodos empregados. Os resultados são apresentados na Tabela 20. Em ambas as soluções, foi evidenciado apenas um pico extra, com tempo de retenção de 2,5 minutos, também evidenciado nos testes de degradação forçada, mas cuja área não é proporcional à queda da concentração do fármaco (cromatogramas não apresentados).

Tabela 20. Teores percentuais das soluções para infusão de voriconazol em cloreto de sódio 0,9% (79 dias) e glicose 5% (37 dias), analisadas pelos métodos de CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico.

Amostra	Teor percentual		
	CLAE*	UV*	Microbiológico*
Glicose 5%, 37 dias	64,6	66,2	65,3
NaCl 0,9%, 79 dias	52,1	52,6	53,2

*Cada valor é média de duas determinações.

Estes resultados levaram à formulação de duas hipóteses: nas condições testadas o voriconazol foi degradado a produtos que não possuem grupamentos cromóforos, ou o fármaco foi sorvido pelo polímero da bolsa flexível, fato relatado em vários trabalhos, que avaliaram a compatibilidade de fármacos com bolsas de PVC (MOORHATCH; CHIOU, 1974; KOWALUK *et al.*, 1981; IILUM; BUNDGAARD, 1982; RAY *et al.*, 1983; LACKNER *et al.*, 1983).

A primeira hipótese pareceu pouco provável, tendo em vista o conhecimento prévio do comportamento de degradação do voriconazol nas várias condições estudadas neste trabalho.

Em relação ao processo de sorção, este pode ocorrer como resultado de dois fenômenos: a adsorção e a absorção. A adsorção é um processo usualmente espontâneo, sendo que um estado de equilíbrio é rapidamente atingido. A absorção resulta da penetração do soluto na matriz plástica, como resultado da difusão das moléculas do fármaco na matriz. Uma vez nesta, o soluto liga-se por interações físico-químicas, como forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, a sítios do polímero. Neste caso, a difusão é considerada o passo limitante da velocidade e, como resultado, o processo de absorção é mais lento e envolve a captação de quantias maiores do fármaco. Na maioria dos casos, a quantia de fármaco adsorvido é insignificante quando comparado à quantia absorvida (MOORHATCH; CHIOU, 1974).

A fim de confirmar esta hipótese, removeu-se o conteúdo total das bolsas e as mesmas foram lavadas com sucessivas porções de água, tendo sido reservada alíquota da última lavagem, para análise posterior. Em seguida,

introduziram-se 20 ml de metanol nas bolsas, sendo que as mesmas permaneceram em contato com o solvente, por 5 dias. Após este período, removeram-se alíquotas das bolsas e as mesmas foram analisadas por CLAE. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 33. Concluiu-se que o voriconazol foi sorvido pela bolsa de PVC, uma vez que o mesmo foi detectado nas soluções metanólicas (Figuras 33-1A e 33-2A). O pico observado refere-se exclusivamente ao que havia sido sorvido pela bolsa, uma vez que nos cromatogramas das soluções de lavagem não foram detectados picos do voriconazol (Figuras 33-1B e 33-2B).

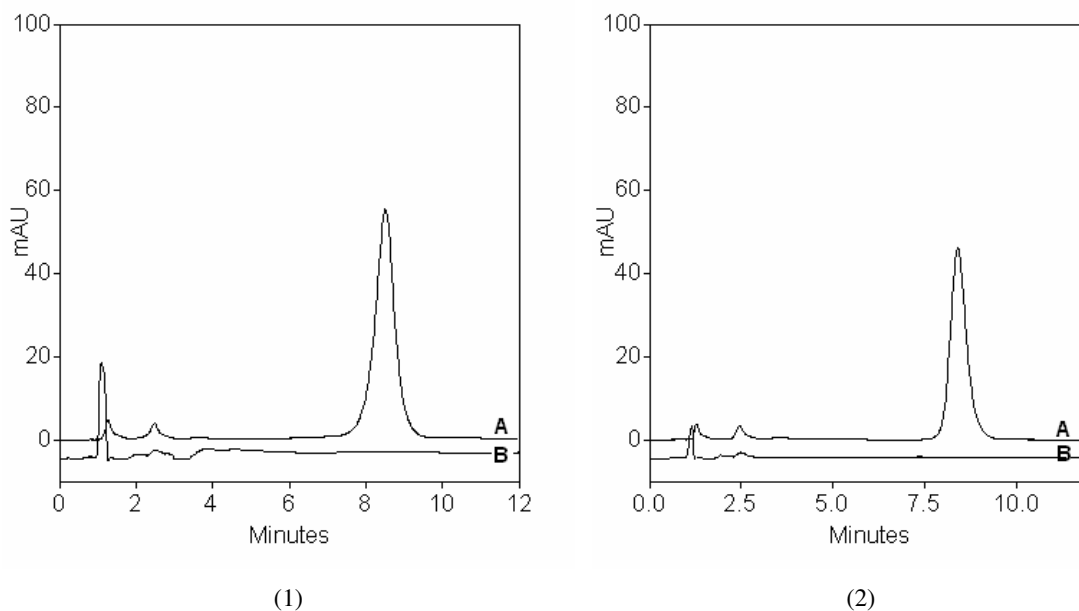


Figura 33. Cromatogramas das soluções obtidas após contato das bolsas de PVC com metanol por 5 dias. **(1A)** Solução metanólica, obtida de bolsa que continha voriconazol em NaCl 0,9% **(1B)** Solução de lavagem aquosa da mesma bolsa. **(2A)** Solução metanólica, obtida de bolsa que continha voriconazol em glicose 5%. **(2B)** Solução de lavagem aquosa da mesma bolsa. Condições analíticas: detecção em 255 nm, coluna de fase reversa C-8 Merck, fase móvel metanol:solução de trietilamina 0,6% pH 6,0 (1:1), fluxo 1ml/minuto, volume de injeção 20 µl.

O pH da solução tem efeito marcante sobre a sorção de fármacos, visto que a concentração do íon hidrogênio controla o percentual relativo do fármaco não-ionizado, que é a forma mais favoravelmente sorvida pelo plástico (MOORHATCH; CHIOU, 1974; KOWALUK *et al.*, 1981; LACKNER *et al.*, 1983). O

pH das soluções, ao término do experimento, foi aproximadamente 4,3, no qual o percentual da forma não-ionizada do voriconazol é superior a 99,5%, calculado a partir da equação de Henderson-Hasselbach (BARREIRO; FRAGA, 2001).

O efeito da temperatura sobre o processo de sorção também foi relatado em trabalhos. Sugere-se que temperaturas mais elevadas provoquem aumento da taxa de difusão do soluto através da matriz plástica, resultando em aumento na captação do fármaco (MOORHATCH; CHIOU, 1974; LACKNER *et al.*, 1983).

Face ao exposto, supõe-se que tenha ocorrido absorção do voriconazol, preferentemente, que na forma não-ionizada é lipofílico e pode interagir com a bolsa de PVC, processo também influenciado pela temperatura, o que justificaria o percentual inferior de voriconazol nas bolsas mantidas a 25 °C. Nos frascos de vidro, onde esta interação não ocorre, a concentração de voriconazol manteve-se estável pelo período avaliado (produto reconstituído). Este fato foi observado também em soluções de voriconazol preparadas em metanol e em água, na mesma concentração das bolsas para infusão, acondicionadas em frascos de vidro e mantidas em temperatura ambiente. O teor das soluções diluídas em metanol, no 21º dia, foi de 101,5% e o teor das soluções preparadas em água foi de 101,4%.

Outros fatores que podem interferir no processo de sorção são: diluente empregado, a concentração do soluto, o coeficiente de partição do fármaco e a área da superfície de contato do fármaco com a bolsa de PVC (MOORHATCH; CHIOU, 1974; KOWALUK *et al.*, 1981; LACKNER *et al.*, 1983).

Os resultados aqui obtidos diferem dos encontrados por HOPPE-TICHY e colaboradores (2005), que relataram que soluções do fármaco em NaCl 0,9% na concentração de 2 mg/ml são estáveis por 32 dias. Em parte, assemelham-se aos encontrados por SAHRAOUI e colaboradores (2006), que relataram prazo de validade de 8 dias para soluções do fármaco em NaCl 0,9% (mantidas a 4 °C ou 25 °C) e de 6 dias para soluções em glicose 5% (mantidas a 4 °C). Talvez a diferença encontrada deva-se à concentração do fármaco nas soluções, que em ambos os estudos foi de 2 mg/ml, ao passo que neste estudo foi de 0,5 mg/ml. Outra possibilidade pode ser diferenças nos polímeros que compõem as bolsas,

visto que nos estudos relatados foram empregadas bolsas constituídas por poliolefinas, isentas de PVC. CADROBBI e colaboradores (2006) atribuíram estabilidade de 15 dias para soluções de voriconazol em glicose 5%, em bolsas de PVC, na concentração de 4 mg/ml, sob refrigeração, resultado que se assemelha ao aqui relatado. Cabe ressaltar que o laboratório produtor não faz nenhuma ressalva quanto à incompatibilidade do voriconazol com bolsas de PVC, as quais, por seu menor custo, são as mais rotineiramente empregadas.

Este estudo indicou que, tanto o produto reconstituído, quanto as bolsas para infusão podem ser usadas por períodos superiores aos indicados pelo laboratório produtor. Transpondo estes resultados para a prática corrente em hospitais, o alto custo deste medicamento justificaria sua manipulação em centrais de preparação de misturas intravenosas, em condições assépticas validadas, ao invés da preparação em unidades de enfermagem. Deste modo, a estabilidade microbiológica estaria garantida, o que, associado ao resultado aqui encontrado, permitiria o uso das soluções por períodos de, no mínimo, 8 dias, desde que mantidas sob refrigeração.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO PRODUTO SUBMETIDO À DEGRADAÇÃO

A fim de avaliar se os produtos de degradação do voriconazol possuem atividade antifúngica, soluções da SQR degradadas foram analisadas pelos 3 métodos desenvolvidos. As condições escolhidas para degradação foram hidrólise básica e exposição à luz UV-C, por serem as mais adversas ao fármaco e também porque pela radiação UV-C há formação de vários produtos de degradação.

As mesmas soluções (1mg/ml) foram submetidas às seguintes condições: hidrólise básica por 15 minutos e luz UV-C por 1 hora. Após a reação, as soluções foram diluídas com solventes adequados e analisadas pelos métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico. Os teores obtidos são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Teores obtidos no doseamento de soluções da SQR do voriconazol submetidos à hidrólise básica (NaOH 0,1 M/15 minutos) e radiação UV-C (1 hora).

Condição de degradação	Teor (%)		
	CLAE*	Microbiológico*	Espectrofot.UV*
Hidrólise básica	36,5	34,2	158,5
Luz UV-C	62,2	65,7	88,9

*cada valor é média de 3 determinações.

A semelhança entre os teores obtidos nos métodos por CLAE e microbiológico demonstrou que os produtos de degradação do voriconazol não possuem atividade antifúngica. Os altos teores observados no método espectrofotométrico confirmam sua falta de especificidade na análise de amostras degradadas, uma vez que os produtos de degradação absorvem intensamente próximo a 255 nm, comprimento de onda da análise.

Na Figura 44 são apresentados os halos de inibição formados após exposição à radiação UV-C, onde é possível observar diminuição no tamanho dos halos da amostra degradada. Os halos da amostra degradada (AD, concentração teórica 10 µg/ml) são semelhantes ao halo P2 (SQR, 6 µg/ml).

Nas duas condições de degradação, o produto majoritário formado corresponde ao produto de degradação isolado e identificado (PD1), o qual mantém em sua estrutura o anel triazólico. Estudo realizado com fármacos desta classe indicou que o centro estereogênico na posição 7 (C-OH no voriconazol e C=O no PD1) é necessário para o encaixe no centro estereogênico do alvo enzimático (citocromo P₄₅₀). A comparação entre enantiômeros e sua forma racêmica também indicou diferenças nas concentrações inibitórias mínimas, o que foi relacionado a diferenças na solubilidade das mesmas, o que poderia impedir a

penetração na membrana do fungo (BARTROLI *et al.*, 1998). Logo, a presença do centro estereogênico do voriconazol e que inexistente no PD1 parece ser fundamental para a atividade antifúngica.

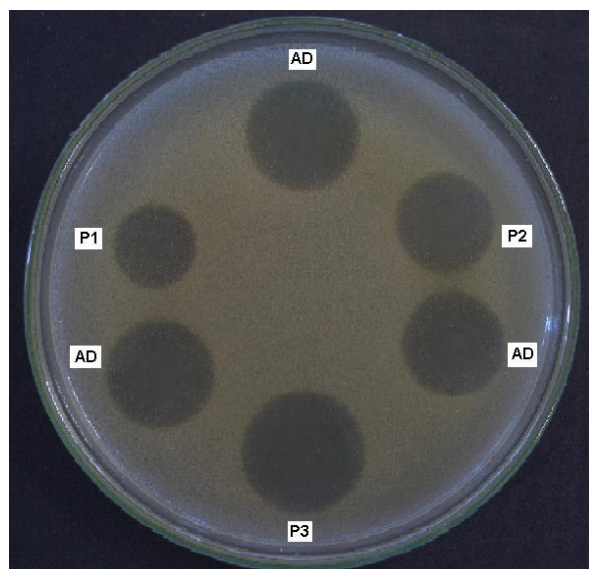


Figura 44. Doseamento microbiológico do voriconazol degradado por luz UV-C. P1, P2, P3: SQR de voriconazol em concentrações de 3,0; 6,0 e 12,0 $\mu\text{g/ml.}$, respectivamente. AD: solução de SQR após exposição à luz UV-C, por 1 hora, em concentração teórica de 10 $\mu\text{g/ml.}$ Condições: método de difusão em ágar – cilindros em placas, microrganismo teste *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, incubação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas.

6. CONCLUSÕES

Em relação aos métodos analíticos desenvolvidos:

- Os métodos qualitativos desenvolvidos (CLAE, CCD e espectrofotometria no UV), possibilitaram a identificação do voriconazol na forma farmacêutica comprimidos, sendo que os métodos por CLAE e CCD foram apropriados para a identificação do fármaco em presença de produtos de degradação.

- O método de doseamento por espectrofotometria no UV demonstrou ser exato, preciso e linear, para a quantificação do voriconazol em comprimidos. No entanto, não é adequado para a análise de amostras que contenham produtos de degradação. Pode ser recomendado para análise durante o processo de fabricação ou nos ensaios de dissolução.

- O método por CLAE desenvolvido demonstrou ser exato, preciso, específico, linear e robusto, sendo adequado para a quantificação do voriconazol em comprimidos e para ser empregado em estudos de estabilidade;

- O ensaio microbiológico – método de difusão em ágar, cilindros em placa – apresentou-se exato, preciso, linear e específico para a quantificação do voriconazol em comprimidos, mostrando-se específico para amostras que contenham produtos de degradação;

- A análise estatística dos métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico indicou que não há evidências de diferença significativa entre os teores médios encontrados pelos três métodos. No entanto, apenas os métodos de CLAE e ensaio microbiológico são apropriados para a análise de amostras degradadas.

Em relação ao estudo de estabilidade do voriconazol:

- Verificou-se que o voriconazol é rapidamente degradado em meio alcalino, sendo também instável em meios ácido, oxidante e neutro, porém apenas pelo emprego de condições mais drásticas.

- Observou-se que o fármaco é estável em estado sólido (teor 101,2% aos 50 dias) e instável em solução (25,3% em 21 dias), na temperatura avaliada

(60 °C). Em relação à fotoestabilidade, fator importante de degradação de outros fármacos da classe dos imidazóis, o voriconazol é instável frente às duas radiações testadas, sendo que a radiação UV-C é mais deletéria para o fármaco, tanto em solução (teor 62,2%, após 1 hora) quanto em estado sólido (teor 70,3%, em 14 dias). A exposição à radiação UV-A provocou decréscimo menos acentuado no teor, que foi maior na amostra em solução (teor 93,5% em solução e 96,9% em estado sólido, em 14 dias).

- Apesar da instabilidade à radiação UV-C em estado sólido, a formulação dos comprimidos manteve-se estável nesta condição, indicando que não há risco de degradação dos comprimidos frente às radiações.

Em relação à estabilidade da preparação extemporânea injetável:

- O prazo de validade da solução reconstituída de 24 horas, proposto pelo laboratório produtor, pode ser estendido para oito dias.

- Os resultados indicam que as soluções para infusão do voriconazol em cloreto de sódio 0,9% ou glicose 5%, preparadas em bolsas de PVC, devem ser administradas logo após sua preparação, se mantidas em temperatura ambiente. Sob refrigeração, são estáveis por 11 e nove dias, respectivamente. Observou-se que a queda no teor ocorre pela adsorção e/ou absorção do fármaco pelas bolsas de PVC e não em decorrência de sua degradação.

Em relação ao isolamento e identificação do produto de degradação

- Análises realizadas pelo detector de arranjo de diodos indicaram que em praticamente todas as condições empregadas no estudo de estabilidade, dois produtos majoritários são formados.

- Após isolamento por CLAE preparativa, e dessecação em evaporador rotatório, um dos produtos foi degradado. Desta forma, apenas o produto de degradação denominado PD1 foi identificado por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C, espectrometria de massas e espectrofotometria no infravermelho. A estrutura proposta corresponde a 1-(2,4-difluorfenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-1-etanona.

- Através do doseamento de amostras degradadas pelo ensaio microbiológico, verificou-se que os produtos de degradação do voriconazol não apresentam atividade antifúngica.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, métodos analíticos validados constituem-se em exigência dos órgãos reguladores para obtenção de registro de medicamentos. No entanto, geralmente estes métodos não são divulgados pelo laboratório produtor do medicamento, fato que vem dificultar a averiguação da qualidade de produtos comercializados.

A importância do voriconazol como agente terapêutico no tratamento de infecções fúngicas invasivas, a inexistência de métodos voltados à sua determinação em formas farmacêuticas e as escassas informações relativas à sua estabilidade, motivaram o desenvolvimento de estudos que viessem a preencher estas lacunas, objetivo deste trabalho.

Os métodos quantitativos desenvolvidos e validados (CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico) originaram as seguintes publicações, que foram as primeiras a relatarem métodos voltados à quantificação do voriconazol em comprimidos e que são apresentadas no Anexo 6:

ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A. M. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of voriconazole content in tablets. *Chromatographia*, v.62, p.429 - 434, 2005.

ADAMS, A. I. H., STEPPE, M., FRÖEHLICH, P. E., BERGOLD, A. M. Comparison of Microbiological and UV-Spectrophotometric Assay for Determination of Voriconazole in Tablets. *Journal of AOAC International*, v.89, p.960 - 965, 2006.

No estudo de estabilidade, foi possível verificar as condições que provocam a degradação mais intensa do fármaco, sendo elas o meio alcalino e radiação UV-C. Por sua instabilidade em meio alcalino, sugere-se que soluções do fármaco permaneçam em contato com soluções básicas previamente ao descarte, a fim de evitar o desenvolvimento de resistência dos microrganismos sensíveis. Os resultados obtidos no estudo da estabilidade da formulação injetável indicaram que os prazos de validade informados pelo laboratório produtor podem ser estendidos. Artigo que apresenta os resultados deste estudo foi submetido ao periódico *The Annals of Pharmacotherapy*.

Através do ensaio microbiológico de amostras degradadas, que contêm como produto majoritário o produto de degradação isolado e identificado (PD1), verificou-se que os produtos de degradação do voriconazol não têm atividade antifúngica. Sendo assim, cuidados em relação à temperatura e luz devem ser tomados no armazenamento de soluções do fármaco.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, A.I.H.; BERGOLD, A.M. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of voriconazole content in tablets. *Chromatographia*, v. 62, n. 7-8, p. 429-434, 2005.

ADAMS, A.I.H.; STEPPE, M.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A.M. Comparison of microbiological and UV-spectrophotometric assays for determination of voriconazole in tablets. *Journal of AOAC International*, v. 89, n. 4, p. 960-965, 2006.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 17 ed. Gaithersburg, MD, 2000. v.1.

BABU, G.S.; RAJU, C.A.I. UV-spectrophotometric determination of voriconazole in bulk and its formulation. *Asian Journal of Chemistry*, vol. 19, n. 2, p. 1625-1627, 2007. Web of Science. Resumo.

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

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. cap. 1.

BARTROLI, J.; TURMO, E.; ALGUERÓ, M.; BONCOMPTE, E.; VERICAT, M.L.; CONTE, L.; RAMIS, J.; MERLOS, M.; GARCIA-RAFANELL, J.; FORN, J. New azole antifungals. 3. Synthesis and antifungal activity of 3-substituted-4(3H)-quinazolinones. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 11, p. 1869-1882, 1998.

BELANGER, P.; NAST, C.C.; FRATTI, R. SANATI, H.; GHANNOUM, M. Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 8, p. 1840-1842, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 136, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre registro de medicamentos novos ou inovadores com princípios ativos sintéticos ou semi-sintéticos. 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; Publicada no D.O.U. de 02 de junho de 2003b.

BUTTERS, M. EBBS, J.; GREEN, S.P.; MacRAE, J.; MORLAND, M.C.; MURTIASHAW, C.W. ; PETTMAN, A.J. Process development of voriconazole: a novel broad-spectrum triazole antifungal agent. *Organic Process Research & Development*, v. 5, p. 28-36, 2001.

CADROBBI, J.; HECQ, J.P.; LEBRUN, C.; VANBECKBERGEN, D.; JAMRT, J.; GALANTI, L. Long-term stability of voriconazole 4 mg/ml in dextrose 5% polyvinyl chloride bags at 4 °C. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science*, vol. 12, n. 3, p. 57-59, 2006.

CAPTISOL®. Disponível na Internet no endereço:

www.captisol.com/Captisol/ProductApprovals.pdf. Acesso em 20/04/05.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUER, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; da MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COUCH, P.; JACOBSON, P.; JOHNSON, C. E. Stability of fluconazole and amino acids in parenteral nutrient solutions. *American Journal of Health System Pharmacists*, v. 49, p. 1459-1462, 1992.

CREGO, A. L.; GÓMEZ, J.; MARINA, M. L.; LAVANDERA, J. L. Application of capillary zone electrophoresis with off-line solid-phase extraction to *in vitro* metabolism studies of antifungals. *Electrophoresis*, v. 22, p. 2503-2511, 2001b.

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, 2001a.

CYR, T.D.; DAWSON, B.A.; NEVILLE, G.A.; SHURVELL, H.F. Spectral characterization of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, p. 247-255, 1996.

DENNING, D. W.; GRIFFITHS, C. E. M. Muco-cutaneous retinoid-effects and facial erythema related to the novel triazole antifungal agent voriconazole. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 26, p. 648-653, 2001.

DENNING, D.W.; RIBAUD, P.; MILPIED, N.; CAILLOT, D.; HERBRECHT, R.; THIEL, E.; HAAS, A.; RUHNKE, M.; LODE, H. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 34, n. 5, p. 563-569, 2002.

DOCTORFUNGUS. Disponível na Internet no endereço:

<http://www.doctorfungus.org/thedrugs/> Data de acesso: 27/06/2007.

DONNELLY, J. P. ; DE PAUW, B. E. Voriconazole – a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 10, suppl 1, p. 107-117, 2004.

DRUG BANK. Disponível na Internet no endereço:

<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>. Data de acesso: 02/07/2007.

EGLE, H.; TRITTLER, R.; KÖNIG, A.; KÜMMERER, K. Fast, fully automated analysis of voriconazole from serum by LC-LC-ESI-MS-MS with parallel column-switching technique. *Journal of Chromatography B*, v. 814, p. 361-367, 2005.

- ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, suppl. S1, p. 7-10, 2002.
- EMA. European Medicines Agency. 2004. Procedure No. EMEA/H/C/387/X/09. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/vfend/H-384-X-09.pdf>. Data de acesso: 06/02/2007.
- EMA. European Medicines Agency. 2005. Scientific Discussion. www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/vfend/404901en6.pdf. Data de acesso: 01/09/2006.
- ESPINEL-INGROFF, A.; BOYLE, K.; SHEEHAN, D. J. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. *Mycopathologia*, v. 150, p. 101-115, 2001.
- Eur. Ph. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4 ed. Strasbourg: Ed. Council of Europe, 2002.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FERRETTI R, GALLINELLA B, LA TORRE F, ZANITTI L. Direct resolution of a new antifungal agent, voriconazole (UK-109,496) and its potential impurities, by use of coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 47, n. 11-12, p. 649-654, 1998.
- FROMTLING, R.A. Voriconazole. *Drugs of the Future*, v. 21, n. 3, p. 266-271, 1996.
- GAGE, R.; STOPHER, D.A. A rapid HPLC assay for voriconazole in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 17, p. 1449-1453, 1998.
- GHANNOUM, M.A.; KUHN, D.M. Voriconazole – better chances for patients with invasive mycoses. *European Journal of Medical Research*, v.7, p. 242-256, 2002.
- HERBRECHT, R.; DENNING, D. W.; PATTERSON, T. F.; BENNETT, J. E.; GREENE, R. E.; OESTMANN, J.; KERN, W. V.; MARR, K. A.; RIBAUD, P.; LORTHOLARY, O.; SYLVESTER, R.; RUBIN, R. H.; WINGARD, J. R.; STARK, P.; DURAND, C.; CAILLOT, D.; THIEL, E.; CHANDRASEKAR, P. H.; HODGES, M. R.; SCHLAMM, H. T.; TROKE, P.F.; DE PAUW, B. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 6, p. 408-415, 2002.
- HEWITT, W. *Microbiological assay: an introduction to quantitative principles and evaluation*. New York: Academic Press, 1977.
- HOPPE-TICHY, T.; WENZEL, S.; GEHRIG, A.K.; NGUYEN, H. Stability of voriconazole in infusion bags. *Pharmazie*, v. 60, n. 1, p. 77-78, 2005.

HUNT-FUGATE, A. K.; HENNESSEY, C. K.; KAZARIAN, C. M. Stability of fluconazole in injectable solutions. *American Journal of Health System Pharmacists*, v. 50, p. 1186-1187, 1993

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Stability Testing of New Drug Substances and Products - Q1A(R2)* 2003.

___ ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, 1996.

___ ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2(R1), 2005.

ILLUM, L.; BUNDGAARD, H. Sorption of drugs by plastic infusion bags. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 10, p. 339-351, 1982.

INAGAKI, K.; TAKAGI, J.; LOR, E. KUM-JA, L.; NII, L.; GILL, M. , H. Stability of fluconazole in commonly used intravenous antibiotic solutions. *American Journal of Health System Pharmacists*, v. 50, p. 1206-1208, 1993.

JACOBSON, P.; JOHNSON, C.; WALTERS, J. R. Stability of itraconazole in an extemporaneously compounded oral liquid. *American Journal of Health System Pharmacists*, v. 52, n. 2; p. 189-191, 1995.

JAIME-FIGUEROA, S.; KURZ, L.J.; LIU, Y.; CRUZ, R. Synthesis and experimental study of through-space hydrogen-fluorine and carbon-fluorine spin-spin coupling in 4,5-substituted 1-acetyl-8-fluoronaphtalenes. *Spectrochimica Acta*, Part A, v. 56, p. 1167-1178, 2000.

JANSEN, J.P.; KERN, W.V.; CORNELLY, O.A.; KARTHAUS, M.; RUHNKE, M. ULLMANN A.J.; RESCH, A. Economic evaluation of voriconazole versus conventional amphotericin B in the treatment of invasive aspergillosis in Germany. *Value in Health*, v. 9, n. 1, p 12-23, 2006.

JOHNSON, C.; JACOBSON, P.; PILLEN, H. A.; WOYCIK, C. L. Stability and compatibility of fluconazole and aminophylline in intravenous admixtures. *American Journal of Health System Pharmacists*, v. 50, p. 703-706, 1993.

KEEVIL, B.G.;NEWMANN, S.; LOCKHART, S.; HOWARD, S.J.; MOORE, C.B.; DENNING, D.W. Validation of an assay for voriconazole in serum samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 26, n. 6, p. 650-657, 2004.

KIBBE, A.H. (Ed.) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3. Ed. London: Pharmaceutical Press. 2000.

KLASTERSKY, J. Empirical antifungal therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 23, p.105-112, 2004.

- KLEINBERG, M. What is the current status of conventional amphotericin B? *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27S, p. S12-S16, 2006.
- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.
- KOWALUK, E.A.; ROBERTS, M.S.; BALCKBURN, H.D.; POLACK, A.E. Interactions between drugs and polyvinyl chloride infusion bags. *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 38, p. 1308-1314, 1981.
- LACKNER, T.E.; BALDUS, D.; BUTLER, C.D.; AMYX, C.; KESSLER, G. Lidocaine stability in cardioplegic solution stored in glass bottles and polyvinyl chloride bags. *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 40, p. 97-101, 1983.
- LEVINSON, W. JAWETZ, E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 197-205.
- LEWIS, J.S.; BOUCHER, H.W.; LUBOWSKI, T.J.; AMBEGAONKAR, A.J.; DAY, D.L.; PATTERSON, T.F. Cost advantage of voriconazole over amphotericin B deoxycolate for primary treatment of invasive aspergillosis. *Pharmacotherapy*, n. 25, v.6, p. 839-846, 2005.
- MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 10, suppl. 1, p 1-10, 2004.
- MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.
- MOORHATCH, P.; CHIOU, W.L. Interactions between drugs and plastic intravenous fluids bags. Part I: sorption studies on 17 drugs. *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 31, p. 72-78, 1974.
- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared Absorption Spectroscopy*. 2.ed. San Francisco: Holden-Day, 1977. 287 p.
- NUDELMAN, N. E. E. *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to Spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3. ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001. 579 p.
- PEHOURCQ, F.; JARRY, C.; BANNWARTH, B. Direct injection HPLC method for the determination of voriconazole in plasma using an internal surface reversed-phase column. *Biomedical Chromatography*, v. 18, n. 9, p. 719-722, 2004.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. v.1, p. 313-365.

- PENNICK, G.J.; CLARK, M.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G. Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay for voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 7, p. 2348-2350, 2003.
- PEREA, S.; PENNICK, G. J.; MODAK, A.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; SHEEHAN, D. J.; RINALDI, M.G. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 44, n. 5, p. 1209-1213, 2000.
- PINTO, T. de J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Ateneu, 2000.
- PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. 2. ed. Madrid: Editorial Alhambra, 1985.
- PURKINS, L.; WOOD, N.; GHAHRAMANI, P.; GREENHALGH, K.; ALLEN, M. J.; KLEINERMANS, D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p.2546-2553, 2002.
- RAY, J.B.; NEWTON, D.W.; NYE, M.T.; LEET, W.A. Droperidol stability in intravenous admixtures. *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 40, p. 94-97, 1983.
- SABLE, C.A.; NGUYEN, B-Y. T.; CHODAKEWITZ, J.A.; DINUBILE, M.J. Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections. *Transplant Infectious Disease*, v. 4, p. 25-30, 2002.
- SAHRAOUI, L.; CHIADMI, F.; SCHLATTER, J.; TOLEDANO, A.; CISTERMINO, S.; FONTAN, J.E. Stability of voriconazole injection in 0.9% sodium chloride and 5% dextrose injections. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 63, n. 15, p. 1423-1426, 2006.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.
- SIMON, P.; VEVERKA, M. OKULIAR, J. New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, p. 21-26, 2004.
- SPELLBERG, B.J., FILLER, S.G.; EDWARDS Jr., J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infection Disease*, v. 42, p. 244-251, 2006.
- STEVENS, D.A. Diagnosis of fungal infections: current status. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 49, suppl. S1, p. 11-19, 2002.

- STONE, E. A.; FUNG, H.B.; KIRSCHENBAUM, H.L. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clinical Therapeutics*, v. 24, n.3, 2002.
- STOPHER, D.A.; GAGE, R. Determination of a new antifungal agent, voriconazole, by multidimensional high-performance liquid chromatography with direct plasma injection onto a size-exclusion column. *Journal of Chromatography B*, v. 691, p. 441-448, 1997.
- TØNESSEN, H.H. *Photostability of Drugs and Drugs Formulations*. CRC Press: Boca Raton, Florida. 2.ed., 2004. cap.2.
- USP 29. THE UNITED STATES Pharmacopeia. 29 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006. <81>.
- VARANASI, N.; BASKARAN, I.; ALANGADEN, G. J.; CHANDRASEKAR, P. H.; MANAVATHU, E. K. Novel effect of voriconazole on conidiation of *Aspergillus* species. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 23, p. 72-79, 2004.
- VFEND®. Disponível no endereço: www.pfizer.com/do/medicines/mm_vfend.html.
Data de acesso: 08/01/03.
- VORICONAZOLE . *Drugs of the Future*, v. 24, n. 3, p. 354-355, 1999.
- WALSH, T. J.; PAPPAS, P.; WINSTON, D. J.; LAZARUS, H. M.; PETERSEN, F.; RAFFALLI, J.; YANOVICH, S.; STIFF, P.; GREENBERG, R.; DONOWITZ, G.; LEE, J. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 4, p. 225-234, 2002.
- WATKINS, W. J.; RENAU, T. E. Progress with antifungal agents and approaches to combat fungal resistance. In: *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v. 35, p. 157-166. Cap. 14, 2000.
- WATSON, D.G. *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- WEINGBERG, E.D. Antifungal Agents. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. *Principles of Medicinal Chemistry*. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. Cap. 35, p. 803-811.
- WENK, M.; DROLL, A.; KRÄHENBÜHL, S. Fast and reliable determination of the antifungal drug voriconazole in plasma using monolithic silica rod liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 832, p. 313-316, 2006.
- WILSON, L.; REYES, C.M.; STOLPMAN, M.; SPECKMAN, J.; ALLEN, K.; BENEY, J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value in Health*, v. 5, n. 1, p 26-34, 2002.
- YAMREUDEEWONG, W.; LOPEZ-ANAYA, A.; RAPPAPORT, H. Stability of fluconazole in an extemporaneously prepared oral liquid. *American Journal of Health System Pharmacists*, v. 50, p. 2366-2367, 1993.

ZHOU, L.; GLICKMAN, R. D.; CHEN, N.; SPONSEL, W. E.; GRAYBILL, J. R.; LAM, K-W. Determination of voriconazole in aqueous humor by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. v. 776, p. 213-220, 2002.

Tabela 24. Análise estatística (ANOVA) das absorvâncias determinadas para obtenção da curva padrão do voriconazol por espectrofotometria no UV.

Fontes de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calc.	F tab.
Entre	6	0,17703295	0,02950549	4589,74*	2,85
Regressão	1	0,17700715	0,17700715	27534,44*	4,60
Desvio de linearidade	5	0,00002581	0,00000516	0,80	2,96
Dentro	14	0,00009000	0,00000643		
Total	20	0,17712295			

*: significativo para $p < 0,05$.

Tabela 25. Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas obtidas para as curvas padrão de voriconazol, por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Tratamentos	6	$1,088215 \cdot 10^{13}$	$1,813693 \cdot 10^{12}$	4482,4*	2,85
Regressão	1	$1,088022 \cdot 10^{13}$	$1,088022 \cdot 10^{13}$	26889,7*	4,60
Desvio de linearidade	5	$1,935289 \cdot 10^9$	$3,870578 \cdot 10^8$	0,96	2,96
Erro	14	$5,664738 \cdot 10^9$	$4,046242 \cdot 10^8$		
Total	20	$1,088782 \cdot 10^{13}$			

*: significativo para $p < 0,05$.

Tabela 26. Análise de variância dos dados experimentais do ensaio microbiológico do voriconazol em comprimidos, pelo método de difusão em ágar - cilindros em placas.

Fontes de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calc	F tab
Preparação	1	0,025	0,025	0,21	4,20
Regressão	1	421,849	421,849	3595,17*	4,20
Desvio de paralelismo	1	0,150	0,150	1,28	4,20
Quadrático	1	0,004	0,004	0,04	4,20
Diferença de quadrático	1	0,060	0,060	0,51	4,20
Entre doses	5	422,089	84,418	719,44*	2,60
Entre placas	5	1,044	0,209	1,78	2,60
Dentro (erro)	25	2,933	0,117	-	-
Total	35	426,066	-	-	-

*: significativo para $p < 0,05$.

Tabela 27. Análise de variância dos resultados experimentais do doseamento do voriconazol em comprimidos, pelos métodos por CLAE, espectrofotometria no UV e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar, cilindros em placa.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fcalc.	Fcrítico*
Entre grupos	2	5,900946	2,950473	1,2891	3,2381
Dentro dos grupos	39	89,25964	2,288709
Total	41	95,16059

*significativo para $p < 0,05$.

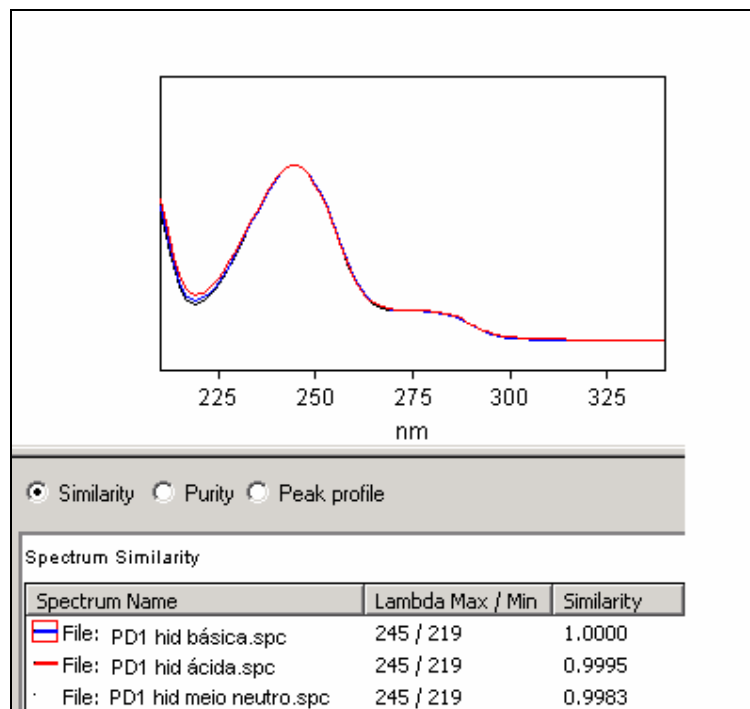


Figura 45. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 2,6 minutos (PD1), obtidos através de hidrólise básica, hidrólise ácida e sob refluxo.

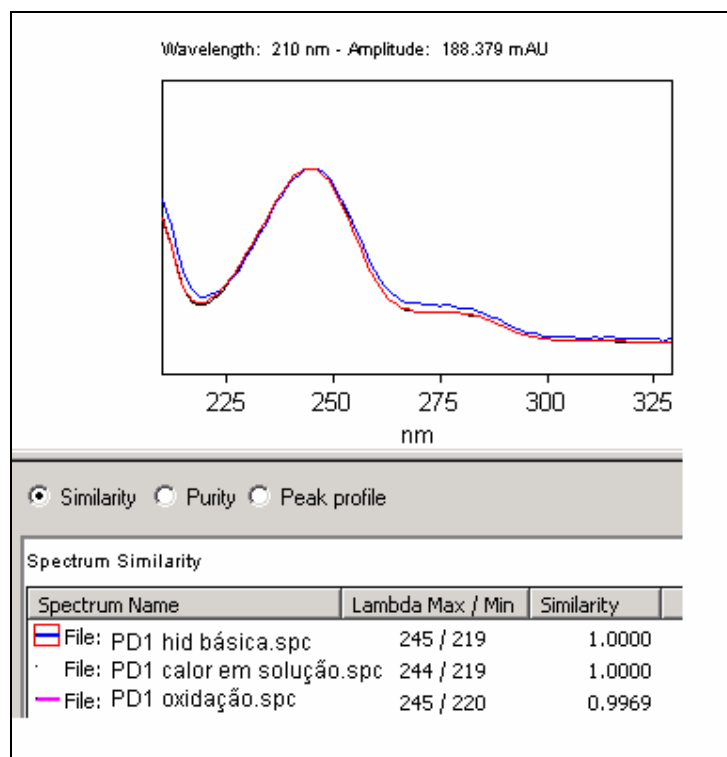


Figura 46. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 2,6 minutos (PD1), obtidos através de hidrólise básica, calor e oxidação.

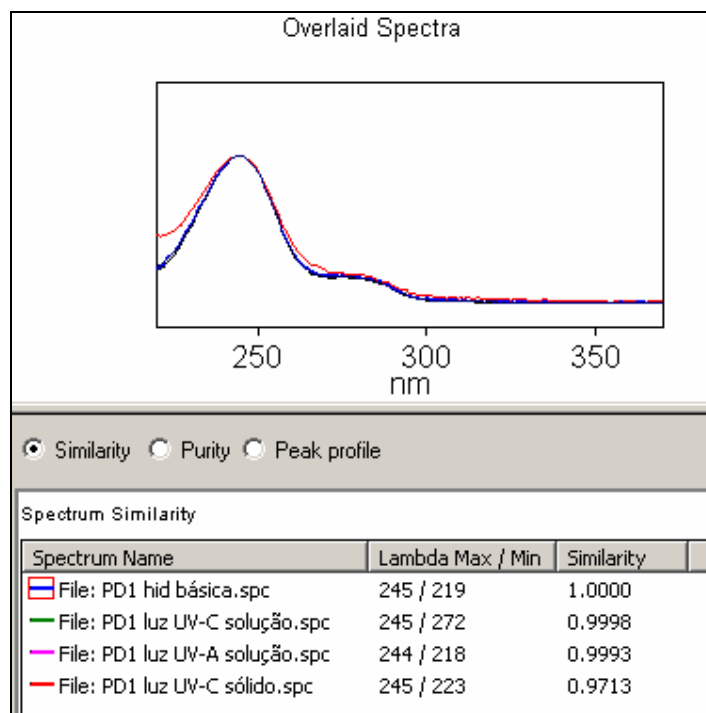


Figura 47. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 2,6 minutos (PD1), obtidos através de hidrólise básica, luz UV-C em solução e em estado sólido e luz UV-A em solução.

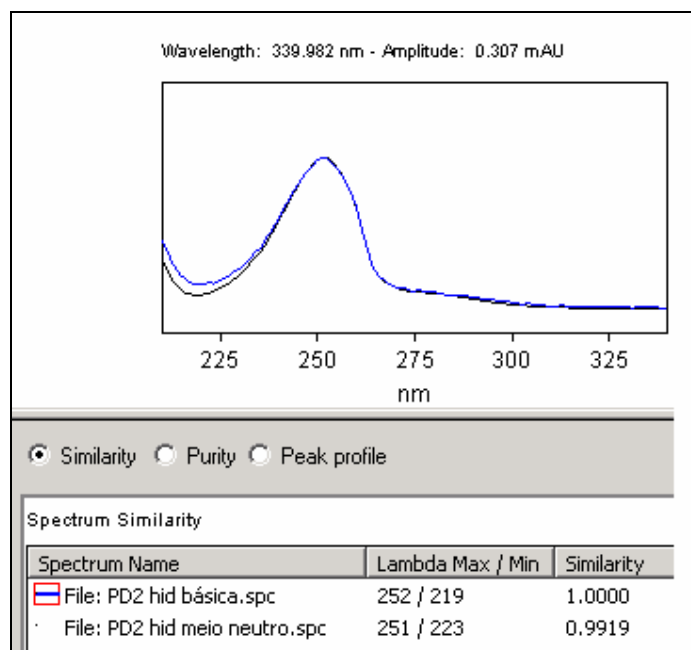


Figura 48. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 3,1 minutos (PD2), obtidos através de hidrólise básica e hidrólise em meio neutro.

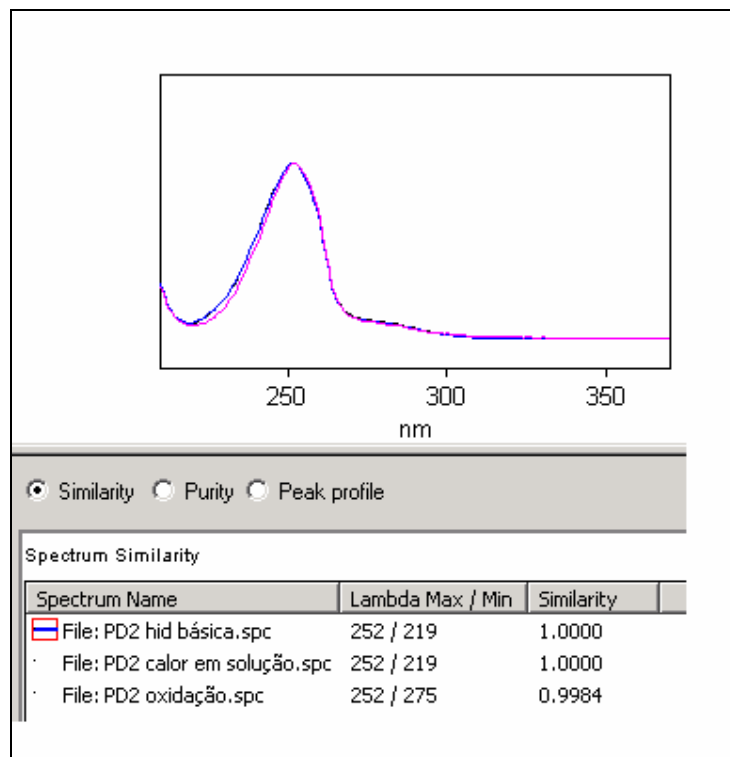


Figura 49. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 3,1 minutos (PD2), obtidos através de hidrólise básica, calor e oxidação.

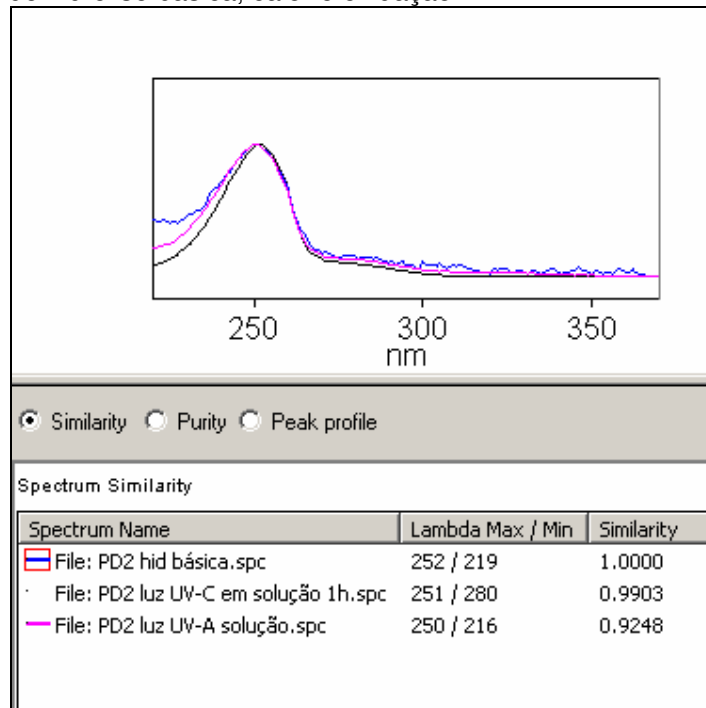


Figura 50. Índice de similaridade dos picos de degradação com TR de 3,1 minutos (PD2), obtidos através de hidrólise básica, Luz UV-C (em solução) e luz UV-A (em solução).

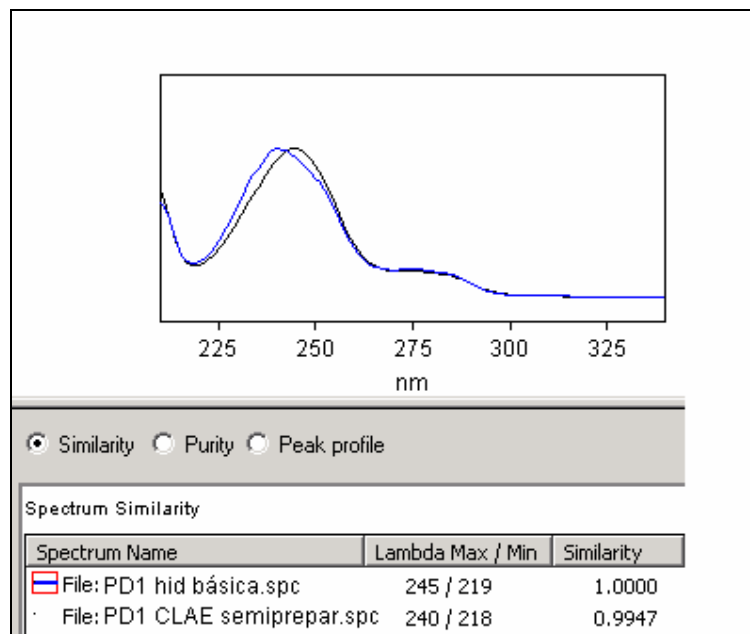


Figura 51. Índice de similaridade dos picos de degradação relativos ao PD1 com TR de 2,6 minutos (CLAE analítica) e 13,7 minutos (CLAE semipreparativa).

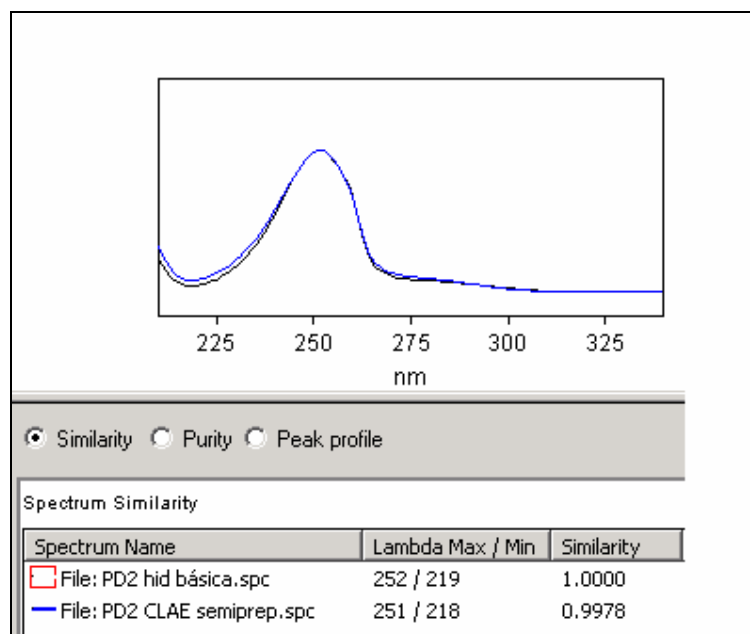


Figura 52. Índice de similaridade dos picos de degradação relativos ao PD2 com TR de 3,1 minutos (CLAE analítica) e 16,0 minutos (CLAE semipreparativa).

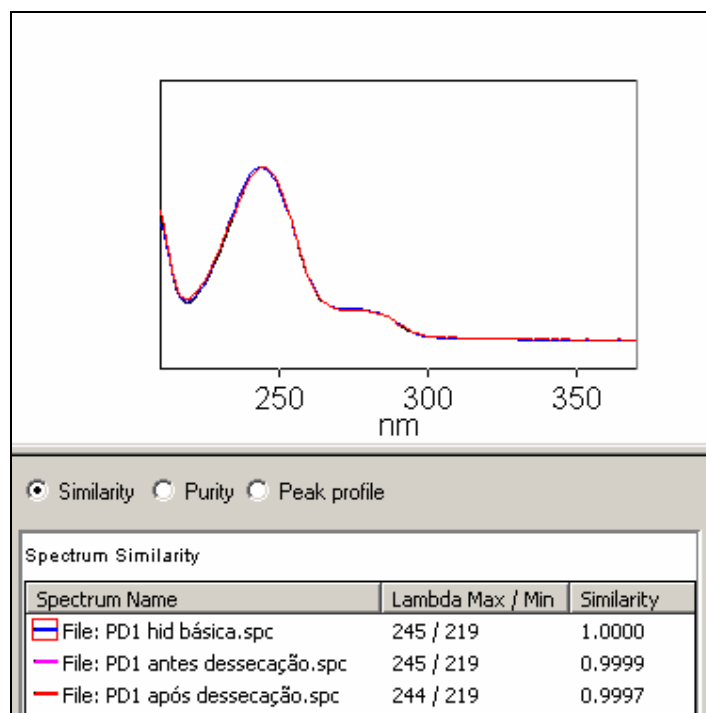


Figura 53. Índice de similaridade da fração PD1 coletada por CLAE semipreparativa, antes e após dessecação em evaporador rotatório, comparada com pico de referência (PD1 hidrólise básica).

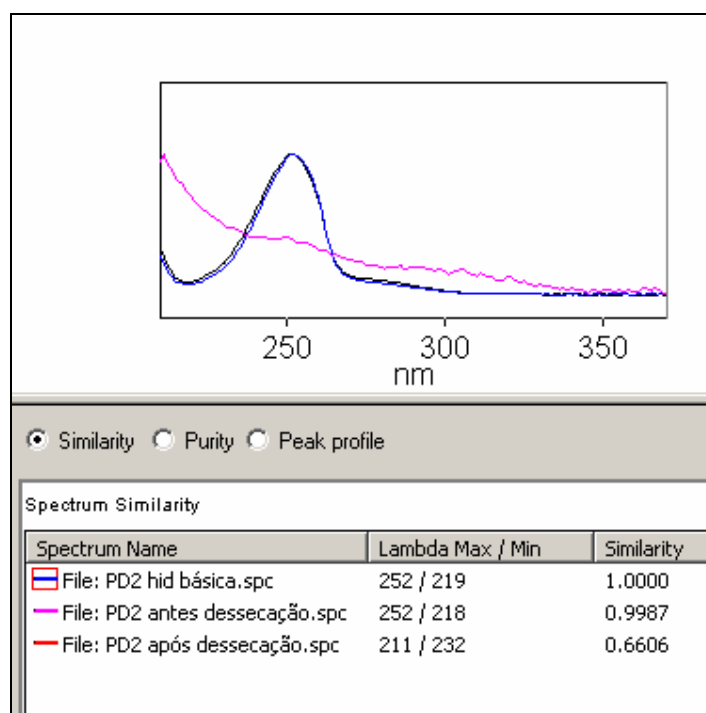


Figura 54. Índice de similaridade da fração coletada por CLAE semipreparativa, antes e após dessecação em evaporador rotatório, comparada com pico de referência (PD2 hidrólise básica).

INSTRUÇÕES PARA ADMINISTRAÇÃO

Vfend® IV (voriconazol) pó para solução para infusão, é apresentado em frasco-ampola para uso único e qualquer solução não utilizada deve ser descartada. O conteúdo do frasco deve ser reconstituído com 19 mL de água para injetáveis, obtendo uma solução cristalina contendo 10 mg/mL de voriconazol e um volume extraível de 20 mL. Descarte o frasco-ampola de Vfend® IV caso o vácuo não empurre o diluente para dentro do frasco. Antes da administração, o volume de solução reconstituída (vide tabela adiante) deve ser adicionado a um diluente de infusão compatível, recomendado a seguir, para produzir, quando apropriado, uma solução final de Vfend® IV, equivalente a 0,5-5 mg/mL de voriconazol.

Volumes Requeridos da solução reconstituída de Vfend® IV 10 mg/mL

Peso Corporal (kg)	Volume da Solução Reconstituída de Vfend® IV (10 mg/mL) necessária para:		
	Dose de 3 mg/kg (número de frascos-ampola)	Dose de 4 mg/kg (número de frascos-ampola)	Dose de 6 mg/kg (número de frascos-ampola)
30	9,0 mL (1)	12 mL (1)	18 mL (1)
35	10,5 mL (1)	14 mL (1)	21 mL (2)
40	12,0 mL (1)	16 mL (1)	24 mL (2)
45	13,5 mL (1)	18 mL (1)	27 mL (2)
50	15,0 mL (1)	20 mL (1)	30 mL (2)
55	16,5 mL (1)	22 mL (2)	33 mL (2)
60	18,0 mL (1)	24 mL (2)	36 mL (2)
65	19,5 mL (1)	26 mL (2)	39 mL (2)
70	21,0 mL (2)	28 mL (2)	42 mL (3)
75	22,5 mL (2)	30 mL (2)	45 mL (3)
80	24,0 mL (2)	32 mL (2)	48 mL (3)
85	25,5 mL (2)	34 mL (2)	51 mL (3)
90	27,0 mL (2)	36 mL (2)	54 mL (3)
95	28,5 mL (2)	38 mL (2)	57 mL (3)
100	30,0 mL (2)	40 mL (2)	60 mL (3)

VFEND® IV, PÓ PARA SOLUÇÃO PARA INFUSÃO, APÓS RECONSTITUIÇÃO E DILUIÇÃO, DESTINA-SE À ADMINISTRAÇÃO POR INFUSÃO INTRAVENOSA. VFEND® IV NÃO DEVE SER ADMINISTRADO COMO INJEÇÃO EM "BOLUS" OU INJEÇÃO INTRAMUSCULAR.

RECOMENDA-SE QUE VFEND® IV, PÓ PARA SOLUÇÃO PARA INFUSÃO, SEJA ADMINISTRADO A UMA VELOCIDADE DE INFUSÃO MÁXIMA EQUIVALENTE A 3 mg/kg POR HORA, DURANTE 1 A 2 HORAS.

Tabela 28. Teores percentuais de voriconazol em bolsas para infusão com cloreto de sódio 0,9%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas por CLAE.

Temperatura		Tempo (dias)							
		0	2	4	7	9	11	14	21
20-25 °C	<i>Teor (%)</i>	100	88,3	83,2	76,4	75,2	76,0	71,6	63,6
	<i>DPR</i>	1,4	1,3	0,9	1,8	1,7	1,2	3,8
4-8 °C	<i>Teor (%)</i>	100	92,3	91,7	91,7	91,2	91,5	89,1	87,3
	<i>DPR</i>	1,25	1,4	0,6	2,1	1,3	1,1	0,6

Tabela 29. Teores percentuais de voriconazol em bolsas para infusão com glicose 5%, mantidas em geladeira e em temperatura ambiente, analisadas por CLAE.

Temperatura		Tempo (dias)							
		0	2	4	7	9	11	14	21
20-25 °C	<i>Teor (%)</i>	100	86,6	87,9	82,4	80,9	75,9	75,5	69,7
	<i>DPR</i>	0,8	2,3	1,1	3,8	1,8	0,7	3,3
4-8 °C	<i>Teor (%)</i>	100	92,4	93,6	92,2	92,9	87,7	89,2	88,0
	<i>DPR</i>	1,0	1,1	0,7	1,3	2,2	2,8	0,4

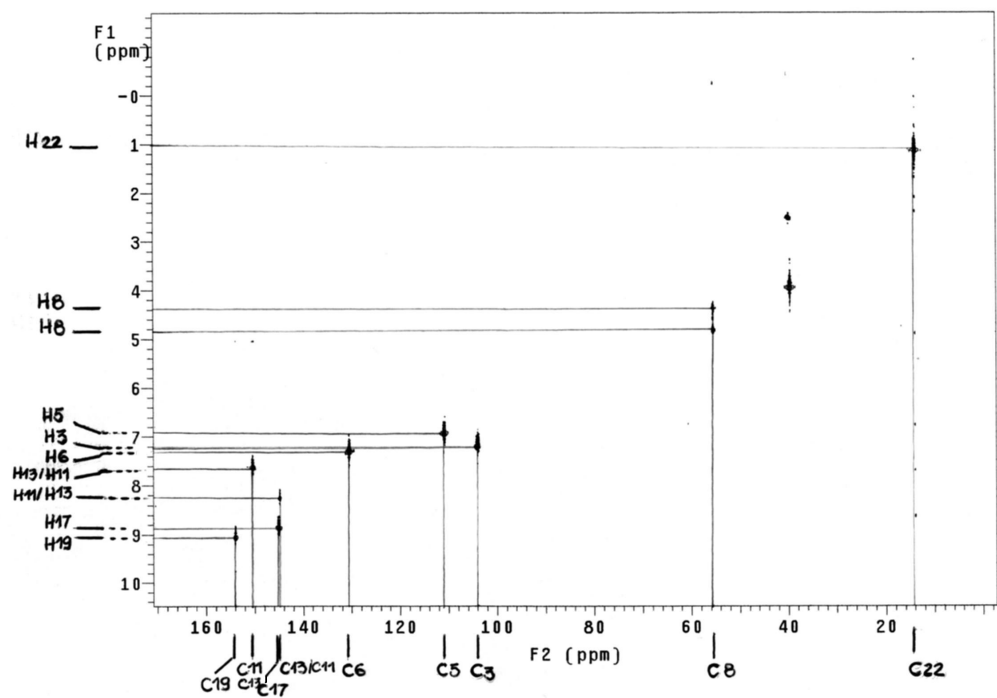


Figura 55. Espectro de RMN – HETCOR do voriconazol (400 MHz, DMSO-D6).

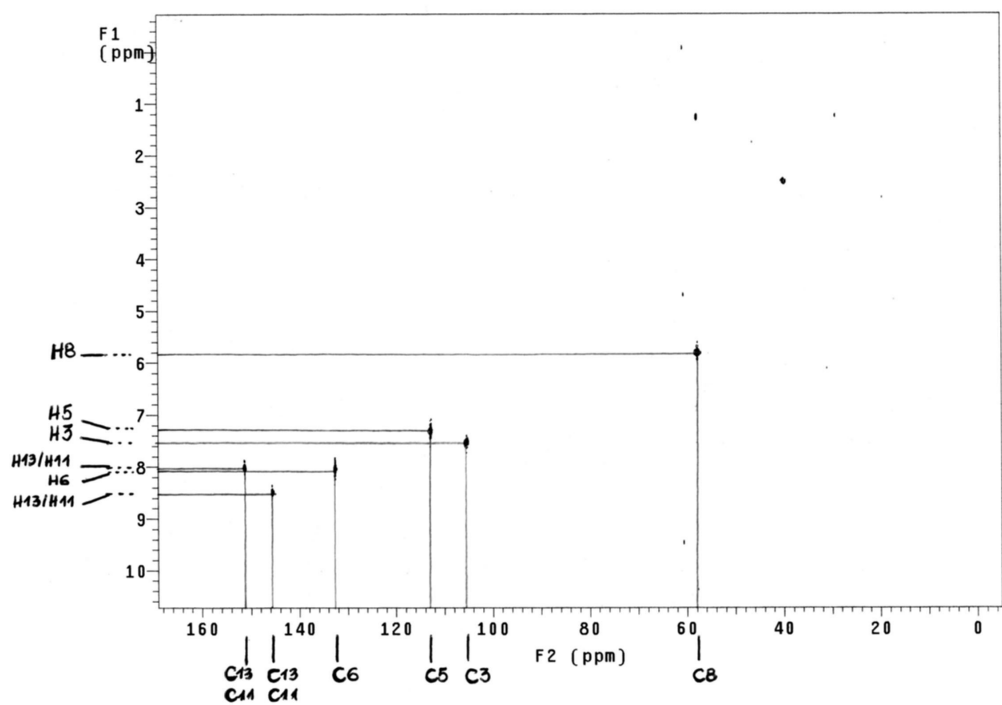
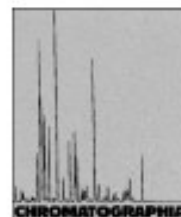


Figura 56. Espectro de RMN – HETCOR do PD1 (400 MHz, DMSO-D6).

Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Voriconazole Content in Tablets



A. I. H. Adams^{1,2}, A. M. Bergold^{2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacéutica, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
² Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil; E-Mail: bergold@farmacia.ufrgs.br

Received: 9 May 2005 / Revised: 17 June 2005 / Accepted: 20 July 2005
Online publication: 23 September 2005

Abstract

This paper describes the validation of an isocratic HPLC method for the assay of voriconazole in tablets. The method employs a Merck LiChrospher® 100 RP8 (12.5 × 4.6 mm I.D., 5 µm particle size) column, with a mobile phase of methanol : triethylamine solutions 0.6 %, pH 6.0 (50:50, v/v) and UV detection at 255 nm. A linear response ($r > 0.9999$) was observed in the range of 20.0–100.0 µg mL⁻¹. The method showed good recoveries (average 100.4%) and the relative standard deviation intra and inter-day were ≤ 1.0 %. Validation parameters as specificity and robustness were also determined. The method can be used for both quality control assay of voriconazole in tablets and for stability studies as the method separates voriconazole from its degradation products and tablet excipients.

Keywords

Column liquid chromatography
Antifungal agents
Voriconazole assay
Voriconazole tablets
Quality control

Introduction

The past two decades have witnessed an increase in serious fungal infections, without a corresponding growth in new antifungal agents. Voriconazole (Fig. 1) is a novel broad spectrum antifungal agent, recently approved for use by FDA, for treatment of serious infections caused by *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* and resistant *Candida* species [1]. It is a second generation triazole and is the result of a discovery program aimed at improving the potency and spectrum of

fluconazole. Voriconazole is structurally related to fluconazole, one of the triazole moieties in fluconazole is replaced by a fluoropyrimidine group and an alpha methyl group is also introduced. Voriconazole is more active than 2 reference triazoles, fluconazole and itraconazole, against *Candida* spp. [2].

Several analytical HPLC methods, with different detection modes, have been published for the determination of voriconazole in biological fluids, including plasma [3–8], vitreous and aqueous humor [9–10]. Pena et al. [5] compared

the results of their HPLC method with those obtained by microbiological assay. Capillary zone electrophoresis was used by Cargo et al. [11] to separate many antifungals and their metabolites in liver human microsomes. Coupled achiral-chiral HPLC was described for use in qualitative and quantitative determination of the potential impurities of voriconazole [12]. However, no methods are reported for use in the determination of voriconazole in its pharmaceutical forms. Since the use of this antifungal is increasing there is a need to develop and validate analytical methods for the determination of voriconazole in pharmaceutical dosage forms.

This study describes a HPLC method for the assay of the drug in tablets using a reversed-phase column with UV spectrophotometric detection. This method was validated following ICH guidelines [13].

Experimental

Reagents

HPLC grade methanol and sodium hydroxide, hydrochloric acid, potassium permanganate, triethylamine, orthophosphoric acid (reagent grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water ($> 18 \mu\Omega$), purified by a Millipore MilliQ Plus water system (Billerica, USA), was used to prepare the mobile phase and the sample and standard solutions. Voriconazole reference substance

Short Communication
DOI: 10.1365/s10337-005-0629-1

© 2005 Fricke, Vieweg & Sohn/GWV Fachverlag GmbH

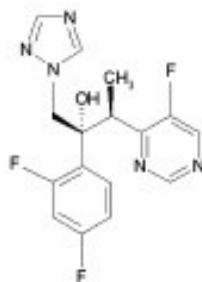


Fig. 1. Chemical structure of voriconazole

(assigned purity 99.75%) was obtained from Genco Pacific Limited (Hong Kong). Voriconazole tablet (Vfend[®], 50-mg tablets) were analysed.

Equipment and Chromatographic Analysis

The development and validation of the assay was performed on a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) provided with a LC-10AD_{VP} pump, a Rheodyne manual injector, a SPD-M10A_{VP} diode array detector, DGU-14A degasser and an SCL-10A_{VP} controller with CLASS-VP software. Chromatographic analyses were performed on a Merck LiChrospher[®] 100 RP-8 (125 × 4.6 mm I.D., 5 μm particle size) column.

The flow rate of the mobile phase was 1 mL min⁻¹ and the injection volume was 20 μL. UV detection was performed at 255 nm. Peak identity was confirmed by both retention times comparison and comparison spectra obtained from the photodiode array detector (PDA detector).

Preparation of the Mobile Phase

A mobile phase composed by methanol and triethylamine solution 0.6%, pH 6.0 (50:50, v/v). The pH was adjusted to pH 6.0 using 18% orthophosphoric acid. The mobile phase was degassed by sonication and vacuum prior to use, and was also degassed during the analysis using the degasser of the chromatographic system.

Preparation of Standard Solution

The stock solution of voriconazole reference substance (0.5 mg mL⁻¹) was

prepared in methanol; since the drug is freely soluble in this solvent. The working standard solution (50 μg mL⁻¹) was obtained by dilution of the stock solution in water.

Preparation of Sample Solution

Twenty tablets were weighed to get the average weight, and then they were ground. A quantity of the powdered tablets, equivalent to 12.5 mg of voriconazole, was transferred to 25 mL volumetric flasks. 15 mL of methanol were then added, shaken for 10 min by a mechanical shaker and diluted to volume with methanol, to provide a solution containing 0.5 mg mL⁻¹ voriconazole. The solution was filtered and an aliquot of the filtrate diluted with water to 50 μg mL⁻¹ to produce the working sample solution.

Robustness

The robustness was evaluated by variations in the mobile phase, including pH values and composition. The stability of the analytical solutions and reference substance stock solutions was also determined.

The stability of the solutions was assessed by monitoring the peak area. Standard working solutions were analyzed immediately after their preparation and 24, 48 and 72 h after. The solutions were kept at 25 °C, either exposed to day light or in the dark. The stability of stock solutions of reference substance was also determined. Solutions were kept at 4 °C, for a period of 38 days and analyzed periodically.

Method robustness was assessed by deliberately modifying the operating conditions of the method and measuring chromatographic parameters such as retention time, resolution, tailing factor, number of plates, capacity factors. In addition, samples were analyzed at each modified condition, to assess any impact on assay results.

Specificity

Chromatographic runs of a placebo solution and forced degradation studies were performed in order to provide an indication of the stability-indicating

properties and specificity of the method. The degradation samples were prepared by transferring powdered tablets, equivalent to 25 mg of voriconazole, into 50 mL volumetric flasks. The stress conditions employed were acid, base, neutral and oxidant media, heat, moisture and light. After the degradation treatments were completed, the samples were allowed to equilibrate to room temperature, neutralized with acid or base (when necessary), and diluted with water to 0.1 mg mL⁻¹. The samples were analyzed against a freshly prepared control sample (with no degradation treatment). Specific conditions are described below.

Effects of Moisture and Heat

Thin layers of powdered tablets were distributed over a glass plate to evaluate the effect of moisture. The plates were stored at 75% UR, room temperature or at 80% UR, 70 °C, for 48 h. A similar sample was kept in an oven at 70 °C for 48 h to study the effect of heat. After the specified time, solutions of 0.5 mg mL⁻¹ in methanol were prepared and these were diluted to 0.1 mg mL⁻¹ with water.

Effect of UV light

2 mL of a 1 mg mL⁻¹ voriconazole solution were added into a transparent container. This was exposed to UV light (352 nm) for 22 h in a chamber (17 × 17 × 100 cm) which had totally mirrored internal surfaces. Samples submitted to identical conditions, but protected of light, were used as a control. After the degradation treatment, the content of the containers was diluted to 80 μg mL⁻¹, with water.

Effect of Oxidation

A 1 mg mL⁻¹ of a methanolic solution of voriconazole was prepared from tablets. 5 mL of this solution was added to 5 mL of a 5% potassium permanganate solution, and allowed to react for 3 h. After that, the solution was diluted with water and filtered. It was done a control solution, by the reaction of 5 mL methanol with the oxidant medium.

Effect of Acid, Alkaline and Neutral Hydrolysis

10 mL of a 0.5 mg mL⁻¹ voriconazole solution were transferred to a flask and

Short Communication

5 mL of either 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH or water, respectively, were added. The acidic solution was heated for 2 h, at 80°C; the alkaline was left to react at room temperature for 30 min; and the neutral solution was refluxed for 4 h. After that, samples were allowed to equilibrate to room temperature, neutralized with base or acid as appropriate and then diluted with water to 0.1 mg mL⁻¹.

Linearity

Linearity of the method was verified by analyzing of seven solutions in the range of 20 to 100 µg mL⁻¹ (corresponding to 40-200% of nominal sample concentration), in triplicate. An ANOVA statistical evaluation was performed.

Accuracy and Precision

A recovery study was performed by adding known amounts of voriconazole to sample solution. The actual and measured concentrations were then compared. Sample solution of 0.5 mg mL⁻¹ was prepared, as described in sample preparation. From the filtered solution, aliquots of 2 mL were transferred to 50 mL volumetric flasks, containing 1.5, 3.0 and 4.5 mL of voriconazole standard solution (0.5 mg mL⁻¹). Ultrapure water was added to make up the volume, given final concentrations of 35, 90 and 65 µg mL⁻¹, respectively, which correspond to 70, 100 and 130% of the nominal analytical concentration (50 µg mL⁻¹). Each level was made in triplicate.

Method repeatability (intra-day precision) was evaluated by assaying six samples, prepared as described in sample preparation, during the same day, by the same analyst. The intermediate precision was studied by comparing the results of the assay on different days (3 days).

Results and Discussion

HPLC methods have been widely employed in pharmaceutical analysis. They have gained popularity in stability studies due to its high-resolution capacity, sensitivity and specificity. In this study, a reversed-phase HPLC method was proposed to quantify voriconazole in tablets. Mobile phase selection was based on

Table 1. Results of the method robustness study

Variations	Retention time	Tailing factor	Theoretical plates	Capacity factor	Resolution	Assay as % of label claim
Mobile phase prepared ^a	8.65	1.44	2725	5.5	19.2	101.3
Methanol content 47% ^b	11.27	1.31	3066	7.7	17.4	101.5
Methanol content 53% ^b	6.35	1.64	2726	4.3	16.7	101.7
Aqueous phase pH 5.0 ^c	8.62	1.45	3042	5.6	18.1	100.9
Aqueous phase pH 7.0 ^c	8.35	1.45	3048	4.4	17.5	100.5

^amethanol:triethylamine solution 0.6%, pH 6.0 (50:50, v/v).

^bvalue of pH = 6.0.

^cproportion of organic and aqueous phase 50:50, v/v.

Table 2. Degradation studies performed on voriconazole in 50 mg VFin d[®] tablets

Conditions	Time	% recovered	Retention time of degradation products
Base, 0.1 N NaOH, room temperature	30 min	23.5	2.6, 3.1
Acid, 0.1 N HCl, 80 °C	2 h	88.8	2.6
Neutral, water, reflux	4 h	99.0	2.7, 3.1
Oxidant, 5% potassium persulfate solution, room temperature	3 h	83.3	3.0, 3.4, 4.6, 7.7
Dry heat, 70 °C	48 h	99.0	None detected
Wet heat, 70 °C, 80% RH	48 h	99.0	None detected
Wet, 75% RH, 25 °C	48 h	100.8	None detected
UV light, 352 nm	22 h	95.8	None detected

peak parameters (symmetry, theoretical plates, capacity factor and resolution), run time, ease of preparation and cost. The preliminary trials using different compositions of mobile phases consisting of methanol and triethylamine solutions, and a C-18 column gave poor peak shape and high tailing factors. Acceptable separations, (Table 1) with a retention time of 8.5 min for voriconazole, was obtained using a C-8 Merck column and a mobile phase composed of methanol: 0.6% triethylamine solution, pH 6.0 (50:50, v/v).

Robustness

In order to study the robustness of the proposed method, deliberate modifications in organic composition and pH values of the mobile phase were made. The results are shown in Table 1. It can be seen that in every employed condition, the chromatographic parameters are in accordance with established values [14] and the assay data remained acceptable. A change of ± 1 unit of pH value around 6.0 (pH of mobile phase) had no impact on chromatographic performance and did not generate any extra peaks. This indicates that, in the range of pH 5.0-7.0, voriconazole is in the non-ionized form,

which is in accordance with its pKa value of 1.76 [15]. The retention time increased to approximately 11.3 min when the methanol content was reduced to 47%.

The stability of standard stock and working solutions was assessed. The solutions were kept at 25 °C, either exposed to day light or in the dark; the change in voriconazole peak area over 72 h was 0.5% and 0.34%, respectively, and there was no change in chromatographic parameters for the drug peak.

A result of 100.9% of the initial potency of standard stock solutions kept at 4 °C for a period of 58 days, showed that they remain with acceptable stability.

Specificity

To be considered specific, an assay method should demonstrate that it can separate and quantify the drug from a physical mixture of the drug, degradation products and excipients. Peak purity can be established by a variety of techniques with PDA detection being the most popular. The potential degradation chemistry can be postulated based on the reported behavior of other similar drugs in a class. A few stability studies of fluconazole have been reported relating to the

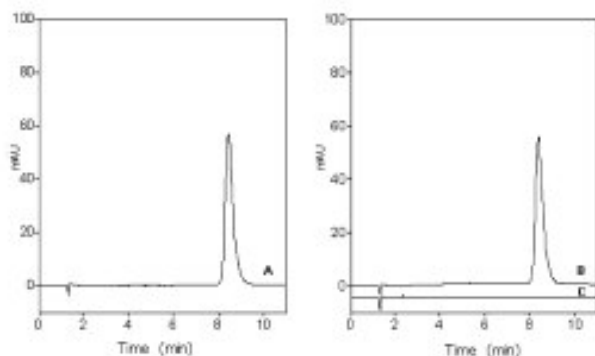


Fig. 2. Chromatograms of voriconazole reference substance ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (A), voriconazole tablet ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (B) and placebo solution (C)

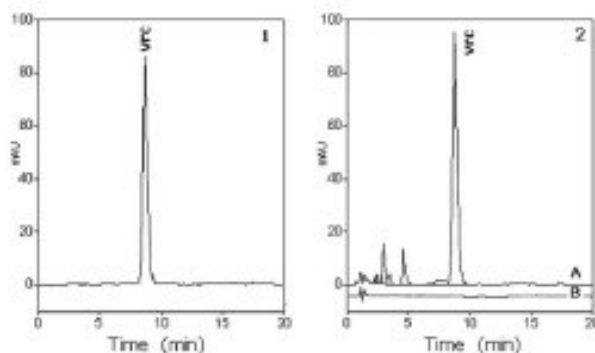


Fig. 3. Chromatograms of voriconazole sample solution after exposition to UV light (1), voriconazole sample solution (2A) and blank solution (2B) after oxidation with 5% potassium permanganate solution (v/v): voriconazole peak

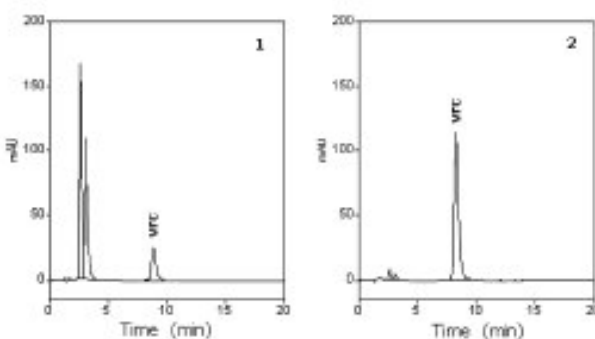


Fig. 4. Chromatograms of voriconazole sample solution after basic stress (1), voriconazole sample solution after neutral stress (2) (v/v): voriconazole peak

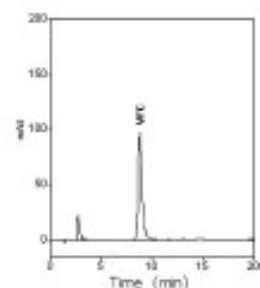


Fig. 5. Chromatogram of voriconazole sample solution after acid stress (v/v): voriconazole peak

stability of infusion solutions [16–20]. Voriconazole solution was submitted to forced degradation studies to induce degradation. Results and general conditions are described in Table 2. Besides, chromatographic runs of a placebo solution were also made (Fig. 2C).

When submitted to heat and moisture, no degradation peaks were detected and the voriconazole content remained constant (chromatograms not showed).

Under UV radiation (352 nm), the voriconazole content exhibited slight decrease, but no additional peaks were detected (Fig. 3). This may indicate that the degradation products had no chromophore or that voriconazole decomposes to yield low molecular weight fractions.

To promote oxidation, voriconazole solutions were mixed with hydrogen peroxide solutions of varying concentrations. No degradation peaks were observed and the recovery content was around 96%. Voriconazole is expected to suffer oxidation, because it has a secondary alcohol function. Therefore the oxidation was attempted with 5% potassium permanganate solution. The content of voriconazole decreased to around 83.3%. Peaks in the range of 1.0 to 2.0 min were also detected in the blank solution (Fig. 3).

Comparisons of spectra and retention times of degradation products observed in acid, basic and neutral conditions indicated that they were probably the same. The reaction was more intense and quicker in alkaline condition (Fig. 4–8). This is in accordance with the information given by the manufacturer, which

Short Communication

recommends that voriconazole injection must not be diluted with 4.2% sodium bicarbonate infusion. Due to the mildly alkaline nature of this diluent, it is observed slight degradation of Vfend® after 24 h storage at room temperature [21].

In all the employed conditions any observed degradation peaks were resolved from the voriconazole peak. Spectra taken during the upslope, apex and downslope by the PDA detector indicate that no impurities or degradation products were co-eluting with the active. The chromatographic run of a placebo solution showed no interference of the excipients with the elution of voriconazole.

Linearity

Good linearity was observed over the concentration range of 20 to 100 µg mL⁻¹, with a correlation coefficient of 0.9999 and the linear regression equation $y = -923.76 + 27569.82x$. The validity of the assay was verified by means of the ANOVA. According to it, there are linear regression and there are no deviation from linearity ($P = 0.05$).

Accuracy and Precision

The accuracy of the method was evaluated and the mean recovery obtained for each level, as well as for all levels (100.4%) showed that the method is accurate (Table 3).

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) and was expressed as relative standard deviations (R.S.D.) of a set of results. Results presented in Table 4 indicate good repeatability and low inter-day variability (R.S.D. maximum 1.0%).

Conclusion

The developed HPLC method is very simple and results confirm suitable accuracy, specificity and precision. Therefore, the method could be useful for both routine analytical and quality control assay of voriconazole in tablets and stability studies.

Acknowledgments

The authors wish to thank to the Brazilian Pharmacopoeia and Cristália Labo-

Short Communication

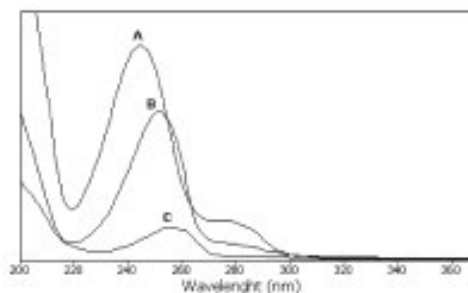


Fig. 6. UV/PDA spectrum of degradation products obtained from alkaline stress of voriconazole solution. Degradation product (A), retention time 2.6 min, λ max 245 nm. Degradation product (B), retention time 3.1 min, λ max 251 nm. Voriconazole (C), λ max 255 nm

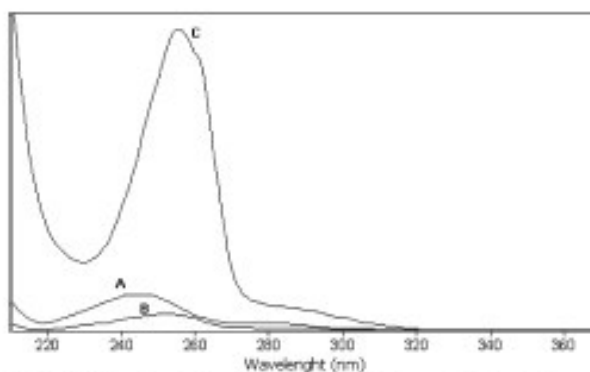


Fig. 7. UV/PDA spectrum of degradation products obtained from neutral stress of voriconazole solution. Degradation product (A), retention time 2.7 min, λ max 245 nm. Degradation product (B), retention time 3.1 min, λ max 251 nm. Voriconazole (C), λ max 255 nm

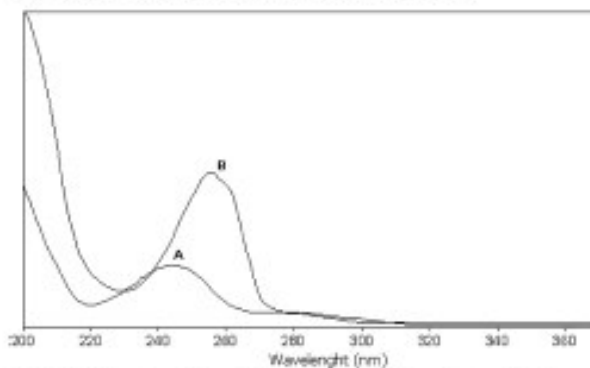


Fig. 8. UV/PDA spectrum of degradation products obtained from acid stress of voriconazole solution. Degradation product (A), retention time 2.6 min, λ max 245 nm. Voriconazole (B), λ max 255 nm

Table 3. Accuracy of method determined by recovery of voriconazole from tablet solutions spiked with a standard solution

Sample	Level	% Recovery	Mean (3)	% R.S.D
1	70	100.52	100.5	0.05
2		100.55		
3		100.57		
1	100	101.35	100.3	1.7
2		98.43		
3		100.52		
1	130	102.24	100.4	2.0
2		98.20		
3		100.71		
Mean (9)	100.4			
% R.S.D.	1.3			

Table 4. Method repeatability/intermediate precision for voriconazole

Sample	% label claim		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	98.8	98.7	100.7
2	99.8	101.4	101.0
3	98.4	100.0	101.0
4	99.0	99.8	100.2
5	100.1	99.0	100.1
6	100.9	98.8	101.4
Mean (6)	99.5	99.6	100.7
% R.S.D.	0.9	1.0	0.5
Mean (18)	100.0		
% R.S.D.	1.0		

ratories (Brazil) for supply of the reference substance.

References

1. Ghannoum MA, Kuhn DM (2002) *Eur J Med Res* 7 (5):242-256
2. Mastroni JA (2004) *CMI* 10 (Suppl.1): 1-10
3. Sopher DA, Gage R (1997) *J Chromatogr B* 691:441-448
4. Gage R, Sopher DA (1996) *J Pharm Biomed Anal* 17:1449-1453
5. Patta S, Pennick GJ, Modak A, Fothergill AW, Sutton DA, Sheehan DJ, Rinaldi MG (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44 (5):1209-1213
6. Pennick GJ, Clark M, Sutton DA, Rinaldi MG (2003) *Antimicrob Agents Chemother* 47 (7):2348-2350
7. Pabonq F, Jany C, Banavath B (2004) *Biomed Chromatogr* 18 (9):719-722
8. Egle H, Triller R, König A, Kammere K (2005) *J Chromatogr B* 814:361-367
9. Zhou L, Glickman RD, Chen N, Sponzel WE, Graybill JR, Lam KW (2002) *J Chromatogr B* 776:213-220
10. Hanjraat SM, Miller WF, Holz ER, Gao H, Kim JR, Chm JD, Prince RA (2006) *Arch Ophthalmol* 122 (1):42-47
11. Crogo AI, Gomez J, Medina MI, Lavandera B. (2001) *Electrophoresis* 22:2503-2511
12. Ferruti R, Gallinella R, La Torre F, Zucchi L. (1998) *Chromatographia* 47 (11-12):649-654
13. ICH (1996) Harmonized Tripartite Guideline Validation of analytical procedures: methodology Q2B, Sep. 4.
14. CDER (1994) Reviewer guidance for validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research - FDA.
15. Capitel®. www.capitel.com/CapitelofProductApprovals.pdf. Accessed in 08/20/05.
16. Couch P, Jacobson P, Johnson CE (1992) *Am J Hosp Pharm* 49:1459-1462
17. Han S-Pagitt AK, Hennessy CK, Kacari-an CM (1995) *Am J Hosp Pharm* 50:1186-1187
18. Inagaki K, Takagi J, Lee E, Kim-hi I, Nii L, Geli M (1995) *Am J Hosp Pharm* 50:1206-1208
19. Johnson C, Jacobson P, RhenHA, Woycik CL (1993) *Am J Hosp Pharm* 50:703-706
20. Yamadaewong W, Lopez-Anaya A, Rappaport H (1995) *Am J Hosp Pharm* 50:2366-2367
21. VFeed®. www.vfeed.com/download/urpl_vfeed.pdf. Accessed in 08/17/2004

Short Communication

DRUG FORMULATIONS AND CLINICAL METHODS

Comparison of Microbiological and UV-Spectrophotometric Assays for Determination of Voriconazole in Tablets

ANDRÉA I.H. ADAMS

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

Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

MARTIN STEFLE, PEDRO E. FRÖHLICH, and ANA M. BERGOLD¹

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

Two methods have been developed for the determination of voriconazole, a new antifungal drug, in tablets. A UV method, with detection at 255 nm, was compared with a diffusion agar bioassay, which used *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 as the assay organism. The developed methods were linear in the range of 3.0–12.0 and 12.0–24.0 µg/mL, for the microbiological and UV methods, respectively, both exhibiting a coefficient correlation of 0.9999. The UV method demonstrated an improved precision compared to the bioassay method (1.0 versus 2.4%). The average recovery, 99.8 and 100.9%, was suitable in both methods. The results obtained by these 2 methods were compared with those of a high-performance liquid chromatography (HPLC) method published previously, and no evidence of significant difference was observed. The proposed methods are appropriate for the determination of voriconazole in tablets and can be used in routine quality control.

Voriconazole, (2*R*,3*S*)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-fluoro-4-pyrimidinyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butan-2-ol (Figure 1), is a triazole antifungal drug licensed for the treatment of invasive fungal infections. It is especially recommended for the treatment of invasive aspergillosis, which is the most common life-threatening invasive mold infection worldwide, and for the treatment of infections caused by *Scedosporium*, *Fusarium* spp., and resistant *Candida* species (1). The chemical structure of voriconazole is similar to that of fluconazole; the replacement of one triazole moiety by a fluoropyrimidine group and an alpha methylation resulted in an enhanced spectrum of antifungal activity and in increased *in vitro* potency (2).

A survey of the literature revealed several analytical liquid chromatography (LC) methods, with different detection modes, for the determination of voriconazole in biological fluids (3–10) and for the determination of the potential impurities of voriconazole (11). Perea et al. (5) compared the results of an LC method with those obtained by microbiological assay. Capillary zone electrophoresis methods were developed by Crego et al. to separate many antifungals and their metabolites in human liver microsomes (12), and to determine antifungal agents in other biological samples (13).

The use of this drug is increasing, because it represents an alternative to amphotericin B treatment in invasive fungal infections. Therefore, considering that there is no official method for the quality control of this drug, there is a need to develop and validate analytical methods for the determination of voriconazole either as bulk substance or incorporated in pharmaceutical dosage forms.

Previously, we developed an LC method for the determination of voriconazole in tablets (14). The aim of this study was to develop and validate other methods for the analysis of voriconazole in pharmaceutical form, which should represent a sensitive, reproducible, and accurate alternative to the LC method.

Experimental

Chemicals

(a) *Voriconazole*. Reference substance (assigned purity 99.75%) was obtained from Ciencor Pacific Ltd (Hong Kong).

(b) *VFend*[®], 50 mg voriconazole tablets (Tfizer, Germany).—Obtained in a Brazilian hospital.

(c) *Excipients*.—Reported by the manufacturer. The inactive ingredients include lactose monohydrate, pregelatinized starch, croscarmellose sodium, povidone, magnesium stearate, and a coating containing hypromellose, titanium dioxide, and triacetin. All were obtained from different local distributors.

(d) *Sabouraud-dextrose*, 2%.—Obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

(e) *Water*. Distilled water was used in all experiments.

¹Received September 5, 2005. Accepted by JM December 22, 2005.

Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: bergold@farmacia.ufrgs.br

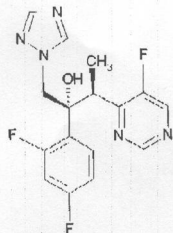


Figure 1. Chemical structure of voriconazole.

(f) *Buffer No. 1.*—2.0 g dibasic potassium phosphate and 8.0 g monobasic potassium phosphate in 1000 mL water. The pH was adjusted with 18 N phosphoric acid or 10 N potassium to 6.0 ± 0.05 (15).

(g) *Other reagents.*—Reagents of analytical grade, from different distributors, were used.

Preparation of Reference Substance Solutions

(a) *Microbiological assay.*—The stock solution of voriconazole (0.3 mg/mL) was prepared in methanol, by the transference of 15 mg voriconazole reference substance to a 50 mL volumetric flask. Aliquots of this solution were diluted with buffer No. 1, 1%, pH 6.0 (15), to concentrations of 3.0, 6.0, and 12.0 $\mu\text{g/mL}$, which were used in the assay.

(b) *UV spectrophotometric assay.*—Prepared from a stock solution containing 0.5 mg/mL voriconazole reference substance in methanol, which was diluted to 18 $\mu\text{g/mL}$ with water.

Preparation of Sample Solutions

Twenty tablets were weighed to determine the average weight, and then finely powdered.

(a) *Microbiological assay.* A quantity of the tablets' powder equivalent to 15 mg voriconazole was transferred to a 50 mL volumetric flask; 15 mL methanol was added, shaken for 10 min by mechanical shaker, and diluted to volume with methanol, to provide a solution containing 0.3 mg/mL. The solution was filtered and aliquots of the filtrate were diluted with buffer No. 1, 1%, pH 6.0 (15), to concentrations of 3.0, 6.0, and 12.0 $\mu\text{g/mL}$, which were used in the assay.

(b) *UV spectrophotometric assay.*—A quantity equivalent to 4.5 mg voriconazole was transferred to a 25 mL volumetric flask, shaken for 10 min by mechanical shaker, and diluted to volume with methanol. The solution was filtered, and an aliquot of 5 mL of the filtrate was diluted with water to 18 $\mu\text{g/mL}$.

Microbiological Method

(a) *Microorganism and inoculum.*—Cultures of *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 were cultivated on Sabouraud 2% agar (Merck) and maintained on slants in the refrigerator ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). At 48 h before the experiment, the culture was transferred to another Sabouraud agar, 2%, which

was kept in a stove at 25°C . The microorganism was suspended in 0.9% NaCl; the concentration in the obtained suspension was fit to $25 \pm 2\%$ of transmittance at 580 nm, using a suitable spectrophotometer (Analyzer-Model 800; Analítica, São Paulo, Brazil) and a 10 mm diameter test tube as absorption cell against 0.9% NaCl as blank. For the biological assay of voriconazole, 1 mL of this suspension was added to 100 mL Sabouraud 2% agar, kept at 48°C , and used as inoculated layer.

(b) *Cylinder-plate assay.*—The agar was composed by 2 separate layers. A 20 mL amount of Sabouraud 2% agar was poured into Petri dishes (100×20 mm) for the base layer. After its solidification, a 5 mL portion of inoculated Sabouraud 2% agar was poured onto the base layer. Six stainless steel cylinders of uniform size ($8 \times 6 \times 10$ mm) were placed on the surface of the inoculated medium in each plate. Three alternated cylinders were filled with 100 μL reference substance solutions (described above) and the other 3 with the sample solutions (described above), in a manner to avoid interaction of the 2 more concentrated solutions. After incubation (30°C for 24 ± 2 h), the diameters of the inhibition zone of the microorganism growth (mm) were measured using an electronic digital caliper (Starret[®]). Six assays were performed (2 assays each day) using 6 plates in each one.

(c) *Potency calculation.*—The potency of voriconazole tablets was calculated by the Hewitt equation (16). The assay was treated statistically by the linear parallel model and by linear regression analysis. Analysis of variance (ANOVA) was used to verify the validity of the assay (17–19).

UV Method

The development and validation of the assay was performed in a Shimadzu UV-visible spectrophotometer (UV-1601 PC; Kyoto, Japan). The concentration of the solutions was determined at 255 nm, against a mixture of

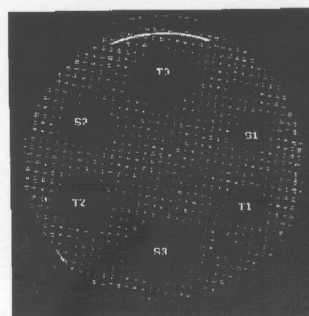


Figure 2. Diffusion agar bioassay of voriconazole, using a strain of *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 as test organism, voriconazole solutions at concentrations of 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (S1 and T1), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (S2 and T2), and 12.0 $\mu\text{g/mL}$ (S3 and T3). S = Standard solution; T = sample solution.

Table 1. Conditions tested to establish the parameters for microbiological assay of voriconazole

Parameter	Condition
Standard curve points, $\mu\text{g/mL}$	1, 2, and 4; 2, 5, and 12.5; 2.5, 5, and 10; 3, 6, and 12
Agar disposition	1 or 2 layers
Volume of solutions added into the cylinders, μL	100 or 200
Buffer solution pH	5.0, 6.0, and 7.0
Inoculum, %	0.5, 0.75, 1.0, and 1.5
Incubation time, h	18 and 24

methanol-water (1:9), that represents the same proportion used in the sample and reference substance solutions. Methanol was used as initial diluent, because the drug is freely soluble in this solvent, and the subsequent dilutions were made with water.

Methods Validation

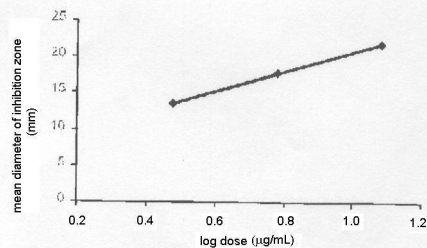
Both methods were validated by the following parameters: linearity, precision, and accuracy (15, 20).

(a) *Linearity.* To assess the linearity of the methods, doses of reference substance were evaluated on 3 different days. The regression lines were calculated by the least-squares method. The statistical evaluation was made by ANOVA (17). For the microbiological assay, the calibration curves were obtained with 3 doses of the reference substance, at 3.0, 6.0, and 12.0 $\mu\text{g/mL}$. For the UV method, the linearity was verified by analysis of 7 points in the range of 12–24 $\mu\text{g/mL}$, which corresponds to 70–130% of the expected sample value.

(b) *Precision.*—Repeatability (intraday) and intermediate precision (interday) of the proposed methods were evaluated. In the microbiological assay, method repeatability was studied by the assay of 2 independent samples, at the same concentration, during the same day and under the same experimental conditions. Intermediate precision was evaluated by comparing the results obtained on 3 different days. In the UV method, 6 independent samples were assayed

Table 2. Experimental values of the inhibition zone of microorganism growth (mm) for voriconazole reference substance solutions obtained by microbiological assay

Concentration, $\mu\text{g/mL}$	Range of inhibition zone, mm	Mean diameter of inhibition zone, mm	RSD, %
3	13.12–14.06	13.51	2.6
6	17.38–18.23	17.73	1.6
12	21.24–22.21	21.74	1.7

**Figure 3. Calibration curve for voriconazole, obtained by the microbiological cylinder-plate assay.**

in a day, under the same experimental conditions (standard and sample preparation as described above). The results obtained on 3 different days were compared.

(c) *Accuracy.*—This parameter was determined by the recovery study, comparing the theoretical and measured concentrations of known amounts of voriconazole reference substance added at the beginning of the process.

For the microbiological assay, a sample solution of 0.3 mg/mL was prepared, as described above. From the filtered solution, an aliquot of 2 mL was transferred to a 200 mL volumetric flask containing 0.8 mL voriconazole standard solution (0.3 mg/mL), and aliquots of 1.0 mL filtrate were transferred to two 100 mL volumetric flasks containing 1.0 and 1.6 mL voriconazole standard solution (0.3 mg/mL). Buffer No. 1 was added to make up the volume, giving final concentrations of 4.2, 6.0, and 7.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which correspond to 70, 100, and 130% of the middle concentration of the curve (6 $\mu\text{g/mL}$). Each level was made in triplicate. These solutions were assayed, and the percentage of added voriconazole standard was calculated using the equation obtained from the linear regression study of the standard curve.

Table 3. Voriconazole content in tablets, with respect to the theoretical value, assayed on 3 different days, by microbiological assay

Day	Purity, %	RSD intraday, %	Mean purity interday, %	RSD interday, %
1	101.54	0.7	100.9	2.4
	102.50			
2	102.47	3.8		
	97.07			
3	103.14	3.0		
	98.78			

^a Mean of 6 replicates.

Table 4. Recovery of reference substance added to samples of voriconazole tablets, by microbiological assay

Amount of standard added, µg/mL	Recovered amount, µg/mL	Recovery, % ^a	RSD, %	Mean recovery, %
1.2	1.18	98.83	3.2	
3	3.07	102.30	3.4	100.9
4.8	4.88	101.61	0.1	

^a Each value is the mean of 3 independent samples.

For the UV spectrophotometric assay, a sample solution of 0.12 mg/mL voriconazole was prepared and diluted with methanol. The solution was filtered, and aliquots of 5 mL were transferred to 50 mL volumetric flasks containing 1, 4, and 7 mL voriconazole standard solution (75 µg/mL). Water was added to make up the volume, giving final concentrations of 13.5, 18.0, and 22.5 µg/mL, respectively, which correspond to 75, 100, and 125% of the nominal analytical concentration (18 µg/mL). Each level was made in triplicate.

The recovery percentage of voriconazole added was calculated using the equation proposed by AOAC (21).

(d) *Methods comparison.*—The results obtained in this study were compared with those obtained by a high-performance liquid chromatography (HPLC) method described previously (14).

Results and Discussion

There are no official methods for the quality control of voriconazole, as drug substance or formulated products. Despite being only moderately selective, the UV

Table 5. Voriconazole content in tablets, with respect to the theoretical value, assayed on 3 different days, by UV method

Sample	% Label claim		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	101.75	100.42	100.20
2	101.6	98.64	101.89
3	101.75	100.30	100.23
4	98.99	100.75	101.74
5	100.71	100.96	99.38
6	100.12	101.16	98.75
Mean (intra-assay)	100.8	100.4	100.3
RSD, %	1.1	0.9	1.2
Mean (interassay)	100.5		
RSD, %	1.0		

Table 6. Recovery of reference substance added to samples of voriconazole tablets

Amount of standard added, µg/mL	Recovered amount, µg/mL	Recovery, % ^a	RSD, %	Mean recovery, %
1.5	1.51	100.72	2.2	
6.0	5.95	99.26	0.9	99.8
10.5	10.44	99.39	0.3	

^a Each value is the mean of 3 independent samples.

spectrophotometric assay is a very robust, easy, and inexpensive method, offering good precision in formulation quantitative analysis, where there is no interference from excipients (22).

In the microbiological assay, the potency of an antibiotic, in this case an antifungal, is estimated by comparison of the growth inhibition of a susceptible microorganism produced by a sample and a reference substance. The sample is diluted to the same presumed activity as the doses of the reference substance (18). According to the U.S. Pharmacopeia (15), microbiological assay generally remains the standard for resolving doubt with respect to possible loss of activity. A reduction in antimicrobial activity can reveal subtle changes not demonstrable by chemical methods. Besides, this assay does not use sophisticated apparatus and organic solvents, resulting in low volumes of chemical residues.

In this work, a 3 × 3 design was used (Figure 2), as described in 2 consulted Pharmacopoeias (18, 19). This experimental model used 3 dose levels of standard solution and 3 dose levels of sample solution, in geometric progression. Some parameters were tested earlier to establish the conditions described and shown in Table 1.

It was observed that the following conditions must be used to produce clear inhibition zones of growth: buffer solution in the range of 6.0–7.0; inoculum of 1.0%; incubation time of 24 h; and the use of 2 agar layers, with only the upper layer inoculated. Aliquots of 100 µL were totally absorbed by the agar, while aliquots of 200 µL remained in the surface after incubation, causing variations of inhibition because of erratic diffusion.

For the diffusion assay method, the concentration of the solutions must be chosen to ensure a linear relationship

Table 7. Analysis of voriconazole tablets by 3 different methods

Methods	Mean, %	RSD, %	n	p-Value
HPLC	100.0	0.9	18	
Microbiological	100.9	2.4	6	0.1719
UV	100.5	1.0	18	

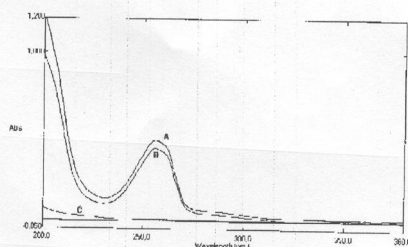


Figure 4. UV spectrum of sample (A), reference substance (B), and placebo solution (C).

between the logarithm of the dose and the response. This condition was ensured by the standard curve with concentrations of 3.0, 6.0, and 12.0 $\mu\text{g/mL}$. The corresponding inhibition zones for the 3 reference solutions are presented in Table 2. The standard curve of voriconazole, constructed by plotting log of dose ($\mu\text{g/mL}$) versus inhibition zone diameter (mm) showed good linearity (Figure 3). The obtained linear regression equation was $y = 13.670x + 7.023$, and the regression coefficient was 0.9999.

The experimental values of individual assays of voriconazole tablets are presented in Table 3. If a parallel-line model is chosen, the 2 log-response lines (reference substance and sample) must be parallel and linear over the range of doses used in the calculation (18, 19). These conditions must be verified by validity tests for a given probability. The assays were validated by means of ANOVA test, as described in those official codes. No deviation of parallelism and linearity was observed in our study ($P < 0.05$). The relative standard deviation (RSD) value for interday assay shows that the developed method is precise (2.4%). The mean recovery of 100.9% confirms the accuracy of microbiological assay (Table 4).

In the UV method, the calibration curve of voriconazole was obtained by plotting the absorbance against drug concentration. The curve was linear in the range of 12–24 $\mu\text{g/mL}$, with a regression coefficient of 0.9999 and a linear regression equation of $y = 0.02295x - 0.0002$. The method showed good precision, both intra- and interday assays (Table 5). The accuracy of the assay was studied; the mean recovery was 99.8%, indicating that the proposed UV method is accurate (Table 6).

The data obtained by microbiological assay and UV method were statistically compared by ANOVA test with the one obtained by HPLC method (Table 7). It was indicated that there is no evidence of significant difference between the 3 methods ($P < 0.05$). This also indicates that the excipients do not absorb in the wavelength used for the UV quantitation method, confirming results previously obtained by analysis of a placebo solution (Figure 4). The higher RSD values of the microbiological assay compared with an instrumental assay were expected, considering the inherent variability of

Table 8. Analytical parameters of UV method

Parameter	Result
Molar absorptivity	8016
$A_{1\%}^{1\text{cm}}$	229
Regression equation	$y = 0.02295x - 0.0002$
Slope \pm SD ^a	0.02295 ± 0.0003
Intercept \pm SD	-0.0002 ± 0.005
Correlation coefficient (r)	0.9999
SD of residuals	0.0012

^a SD = Standard deviation.

biological assay. There was a linear relationship between absorbance and drug concentration in the range 12 to 24 $\mu\text{g/mL}$, with a correlation coefficient of 0.9999 (Table 8). The regression equation, the molar absorptivity, and other parameters were also calculated from the calibration graph applying least-square method (Table 8). The method showed good precision, both intra- and interday assays (Table 5). The accuracy of the assay was studied; the mean recovery was 99.8%, indicating that the proposed UV method is accurate (Table 6).

The proposed microbiological and UV assays showed good precision and accuracy, but the smaller variability and easier preparation of UV method favors its use. The results of statistic analysis showed that these methods give similar results to those obtained by HPLC, indicating that they allow reliable determination of voriconazole in tablets and can be used for the drug analysis in routine quality control and in dissolution studies.

Acknowledgments

We thank to the Brazilian Pharmacopocia and Cristalia Laboratories (Itapira, Brazil) for the reference substance supply, and I.A.PPS and LEPCQ (UFRGS) for the financial support.

References

- Ghannoum, M.A., & Kuhn, D.M. (2002) *Eur. J. Med. Res.* 7, 242–256
- Fromling, R.A., & Castañer, J. (1996) *Drugs Fut.* 21, 266–271
- Stopher, D.A., & Gage, R. (1997) *J. Chromatogr. B* 691, 441–448
- Gage, R., & Stopher, D.A. (1998) *J. Pharm. Biom. Anal.* 17, 1449–1453
- Perea, S., Pennick, G.J., Modak, A., Fothergill, A.W., Sutton, D.A., Sheehan, D.J., & Rinaldi, M.G. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1209–1213
- Zhou, L., Glickman, R.D., Chen, N., Sponset, W.E., Graybill, J.R., & Lam, K.W. (2002) *J. Chromatogr. B* 776, 213–220

- (7) Pennick, G.J., Clark, M., Sutton, D.A., & Rinaldi, M.G. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2348–2350
- (8) Hariprasad, S.M., Mielert, W.F., Holz, E.R., Gao, H., Kim, J.E., Chi, J.D., & Prince, R.A. (2004) *Arch. Ophthalmol.* **122**, 42–47
- (9) Pehourq, F., Jarry, C., & Bannwarth, B. (2004) *Biomed. Chromatogr.* **18**, 719–722
- (10) Egle, H., Trütler, R., König, A., & Kümmerer, K. (2005) *J. Chromatogr. B* **814**, 361–367
- (11) Ferretti, R., Gallinilla, B., La Torre, F., & Zanitti, L. (1998) *Chromatographia* **47**, 649–654
- (12) Crego, A.L., Gómez, J., Marina, M.L., & Lavandera, J.L. (2001) *Electrophoresis* **22**, 2503–2511
- (13) Crego, A.L., Marina, M.L., & Lavandera, J.L. (2001) *J. Chromatogr. A* **917**, 337–345
- (14) Adams, A.I.H., & Bergold, A.M. (2005) *Chromatographia* **62**, 429–434
- (15) *U.S. Pharmacopeia* (2005) 28th Ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD
- (16) Hewitt, W. (1977) *Microbiological Assay: An Introduction to Quantitative Principles and Evaluation*, Academic Press, New York, NY
- (17) Meier, P.C., & Zünd, R.L. (2000) *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY
- (18) *European Pharmacopoeia* (2002) 4th Ed., Council of Europe, Strasbourg
- (19) *Farmacopéia Brasileira* (1988) 4th Ed., Atheneu, São Paulo, Brazil
- (20) *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (1996) *Guideline on Validation of Analytical Procedures—Methodology*, Geneva, Switzerland
- (21) *Official Methods of Analysis* (2000) 17th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD
- (22) Watson, D.G. (1999) *Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Churchill Livingstone, London, UK

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS - PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do Voriconazol.

Doutoranda: ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

PARECER

A tese de doutorado de Andréa Inês Horn Adams apresenta grande pertinência e alta relevância científica. A fundamentação teórica está adequada e baseada em literatura atualizada. A metodologia esclarecedora e enquadra-se aos objetivos propostos. Todos os objetivos foram alcançados e muito bem discutidos no capítulo da apresentação dos resultados e discussão. O trabalho traz contribuições importantes na área farmacêutica e sócio-econômica quando demonstra que o tempo de validade de um produto de alto preço pode ser alterado. Pelo exposto somos de parecer favorável à aprovação da tese conferindo o conceito A.

Profª. Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim
Porto Alegre, 28/08/2007.



[versão 20/JAN/2003]

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS - PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do Voriconazol.

Doutoranda: ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

PARECER

Após analisar a tese "Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade de voriconazol" da pós-graduada Andréa Inês Horn Adams, observa-se tratar-se de trabalho científico de nível muito bem delineado, escrito e didático, com objetivos definidos que foram alcançados por meio de metodologia adequada e atual. Os resultados obtidos muito bem ilustrados e discutidos. A bibliografia consultada é correta, atualizada. O trabalho realizado aponta importância no subidido de controle de qualidade de fármacos estudado - Voriconazol. Recomenda-se a concessão do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas à Pós-graduada.

Elfrides Eva Scherman Schapoval
Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Porto Alegre, 28 de agosto de 2007.

[versão 28JAN2005]

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS - PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do Voriconazol.

Doutoranda: ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

PARECER

O trabalho desenvolvido é relevante
possui mérito científico e tecnológico.
A abordagem metodológica foi
coerente com os objetivos propostos,
com obtenção de resultados aplicáveis
na rotina de laboratórios analíticos.
A pós-graduada demonstrou
domínio do trabalho, clareza na
apresentação oral e argumentação
na etapa de discussão além de
ter publicado 02 artigos científicos
em periódicos de impacto.
A candidata foi Aprovada.

Prof. Dr. Megali Benjamin Araújo
Porto Alegre, 28/08 de 2007

[versão 28.JAN2006]

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATERIAS - PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do Voriconazol.

Doutoranda: ANDRÉA INÉS HORN ADAMS

PARECER

A tese versa sobre tema relevante e atual no âmbito das Ciências Farmacêuticas, traz uma importante contribuição na área de Controle de Qualidade de Medicamentos, oferecendo um metodologia experimental consistentemente empregada. No corpo de texto verifica-se uma perfeita bibliografia relacionada nos temas abordados nos objetivos do trabalho, os quais, por sua vez, também são bem delineados. Os resultados alcançados são adequadamente apresentados e discutidos, permitindo conclusões pertinentes. Torna-se oportuno seu parecer favorável e aprovação da Tese e concessão do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas à candidata

Profa. Dr. Silvia Stanisquaski Guterres
Porto Alegre, 28/ agosto 2007.

[versão 28JAN2005]

BIOGRAFIA

- Agosto 1971 Nascimento em São Paulo das Missões, RS.
- 1990 - 1994 Graduação em Farmácia Industrial. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, RS.
- 1994 - 1997 Responsável Técnica pelo Setor de Controle de Qualidade de Medicamentos Veterinários do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Porto Alegre/RS.
- 1998 - 1999 Farmacêutica do Hospital São Lucas da PUCRS, atuando no preparo de quimioterapia, farmácia interna e farmácia industrial. Porto Alegre/RS.
- 1999 - 2001 Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.
Título: Desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de qualidade do cetoconazol, flutamida, minoxidil e cloridrato de sertralina em farmácias de manipulação.
Orientador: Ana Maria Bergold
- 2001 - atual Professora de Controle Biológico de Medicamentos e de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, RS.
- 2003 - 2007 Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS
Título: Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do voriconazol
Orientador: Ana Maria Bergold
Co-orientador: Martin Steppe

Artigos completos publicados em periódicos

MENEGHINI, L. Z.; ADAMS, A. I. H. Avaliação físico-química de cápsulas de diazepam manipuladas em farmácias magistrais de Passo Fundo/RS. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, p. 67-70, 2007.

ADAMS, A. I. H., STEPPE, M., FRÖEHLICH, P.E., BERGOLD, A.M. Comparison of Microbiological and UV-Spectrophotometric Assay for Determination of Voriconazole in Tablets. *Journal of AOAC International*, v.89, p.960 - 965, 2006.

BERTOL, C. D.; WERLANG, M.C. ; ADAMS, A. I. H. Procedimento para validação do processo de preparação de nutrição parenteral. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 21, p. 193-197, 2006.

ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A.M. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of voriconazole content in tablets. *Chromatographia* (Wiesbaden), v.62, p.429 - 434, 2005.

PEREIRA, M. E., ADAMS, A. I. H., SILVA, N. S. 2,5-hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters*, v.146, p.269 - 274, 2004.

MIOTTO JÚNIOR, S., ADAMS, A. I. H. Avaliação de cápsulas de nifedipino manipuladas em farmácias de Passo Fundo. *Infarma*, v.16, p.68 - 72, 2004.

ADAMS, A. I. H., SALVATO, G. A., BERGOLD, A.M. Controle de qualidade do minoxidil em laboratórios de pequeno porte. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.24, p.169 - 177, 2003.

ADAMS, A. I. H., STAUB, I., FRÖEHLICH, P.E., BERGOLD, A.M. Avaliação da Integridade da fórmula do xampu de cetoconazol.. *Infarma*, v.14, p.74 - 76, 2002.

ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A.M. Assay of sertraline in tablets and drug substance by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.26, p.505 - 508, 2001.

ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A. M. Doseamento do cloridrato de sertralina por cromatografia líquida de alta eficiência e volumetria em meio não-aquoso. RBCF. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, p.329 - 334, 2001.

Trabalhos apresentados em eventos

ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A. M. *Estudo químico-farmacêutico do voriconazol*. In: II INOVA/MOSTRA - UFRGS - Mostra de Pesquisa e Pós-Graduação, 2007. Porto Alegre.

MARCO, S. L., SCANDOLARA, N. R., ADAMS, A. I. H., KNORST, M. T. Avaliação da qualidade de cápsulas de piroxicam manipuladas em farmácias de Passo Fundo (RS) In: XVI Mostra de Iniciação Científica, 2006, Passo Fundo, RS.

SCANDOLARA, N. R., MARCO, S. L., ADAMS, A. I. H., KNORST, M. T. Avaliação das propriedades biofarmacotécnicas de cápsulas de piroxicam comercializadas no Brasil In: XVI Mostra de Iniciação Científica, 2006, Passo Fundo, RS.

MORIMOTO, L. N., ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A.M. Estudo da estabilidade físico-química do voriconazol injetável como produto reconstituído e nas bolsas para infusão. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre, RS. XVIII Salão de Iniciação Científica. , 2006.

MENEGHINI, L.Z., ADAMS, A. I. H. Controle de qualidade de cápsulas de diazepam produzidas por farmácias do Planalto Médio. In: 7ª Semana Acadêmica da Farmácia - 2ª Mostra em Farmácia, 2005, Passo Fundo, RS.

BARUFFI, C. P., ADAMS, A. I. H. Determinação do Fator de Proteção Solar de preparações cosméticas contendo filtros solares químicos. In: 7ª Semana Acadêmica da Farmácia - 2ª Mostra em Farmácia, 2005, Passo Fundo, RS.

GUERRA, S. R., ADAMS, A. I. H. Controle de qualidade de cápsulas de cloridrato de ranitidina produzidas em um hospital do Planalto Médio In: XIV Mostra de Iniciação Científica da UPF, 2004, Passo Fundo, RS.

ADAMS, A. I. H., BERGOLD, A.M. Desenvolvimento de métodos para doseamento de sertralina em farmácias de manipulação. In: XVII Congresso Pan-Americano de Farmácia e V Congresso Mundial de Farmacêuticos de Língua Portuguesa, 2000, Rio de Janeiro, RJ. Anais do XVII Congresso Pan-Americano de Farmácia e do V Congresso Mundial de Farmacêuticos de língua Portuguesa.

ADAMS, A. I. H., FRÖEHLICH, P, E.; BERGOLD, A.M. Doseamento de sertralina em meio não-aquoso: uma proposta viável. In: VI Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica e I Reunião dos Professores de Química Farmacêutica para o Mercosul, 2000, Porto Alegre. Programa Oficial/Resumo de Trabalhos do V Pharmatech, VI ENPQF, II ENECQ, 2000.

ADAMS, A. I. H., VOGT, A. I., PEREIRA, M. E. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity from liver, brain and kidney of rats treated during pos-natal stages of development with mercury and cadmium chloride. In: Reunião Anual da SBBq, 1994, Caxambu, MG.

ADAMS, A. I. H., KUNRATH, M. R. K., VOGT, A. I., KRICK, M., TEIXEIRA, J. B., PEREIRA, M. E. Efeitos do 2,3-dimercaptopropanol in vitro sobre a atividade da delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) de camundongos. In: VIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 1993, Curitiba, PR.

ADAMS, A. I. H., KUNRATH, M. R. K., VOGT, A. I., KRICK, M., TEIXEIRA, J. B., PEREIRA, M. E. Efeitos do 2,3-dimercaptopropanol in vivo e in vitro sobre a atividade da delta-aminolevulinato desidratase In: VIII Reunião da FESBE, 1993, Caxambu, MG.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)