



Ensaio de dissolução de cápsulas de fluconazol: problemas encontrados na determinação por espectrofotometria na região do UV

Oliveira, D.M.¹; Markman, B.E.O.^{1*}; Uessugui, O.¹; Wu, E.M.¹; Magnelli, R.F.¹

¹Instituto Adolfo Lutz Central - Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Antibióticos

Recebido 08/04/2010 / Aceito 04/08/2010

RESUMO

Entre as classes terapêuticas analisadas no Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos (PROVEME), o antifúngico fluconazol constava na apresentação de cápsulas de diferentes procedências. Na realização dos ensaios de dissolução conforme as técnicas dos fabricantes, constatou-se que os valores obtidos por espectrofotometria-UV foram superiores aos obtidos nos ensaios de teor e uniformidade de conteúdo, cuja determinação foi por CLAE-UV. Considerando este fato, foi objetivo deste trabalho realizar o ensaio de dissolução destas amostras pelos respectivos métodos dos fabricantes e o quantitativo do ensaio por espectrofotometria no UV e por CLAE-UV, a fim de avaliar as possíveis interferências dos excipientes nestas determinações. Os valores obtidos por espectrofotometria foram superiores aos obtidos por CLAE, confirmando a interferência dos excipientes. Concluiu-se que a metodologia a ser empregada na análise de fármacos deve ser criteriosamente selecionada, a fim de evitar resultados não condizentes com a real formulação do produto.

Palavras-chave: cápsulas de fluconazol, CLAE, dissolução, espectrofotometria.

O fluconazol é um antifúngico derivado da substituição do anel imidazólico por um anel triazólico, o que amplia o espectro de ação e a seletividade para o citocromo P450 da célula fúngica, impedindo o crescimento de fungos por meio da inibição da síntese do ergosterol (esteróide), essencial à sua sobrevivência. (Bennet, 1996).

O fluconazol é o fármaco de escolha para tratamento da criptococose (infecção pulmonar causada pelo *Cryptococcus neoformans* que acomete, em geral, indivíduos imunodeprimidos) e blastomicose (micose

sistêmica causada pelo *Blastomyces dermatidis*, que pode acometer pessoas de todas as idades), ambas transmitidas por inalação. Também é indicado para candidíase vaginal e orofaríngea (Martindale, 1996; Coelho et al., 2004).

O Instituto Adolfo Lutz participa do Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos (PROVEME) e, entre as classes terapêuticas analisadas, constava o antifúngico fluconazol na apresentação de cápsulas de diferentes procedências. Na realização dos ensaios de dissolução de acordo com as técnicas dos fabricantes, constatou-se que os valores obtidos por espectrofotometria-UV foram superiores aos obtidos nos ensaios de teor e uniformidade de conteúdo, cuja determinação foi feita por CLAE-UV. Os ensaios de dissolução são imprescindíveis, uma vez que estes podem fornecer indicações importantes sobre o desempenho *in vivo* dos medicamentos (Porta et al., 2002).

A dissolução pode ser definida, de forma simplificada, como o processo pelo qual o fármaco é liberado de sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (Ribeiro et al., 2000; Marcolongo, 2003,).

Qualquer fator que altere os processos de desintegração e dissolução da forma farmacêutica poderá afetar diretamente a biodisponibilidade (Moraes et al., 1999), demonstrada pela quantidade de fármaco absorvido e velocidade do processo de absorção. Desse modo, o ensaio de dissolução é uma das ferramentas essenciais para avaliação das propriedades farmacotécnicas de apresentações farmacêuticas sólidas em diferentes estágios, desde o processo de formulação até todo o ciclo de vida de um medicamento. Na fase de produção de um medicamento, a dissolução tem um importante papel na liberação de lotes e nos testes de estabilidade, sendo que o perfil de dissolução de um produto deve se manter constante durante todo o período de validade do mesmo. (Azevedo et al., 2008).

As farmacopeias Americana (31ª edição) e Brasileira (4ª edição) não contemplam a monografia para o fluconazol em cápsulas. Portanto, para avaliar este fármaco em laboratórios oficiais, os métodos utilizados são enviados pelos fabricantes conforme RE 310/2004, previamente aprovados pela ANVISA no registro do medicamento,

Autor correspondente: Blanca Elena Ortega Markman - Av. Dr. Arnaldo 355, São Paulo - SP, CEP 01246-902, Tel: (11) 30682928 Fax: (11) 30682926 e-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br

fazendo parte destes o perfil de dissolução e o ensaio de dissolução do medicamento (Brasil, 2004).

Na execução do PROVEME, as diretrizes propunham executar todos os ensaios microbiológicos e físico-químicos, como peso médio, variação de peso, identificação, teor, uniformidade de conteúdo e dissolução em todos os medicamentos, inclusive nas cápsulas de fluconazol dos diversos fabricantes. Os resultados obtidos para todos os ensaios foram satisfatórios, exceto para o ensaio de dissolução. Ao se realizar este ensaio com a determinação por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), conforme as metodologias dos fabricantes, constatou-se que algumas amostras apresentaram os valores de fluconazol superiores aos obtidos para o teor e uniformidade de conteúdo, cuja determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

Considerando o fato supracitado e a inexistência de método farmacopeico para análise de fluconazol em cápsulas, foi objetivo deste trabalho realizar o ensaio de dissolução destas amostras pelos respectivos métodos dos fabricantes e o quantitativo do ensaio por espectrofotometria no UV e por CLAE-UV, de forma a avaliar as possíveis interferências dos excipientes nestas determinações.

O meio de dissolução utilizado foi o HCl 0,1N, com volume de 900ml, utilizando o método de pás ou cestas. De acordo com o especificado, o tempo foi de 45 minutos, à velocidade de 100 RPM e à temperatura de 37°C. Após o término do ensaio, foram coletados 20 mL de cada cuba, imediatamente filtrados em filtros millex, e este filtrado foi dividido em cotas de 15 ml e 5ml. As cotas de 15 ml foram lidas em espectrofotômetro marca Cintra 10 - Analítica -, na região do ultravioleta, em comprimento de onda 254 nm e utilizando como branco o meio de dissolução.

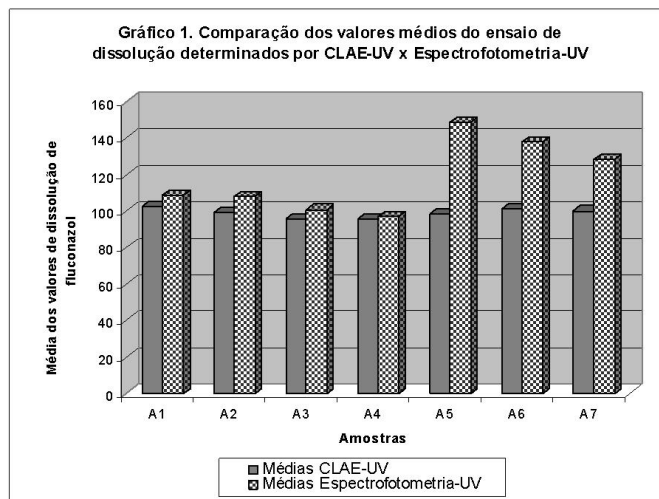
Os 5 ml restantes foram processados no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu CLASS-VP 10. A amostra foi injetada em sistema cromatográfico, constituído por coluna Chromolith RP18 em monobloco, com pré-coluna, fase móvel composta por ácido fosfórico 0,042 M e acetonitrila (75:25), a uma temperatura de 25°C e com um fluxo de 1,0 mL por minuto. A leitura foi realizada em espectrofotômetro acoplado ao equipamento, no comprimento de onda de 254 nm.

Tabela 1. Resultados das médias dos valores obtidos por CLAE-UV, espectrofotometria no UV, coeficientes de variação entre as duas determinações e diferenças dos valores encontrados para cada amostra:

Amostra	*Determinação por CLAE-UV	*Determinação por espectrofotometria-UV	Coeficiente de variação entre as duas determinações(%)	Diferenças em porcentagem nas determinações
A1	102,46%	108,64%	4,14%	6,18%
A2	98,87%	108,01%	6,25%	9,14%
A3	95,66%	100,72%	3,64%	5,06%
A4	95,40%	96,87%	1,08%	1,47%
A5	98,54%	148,75%	29,00%	50,21%
A6	101,07%	137,79%	21,48%	36,72%
A7	100,13%	128,24%	17,31%	28,11%

*Média dos valores obtidos nas 6 cubas

Na tabela 1 estão expressos os resultados das análises de dissolução de todas as amostras de cápsulas de fluconazol determinados por CLAE-UV; estes revelaram valores coerentes quando comparados com os resultados de teor e uniformidade de conteúdo das mesmas amostras. Os valores obtidos por espectrofotometria no UV para as mesmas amostras foram superiores aos obtidos pela técnica de cromatografia, apresentando diferenças entre 6 a 50% com exceção da amostra A4. Assim, os coeficientes de variação calculados entre as duas determinações expressam uma grande dispersão dos resultados, demonstrando a precisão destes dois métodos.



A comparação entre os resultados obtidos para o ensaio de dissolução, quando empregado CLAE-UV e espectrofotometria, está representada na figura 1, evidenciando uma interferência dos excipientes de algumas amostras analisadas contidos na formulação destes medicamentos.

O fundamento da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseia-se na separação das substâncias presentes em uma amostra por meio da interação destas com a fase móvel e os sítios ativos da coluna. Desta forma, garante uma seletividade maior na determinação do fármaco quando comparada à técnica espectrofotométrica, na qual a leitura da amostra abrange todos os componentes presentes que apresentam absorvidade próxima ou coincidente ao mesmo comprimento de onda do princípio ativo analisado. Essa técnica apresenta outros recursos que poderiam ser empregados, como a determinação do sinal da primeira ou segunda derivada para o fluconazol, tornando-a mais específica.

Conclui-se que, ao realizar a análise de um fármaco, o método a ser empregado deve ser criteriosamente selecionado, devendo apresentar seletividade, reprodutibilidade e sensibilidade, a fim de evitar resultados não condizentes com a real formulação do produto.

Os resultados obtidos através deste trabalho podem ser úteis tanto no registro de novos medicamentos quanto na renovação do registro de fármacos já aprovados pela ANVISA, na medida em que se exija a revisão de métodos que apresentem a espectrofotometria como ferramenta de análise sem a utilização dos sinais da primeira ou segunda derivada.

ABSTRACT

Fluconazole capsule dissolution test: problems encountered in UV spectrophotometry determination

Among the therapeutic classes analyzed in the Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos (PROVEME) consisted the antifungal fluconazole in the dosage form of capsules from different origins. In dissolution tests, according to manufacturers techniques, it was found that the values obtained by UV-spectrophotometry were higher than those obtained from tests of content and content uniformity, whose determination was by HPLC-UV. Considering this fact, the objective of this study was to perform the dissolution test of these samples by the respective manufacturers methods and the quantitative assay by UV-spectrophotometry and HPLC-UV, to evaluate possible interferences of excipients in these determinations. The values obtained by spectrophotometry were higher than those obtained by HPLC, confirming the excipients interference. It was concluded that the methodology to be employed in drug analysis should be carefully selected in order to avoid results not commensurate with the real product formulation.

Keywords: Fluconazole capsules. HPLC-UV. Spectrophotometry, dissolution.

quantification by tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 1999; 21(2):200-7.

Porta V, Yamamichi E, Storpirtis S. Avaliação biofarmacêutica in vitro de cápsulas de fluconazol. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2002; 38(3):333-43.

Ribeiro W, Zappi, EA, Moraes ME, Bezerra FA, Lerner FE, de Nucci G. Comparative bioavailability of two fluconazole capsule formulations in healthy volunteers, *Arzneimittel-Forschung*, 2000; 50(11):1028-32.

REFERÊNCIAS

Azevedo RCP, Ribeiro GP, Araújo MB. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2008; 44(2):261-9.

Bennet JE. Antimicrobial agents. In: Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. 9th. ed. New York: Pergamon Press; 1996. p.1175-8.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução- RE310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução". *Diário Oficial da União [D.F.]*. Brasília, 03 de setembro 2004. Seção 1, p. 93-4.

Coelho H, Martinatti NAF, Araújo MB, Bergold AM, Bueno F. Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2004; 40(2):235-46.

Marcolongo R. Dissolução de Medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

Martindale – The extra Pharmacopeia, 31std ed.London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 403-4

Moraes LA, Lerner FE, Moraes ME, Moraes MO, Corso G, De Nucci G. Fluconazole bioequivalence study:

