

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
PARA DETERMINAÇÃO DE TACROLIMUS
EM CÁPSULAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tania Maria Böer

Santa Maria, RS, Brasil

2007

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE TACROLIMUS EM CÁPSULAS

por

Tania Maria Böer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE TACROLIMUS EM CÁPSULAS**

elaborada por

Tania Maria Böer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia (UFSM)

Santa Maria, 08 de março de 2007

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, humildade e sabedoria.

Em especial à Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso, pela orientação, compreensão, amizade, confiança e apoio durante a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Benno e Maria Clecy, pela vida e educação.

Aos inseparáveis amigos e afilhados, Danielle Aita, Juliano Aita e Lucas Aita, pelo amor, amizade e companheirismo.

Ao amigo Ricardo Brandão, pela amizade, estímulo e companheirismo.

Ao Prof. Carlos Alberto Brandão, pelo exemplo, amizade e incentivo na área da pesquisa.

Ao Prof. Julio Tschoepke de Medeiros, pela amizade, confiança e incentivo.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Diretora da Farmácia Escola Comercial, Cláudia Silveira, pelo estímulo e compreensão.

À Empresa SP-Farma, por gentilmente ceder a matéria-prima para realização deste trabalho.

À Adriana dos Santos, supervisora de vendas da empresa SP-Farma, pela compreensão e contribuição para que a matéria-prima fosse gentilmente cedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, que possibilitou a execução deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE TACROLIMUS EM CÁPSULAS

AUTORA: Tania Maria Böer
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 08 de março de 2007.

O tacrolimus é uma lactona macrolídea, derivada do *Streptomyces tsukubaensis*. É um fármaco imunossupressor usado na prevenção da rejeição de transplante de órgãos, tais como fígado, rim, coração, intestino delgado, pâncreas e medula óssea. É também indicado para tratamento de dermatite atópica, lupus eritematoso, psoríase e vitiligo. Encontra-se comercialmente disponível na forma de cápsulas, injetáveis e pomadas. Poucos métodos estão descritos na literatura para quantificação do tacrolimus nas formas disponíveis. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos espectrofotométricos para determinação quantitativa do fármaco em cápsulas. Um dos métodos utilizou reação com ácido sulfúrico concentrado (98%), com detecção em 295 nm. O outro se baseou na reação de complexo de transferência de carga com iodo 0,01M, com detecção em 365 nm. Os métodos desenvolvidos apresentaram linearidade ($r > 0,99$), precisão ($< 0,2\%$) e exatidão ($> 99\%$) adequadas. Realizou-se, igualmente, estudo preliminar para avaliação do perfil de dissolução *in vitro* do fármaco. Diferentes meios de dissolução (tampão fosfato pH 6,8, tampão acetato pH 5,5 and HCl 0,1M) e diferentes velocidades de rotação (75 e 100 rpm) foram avaliados para definir as condições para o teste de dissolução, empregando o aparato cesta. As porcentagens dissolvidas do fármaco foram determinadas através de método por cromatografia líquida de alta eficiência descrito na literatura. As porcentagens dissolvidas foram superiores a 85% em 60 minutos.

Palavras-chave: tacrolimus; validação; cápsulas; espectrofotometria; dissolução

ABSTRACT

Master Dissertation
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINATION OF TACROLIMUS IN CAPSULES

AUTHOR: Tania Maria Böer
ADVISER: Prof^a Dr^a Simone Gonçalves Cardoso
Date and Local of the Defense: Santa Maria, March 08th of 2007.

Tacrolimus is a lactone macrolide, derived from *Streptomyces tsukubaensis*. It is an immunosuppressive drug that has been used in the prevention of organs transplant rejection, such as liver, kidney, heart, small intestine, pancreas and bone marrow. The drug is also indicated for the treatment of atopic dermatitis, eczema, psoriasis and vitiligo. It is available as capsules, injection and ointment. Few methods have been reported for tacrolimus quantification in the dosage forms. In the present work, spectrophotometric methods were developed and validated for quantification of the drug in capsules. One method was based on the reaction with concentrated sulfuric acid (98 %), with detection at 295 nm. The other method was based in the charge transfer complex with 0.01M Iodine, with detection at 365 nm. The methods showed good linearity ($r > 0,99$), precision ($< 0,2\%$) and accuracy ($> 99\%$). Preliminary study for *in vitro* drug release was also performed. Different dissolution medium (phosphate buffer pH 6.8, acetate buffer pH 5.5 and 0.1M HCl) and different stirring rotate (75 and 100 rpm) were evaluated to select the conditions for dissolution test, using basket apparatus. The percents of drug dissolved were evaluated by high performance liquid chromatographic method described in the literature. The percentage of drug dissolved was more than 85 in 60 minutes.

Keywords: tacrolimus, validation, capsules, spectrophotometry, dissolution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do tacrolimus.....	14
Figura 2	Espectro de Ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN1H) do tacrolimus SQR (400 MHz, CDCL ₃)	20
Figura 3	Espectro de Ressonância magnética nuclear de carbonos (RMN13C) do tacrolimus SQR (400 MHz, CDCL ₃).....	21
Figura 4	Espectro na região do infravermelho do tacrolimus SQR.....	22
Figura 5	Curva de DSC do tacrolimus, obtida em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) a 10 °C/min.....	24
Figura 6	Espectros de absorção de tacrolimus, após reação com 400 µL de ácido sulfúrico concentrado, na concentração de 40 µg/mL em acetonitrila: (A) tacrolimus SQR, (B) cápsulas e (C) amostra simulada de excipientes das cápsulas.....	33
Figura 7	Representação gráfica da curva de calibração do tacrolimus, obtida para o método espectrofotométrico, após reação com ácido sulfúrico concentrado, a 295 nm.....	34
Figura 8	Espectros de absorção de tacrolimus, após reação de complexo de transferência de carga com Iodo 0,01M na concentração de 8 µg/mL, em acetonitrila: (A) tacrolimus SQR; (B) cápsulas; (C) solução de Iodo 0,01M em acetonitrila; (D) Sobreposição dos espectros de absorção da SQR e cápsulas.....	42
Figura 9	Espectro de amostra simulada de excipientes de cápsulas.....	43
Figura 10	Representação gráfica da curva de calibração do tacrolimus obtida para o método espectrofotométrico Iodo, a 365 nm.....	44
Figura 11	Perfis obtidos para a dissolução de tacrolimus em cápsulas de 1 mg (n=3), em diferentes meios, mantidos a 37,0 ± 0,5 °C, utilizando aparato cesta em diferentes rotações.....	60
Figura 12	Perfil de dissolução obtido para a dissolução de cápsulas de 1 mg de tacrolimus, utilizando seis cubas, 500 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio, aparato cesta e rotação de 75 rpm.....	61
Figura 13	Representação gráfica da curva de calibração do tacrolimus, obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, diluindo as amostras em tampão fosfato pH 6,8.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições experimentais desenvolvidas para análise de tacrolimus através de espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	28
Tabela 2	Parâmetros utilizados para execução do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	30
Tabela 3	Valores de absorvâncias obtidos para elaboração da curva de calibração do tacrolimus, após reação com ácido sulfúrico concentrado, a 295 nm.....	34
Tabela 4	Resultados da curva de calibração do tacrolimus SQR, obtida pelo método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA), para o método espectrofotométrico, após reação com ácido sulfúrico, a 295 nm.....	35
Tabela 5	Valores experimentais obtidos na determinação do tacrolimus em cápsulas, pelo método espectrofotométrico, após reação com ácido sulfúrico concentrado, a 295 nm, para avaliação da precisão.....	36
Tabela 6	Análise comparativa entre o método espectrofotométrico no UV e o método cromatográfico (CLAE) descrito por Taormina et al (1992).....	37
Tabela 7	Condições experimentais utilizadas para a execução do método por complexo de transferência de carga, utilizando iodo 0,01M.....	38
Tabela 8	Valores de absorvâncias obtidos para elaboração da curva de calibração do tacrolimus, após reação com iodo 0,01M, a 365 nm.....	43
Tabela 9	Resultados da curva de calibração do tacrolimus SQR, obtida pelo método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA), para o método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com iodo 0,01M, a 365 nm.....	44
Tabela 10	Valores experimentais obtidos na determinação do tacrolimus em cápsulas, pelo método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com iodo 0,01M, a 365 nm, para avaliação da precisão.....	45

Tabela 11	Análise comparativa entre o método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com Iodo 0,0M e o método cromatográfico (CLAE) descrito por Taormina et al (1992).....	46
Tabela 12	Resultados obtidos para a determinação de tacrolimus através dos diferentes métodos.....	49
Tabela 13	Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de tacrolimus nas amostras de cápsulas, obtidos pelos métodos espectrofotométricos desenvolvido e validados, e o método por CLAE, utilizado como referência.....	49
Tabela 14	Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de cápsulas contendo 1 mg de tacrolimus, empregando aparato cesta.....	57
Tabela 15	Porcentagens de tacrolimus dissolvido nas diferentes condições testadas.....	60
Tabela 16	Valores médio das porcentagens dissolvidas de tacrolimus e coeficientes de variação percentual (CV%), utilizando tampão fosfato pH 6,8, aparato cesta, 75 rpm.....	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Objetivos	12
1.1.1 Objetivos gerais.....	12
1.1.2 Objetivos específicos.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Considerações gerais	13
2.2 Características farmacocinéticas	14
2.3 Mecanismo de ação	14
2.4 Formas farmacêuticas e apresentação	15
2.5 Métodos de determinação	15
2.6 Estudos de estabilidade	17
3 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	19
3.1 Introdução	19
3.2 Análise qualitativa	20
3.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN ¹ H) e de carbonos (RMN ¹³ C).....	20
3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	21
3.2.3 Determinação da faixa de fusão.....	22
3.2.4 Análise Térmica.....	23
3.3 Conclusões	24
4 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA	25

4.1 Introdução	25
4.2 Produto farmacêutico	26
4.3 Substância química de referência	27
4.4 Reagentes e solventes	27
4.5 Equipamentos e acessórios	27
4.6 Espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV)	28
4.6.1 Validação do método analítico.....	28
4.6.1.1 Especificidade.....	28
4.6.1.2 Linearidade: Curva de calibração.....	29
4.6.1.3 Precisão.....	29
4.6.1.4 Exatidão.....	30
4.6.1.5 Robustez.....	31
4.6.2 Resultados e discussão.....	31
4.7 Espectrofotometria por complexo de transferência de carga com iodo	38
4.7.1 Validação do método analítico.....	39
4.7.1.1 Especificidade.....	39
4.7.1.2 Linearidade: Curva de calibração.....	39
4.7.1.3 Precisão.....	40
4.7.1.4 Exatidão.....	40
4.7.1.5 Robustez.....	40
4.7.2 Resultados e discussão.....	41
4.8 Comparação dos métodos propostos	47
5 CAPÍTULO III – ESTUDO PRELIMINAR DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE TACROLIMUS	50
5.1 Solventes e reagentes	56
5.2 Equipamentos e acessórios	56
5.3 Estudos preliminares	57
5.4 Resultados e discussão	58
6 CONCLUSÕES	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8 ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o sucesso no transplante de órgãos é, em parte, atribuído aos avanços na terapia imunossupressora, havendo poucas perdas de órgãos como resultado da rejeição aguda (TAYLOR et al, 2005). Os imunossupressores químicos tornaram-se disponíveis para uso clínico no início da década de 60, sendo a 6-mercaptopurina um dos primeiros agentes utilizados, que foi posteriormente substituída pela azatioprina. A liberação da ciclosporina pelo FDA, em 1983, representou um marco do progresso do resultado dos transplantes (LASMAR&LASMAR, 2003). Desde então, uma série de fármacos imunossupressores vêm sendo estudados, tais como o anti-proliferativo micofenolato mofetil e os inibidores da calcineurina: tacrolimus e sirolimus (TAYLOR et al., 2005).

O tacrolimus (FK 506) é um macrolídeo com mecanismo de ação semelhante ao da ciclosporina oferecendo, no entanto, algumas vantagens potenciais em relação ao seu perfil de eventos adversos, já que há ausência de hirsutismo, sendo a hipertensão arterial, a hiperlipidemia e a hiperplasia gengival menos severas (WOODLE et al., 1996). A nefro e a neurotoxicidade são alguns dos efeitos colaterais relatados. Em muitos casos, no entanto, a disfunção renal é diminuída pela redução da dose (HOOKS, 1994).

O tacrolimus é apresentado na forma de cápsulas, injetáveis e pomadas. Embora disponível comercialmente, são inexistentes, até o momento, monografias farmacopéias para as formas citadas, tendo sido encontrados poucos métodos para avaliação desse fármaco descritos na literatura científica pertinente.

Considerando a importância clínica do tacrolimus, torna-se imprescindível desenvolver e validar métodos que possam avaliar a qualidade de formas farmacêuticas contendo esse fármaco, garantindo a sua segurança e eficácia terapêutica. Nesse sentido, o presente trabalho envolve um estudo de controle de qualidade do tacrolimus, na forma de cápsulas, abrangendo o desenvolvimento e validação de métodos espectrofotométricos para quantificação do tacrolimus bem como a realização de estudo preliminar da liberação *in vitro* do fármaco a partir de cápsulas. Os resultados destes estudos estão apresentados, na presente dissertação, na forma de Capítulos, organizados da seguinte forma: Capítulo I – Caracterização da Substância Química de Referência (SQR); Capítulo II -

Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Análise Quantitativa e Capítulo III – Estudo Preliminar de Avaliação *in vitro* Dissolução de Tacrolimus em cápsulas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar métodos simples e sensíveis para a determinação quantitativa de tacrolimus e realizar estudo preliminar de dissolução do fármaco a partir de cápsulas.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Realizar a caracterização da matéria-prima a ser utilizada como substância química de referência;
2. Desenvolver e validar métodos por espectrofotometria na região ultravioleta, através de reação com ácido sulfúrico concentrado (98%), para determinação quantitativa de tacrolimus em cápsulas;
3. Desenvolver e validar método espectrofotométrico, envolvendo reação de complexo de transferência de carga com iodo, para determinação quantitativa de tacrolimus em cápsulas;
4. Realizar estudo comparativo dos métodos propostos;
5. Realizar estudo preliminar de avaliação *in vitro* de tacrolimus em cápsulas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

O tacrolimus (FK 506), macrolídeo isolado do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, é um potente imunossupressor com atividade em transplante de órgãos sólidos tais como fígado, rim, coração, intestino delgado, pâncreas e medula óssea. É também indicado para tratamento de dermatite atópica, lupus eritematoso, psoríase e vitiligo (NGHIEM et al., 2002). É eficaz na prevenção da rejeição aguda em transplantes hepáticos e renais, apesar da comprovada incidência de efeitos colaterais como nefro e neurotoxicidade. Estudos demonstraram, no entanto, vantagens no uso do tacrolimus quando comparado com outros medicamentos, como a ciclosporina, havendo significativa melhora no perfil dos riscos cardíacos e da função renal, bem como prolongamento do tempo de sobrevivência (JUREWICZ, 2003). A redução da hiperlipidemia, ausência de hipertensão arterial, diabetes e lapsos de memória também foram observados (SELZNER et al., 2001). Distúrbio no metabolismo da glicose, diarreia, prurido e alopecia são alguns dos outros efeitos colaterais relatados (SCOTT et al., 2003).

O tacrolimus (Figura 1) foi descoberto no Japão em 1984, tendo sido aprovado para comercialização neste país em 1996. Nos Estados Unidos sua aprovação ocorreu em 1994 (UCHIDA, et al., 2002). Na Europa encontra-se disponível desde 1990 (PRATSCHKE et al., 1998). É uma lactona macrolídea com um alfa, beta-dicetoamido hemiacetal incorporado em um anel de 23 estruturas (TANAKA et al., 1987; KINO et al., 1987). Quimicamente corresponde [3S[3R*[E(1S*,3S*,4S*)],4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,16R*,18S*,19S*,26aR*]]5, 6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26^a-hexadecahidro 5, 19 dihidroxi-3-[2-(4-hidroxi-metoxiciclohexil)-1-metiletilenil]-14,16-dimetoxi-4,10,12,18-tetrametil-8-(2-propenil)-5,19-epoxi 3H pirido[2,1c][1,4] oxaazaciclotricosina 1,7,20,21 (4H, 23H)-tetrona,monohidrato (GOTO et al., 1991). Sua fórmula empírica é C₄₄H₆₉NO₁₂ H₂O, com peso molecular de 822,05. Apresenta-se como um pó branco, solúvel em acetonitrila, metanol, etanol, acetona, clorofórmio, e insolúvel em água e hexano (TANAKA et al., 1987; KINO et al., 1987).

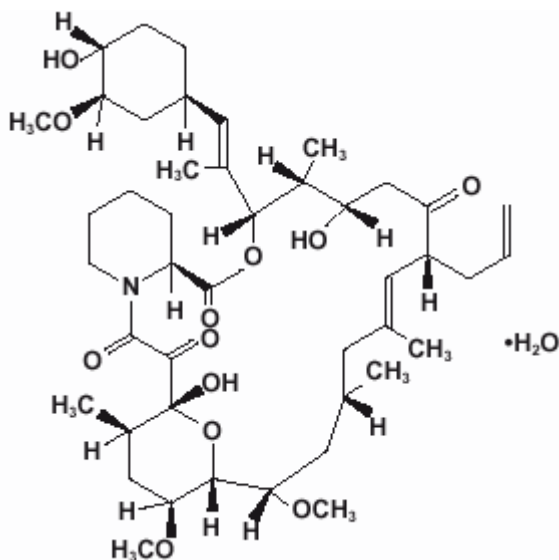


Figura 1 – Estrutura química do tacrolimus.

2.2 Características farmacocinéticas

A farmacocinética do tacrolimus é bastante complexa. Sua absorção é variável e incompleta, determinando uma biodisponibilidade que varia entre 4% e 89%, sendo em média de 20% a 25% (BARROS et al., 1987). A absorção do tacrolimus não é influenciada pela bile, o que representa uma vantagem particular deste fármaco no transplante hepático (VENKATARAMANAN et al., 1995). Sua concentração máxima é alcançada em 30 a 60 minutos, depois circula ligado às proteínas plasmáticas, linfócitos e hemácias, sofrendo metabolização hepática, resultando em mais de 15 metabólitos. A meia-vida de eliminação média é de 10 horas, sendo maior em crianças e reduzida na presença de severa disfunção hepática (SPENCER et al, 1997).

2.3 Mecanismo de ação

O tacrolimus liga-se aos receptores das células chamados proteínas conectoras FK. O complexo fármaco-protéico resultante inibe a calcineurina (transmissor de fosfatase dependente de cálcio) que, por sua vez, reduz a atividade dos linfócitos T do sistema imunológico. Como consequência disto, as células T não liberam suas citocinas, ocasionando a inflamação, vermelhidão e o prurido (PEARL et al., 2004). O tacrolimus tem mecanismo de ação idêntico ao da ciclosporina.

Entretanto, ao contrário desta, que se liga à ciclofilina, une-se a uma imunofilina distinta, FKBP12. O complexo FKBP12-tacrolimus inibe diretamente a calcineurina, impedindo a desfosforilação do fator de transcrição NFAT e, conseqüentemente, a liberação da interleucina-2, responsável pela ativação dos linfócitos T. Como resultado desta ação molecular, o fármaco inibe especialmente a resposta imune mediada por células (LASMAR&LASMAR, 2005).

Vários estudos multicêntricos têm demonstrado que o tacrolimus, quando associado à azatioprina e, principalmente, ao micofenolato mofetil, diminui a incidência de rejeição aguda nos seis primeiros meses de transplante renal, melhorando após cinco anos a sobrevida e a função renal do enxerto, além de reduzir o uso de fármacos anti-hipertensivos e anti-hiperdêmicos, quando comparada com a ciclosporina. Sua eficácia tem sido demonstrada como tratamento de resgate da rejeição aguda resistente ao tratamento convencional (LASMAR&LASMAR, 2005).

2.4 Formas farmacêuticas e apresentação

O tacrolimus é comercializado no Brasil pela Janssen-Cilag, na forma de cápsulas de 1 mg e 5 mg e na forma de injetáveis, contendo 5 mg/mL, com o nome comercial de Prograf[®]. A SP-Farma disponibiliza a matéria-prima.

2.5 Métodos de determinação

A determinação de tacrolimus em fluídos biológicos tem sido relatada na literatura científica, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a técnica mais utilizada. Recentemente, Garcia et al. (2004) realizaram revisão abordando as técnicas analíticas empregadas para monitorização biológica de ciclosporina A e tacrolimus. Segundo os autores, os fármacos imunossupressores apresentam estreita faixa entre a dose terapêutica e a tóxica, havendo necessidade desta monitorização para a determinação da dose farmacêutica para cada paciente, respeitando os ajustes individuais. Diferentes fluídos biológicos, tais como, soro, plasma e sangue total, podem ser utilizados nessa monitorização, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa MS/MS, a técnica mais utilizada. Porém, metodologias como ensaio imunoenzimático de

micropartículas ou ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) têm sido utilizadas na rotina laboratorial.

Existem poucos relatos de métodos para determinação quantitativa de tacrolimus em formas farmacêuticas, não havendo, até o momento, monografias disponíveis em farmacopéias. Dentre os métodos descritos na literatura, a CLAE com detecção no ultravioleta, é a técnica mais utilizada.

Namiki et al. (1995) avaliaram o tacrolimus e suas formas tautoméricas, denominadas I e II, por CLAE, utilizando coluna de fase reversa C18, água: álcool isopropílico: tetrahidrofurano (5:2:2, V/V) como fase móvel e detecção em 220 nm.

Em 1996, Tripodi e colaboradores desenvolveram método por cromatografia micelar eletrocínética capilar, com detecção em 214 nm. A separação eletroforética foi realizada utilizando solução contendo tampão fosfato pH 7,5 (20 mM), dodecilsulfato de sódio (50 mM) e, como modificador orgânico, metanol.

Xu et al. (2005) propuseram método para determinação quantitativa do tacrolimus e para a avaliação da uniformidade de conteúdo do fármaco em pomadas. O método empregou coluna TSK ODS-80, com detector DAD a 220 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 55 °C. A fase móvel foi constituída de água:isopropanol:tetrahidrofurano (5:2:2), a uma vazão de 0,6 mL/min.

Recentemente, Moyano et al. (2006), desenvolveram e validaram método por CLAE, com detecção no ultravioleta (210 nm), para determinação de tacrolimus em cápsulas. A fase móvel, composta de metanol:água (90:10), foi bombeada isocraticamente a uma vazão de 0,8 mL/min, à temperatura ambiente. Estudos de degradação forçada usando ácido, base, água, peróxido de hidrogênio, aquecimento e luz foram igualmente estudados pelos autores. O método mostrou-se linear, na faixa de concentração de 0,09 a 0,24 mg/mL ($r = 0,9997$). Os valores de coeficiente de variação (CV %) para as análises realizadas no mesmo dia e em diferentes dias foram 1,28 e 2,91%, respectivamente. A recuperação variou de 98 a 102%.

2.6 Estudos de estabilidade

Estudos da estabilidade de tacrolimus em injetáveis, soluções extemporâneas e solução oftálmica foram encontrados na literatura. Taormina et al. (1992) avaliaram a estabilidade de tacrolimus em diferentes diluentes (dextrose 5% e cloreto de sódio 0,9%) e diferentes embalagens (vidro, cloreto de polivinila e poliolefina). O método utilizado no referido estudo foi a CLAE, empregando coluna de fase reversa C18; detector ultravioleta, configurado para comprimento de onda 214 nm; fase móvel constituída de acetonitrila: água (65:35), com vazão de 1,7 mL/min e temperatura a 70°C. O método apresentou linearidade ($r > 0,99$) na faixa de concentração de 40 a 60 µg/mL.

A estabilidade do tacrolimus injetável, em solução de preparação parenteral, foi avaliada por Ku et al. (1996) através de CLAE. Misturas do tacrolimus com solução parenteral contendo 4,25% de aminoácidos, 25% de dextrose e eletrólitos, foram preparadas e avaliadas visualmente para observar alterações de cor, turbidez e precipitação. A concentração do fármaco foi determinada por CLAE logo após o preparo da mistura e após 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h. A concentração do fármaco não se alterou em 24 horas, não tendo sido observada alterações de cor, turbidez ou precipitação.

Jacobson et al. (1997), avaliaram a estabilidade de tacrolimus em suspensão extemporânea oral, preparada a partir de cápsulas, para uso pediátrico. As suspensões foram armazenadas em frascos de vidro e em frascos de plástico âmbar, e foram estocadas à temperatura ambiente (24-26°C). Imediatamente após a preparação e após 7, 15, 30, 45 e 56 dias as amostras foram analisadas por CLAE, empregando o mesmo método escrito por Taormina et al. (1992). Durante o período estudado, a concentração do fármaco foi de, no mínimo, 98%, não tendo sido observadas alterações de cor, odor e pH.

Estudos para avaliar a estabilidade e a compatibilidade física da associação de tacrolimus e fluconazol em solução de cloreto de sódio de aplicação intravenosa, foram realizados por Johnson & Truong (1996). A solução injetável do tacrolimus foi combinada com solução injetável do fluconazol em frasco de vidro que foi mantido à temperatura ambiente (23-25°C). As amostras foram analisadas imediatamente após a mistura dos injetáveis e após 1,5 e 3,0 h, através de CLAE, análise visual e pH.

Han et al. (2006), avaliaram a estabilidade física e microbiológica de suspensões extemporâneas para uso pediátrico, durante o período de estoque de 8 semanas, recomendado para essa formulação. As suspensões foram preparadas pela mistura do conteúdo de cápsulas de tacrolimus e xarope simples (1:1) e avaliadas quanto à alterações no tamanho das partículas e aparecimento de cristais, e também quanto às propriedades microbiológicas. Os estudos indicaram que as suspensões foram física (tamanho de partículas) e microbiologicamente estáveis no período de tempo sugerido.

3 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

3.1 Introdução

As substâncias utilizadas como referência em ensaios de identificação, quantificação e validação, devem apresentar elevado grau de pureza. As substâncias obtidas de farmacopéias (Americana, Européia, Brasileira) são classificadas como compendiais, e não necessitam de caracterização antes de serem utilizadas. As substâncias de referência podem ser obtidas, também, de fontes não oficiais, sendo classificadas de não compendiais, as quais devem ser cuidadosamente caracterizadas antes do uso para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

Como já mencionado, o tacrolimus não possui, até momento, monografias em farmacopéias, não havendo, portanto, padrões de referência para essa substância. Devido a isso, utilizou-se como substância química de referência (SQR) a matéria-prima de tacrolimus, gentilmente cedida pela empresa SP Farma (São Paulo/SP, Brasil), com teor declarado de 98,8 %, identificada pelo lote 05130-1 (dados encontrados no certificado de análise emitido pelo fornecedor).

Em virtude da SQR do fármaco em estudo ser classificada como não compendial, foram realizadas análises espectroscópicas por ressonância magnética nuclear de hidrogênios e de carbonos, e por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), para comprovar a identidade da substância. A seguir, a matéria-prima foi avaliada por: determinação da faixa de fusão e por análise térmica (calorimetria exploratória diferencial - DSC), para comprovar sua pureza.

3.2 Análise qualitativa

3.2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN ^1H) e de carbonos (RMN ^{13}C)

A ressonância magnética nuclear é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas de estudo dos aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução (KAISER, 2000).

O espectro de RMN ^1H do tacrolimus SQR foi obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX 400, registrado a 400 MHz, usando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente, e o espectro correspondente está apresentado na Figura 2. Verificou-se que os resultados dos deslocamentos químicos dos hidrogênios estavam em acordo com os deslocamentos descritos por Dale et al. (1991), conforme pode ser observado no espectro apresentado no Anexo desta dissertação.

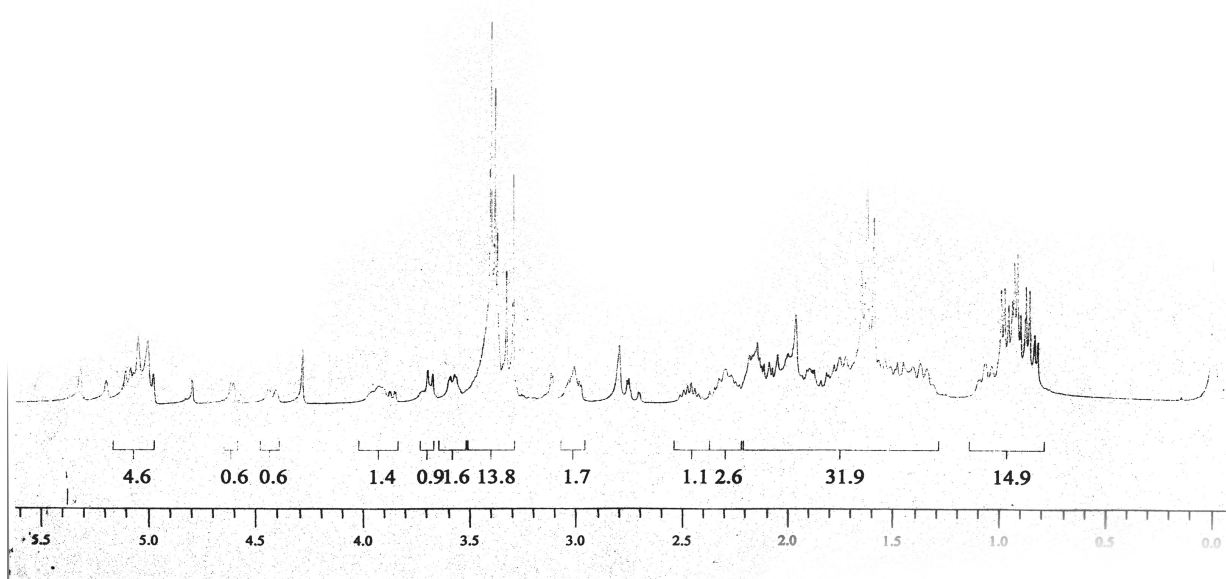


Figura 2 – Espectro RMN ^1H do tacrolimus SQR (400 MHz, CDCl_3)

O espectro de RMN ^{13}C do tacrolimus foi igualmente obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX de 400 MHz, usando CDCl_3 como solvente, e encontra-se na Figura 3. Da mesma forma que o espectro de RMN ^1H , verificou-se que os deslocamentos dos carbonos foram concordantes com os apresentados por Dale et al. (1991), cujo espectro encontra-se igualmente em Anexo na presente dissertação.

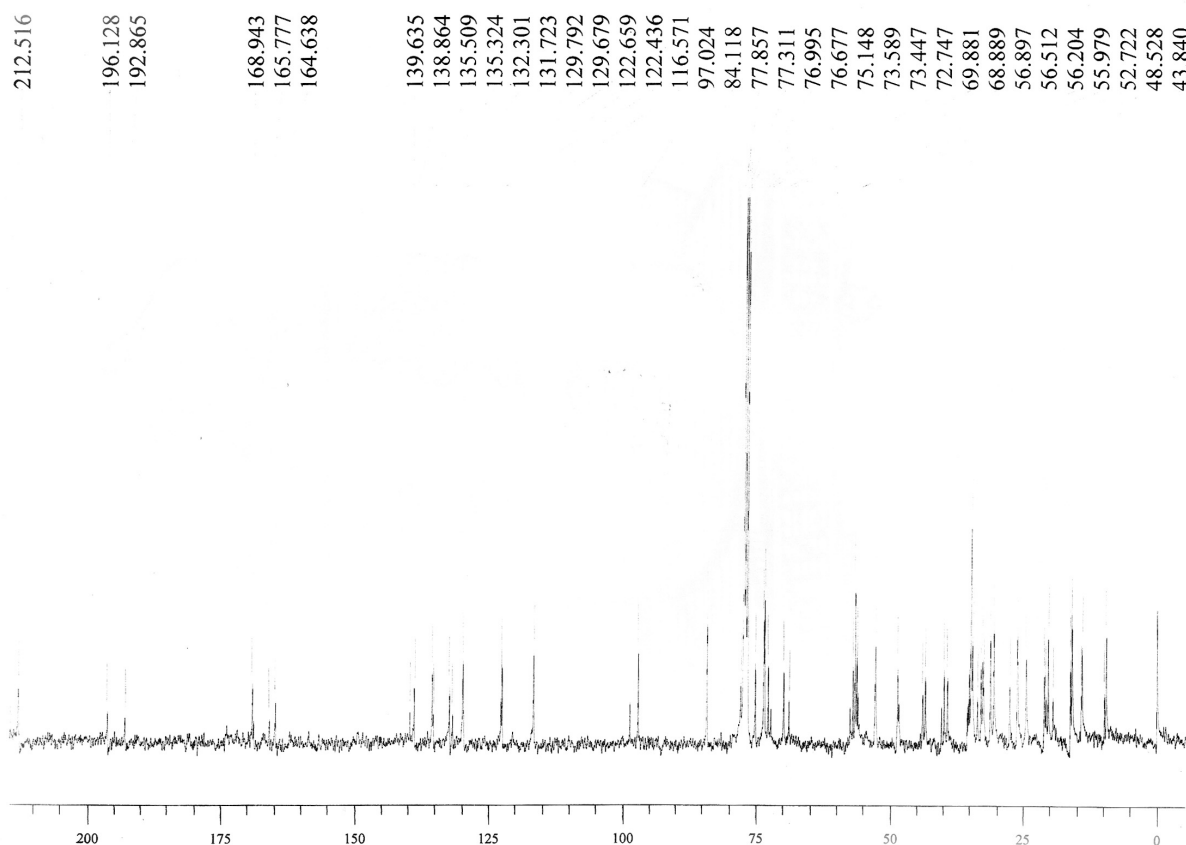


Figura 3 – Espectro RMN¹³C do tacrolimus SQR (400 MHz, CDCl₃)

3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV é uma das técnicas mais utilizadas na identificação de substâncias, permitindo a determinação dos grupos funcionais da mesma. Cada grupo absorve em frequência características de radiação na região do IV (WATSON 1999; GIL et al., 2005).

A presença de pequenas quantidades de impurezas não altera significativamente o espectro de IV das substâncias. No entanto, fatores como polimorfismo, formação de hidretos, variações no tamanho e orientações de cristais podem originar alterações significativas na aparência e distribuição dos picos de absorção (SKOOG et al., 2002).

O espectro de absorção no IV do tacrolimus, realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, foi obtido em espectrofotômetro IR, marca Shimadzu modelo IR Prestige-21. Para as análises foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (200 mg) contendo tacrolimus SQR.

O espectro de IV está apresentado na Figura 2, onde se verificam as mesmas bandas características citadas na literatura (HONBO et al., 1987).

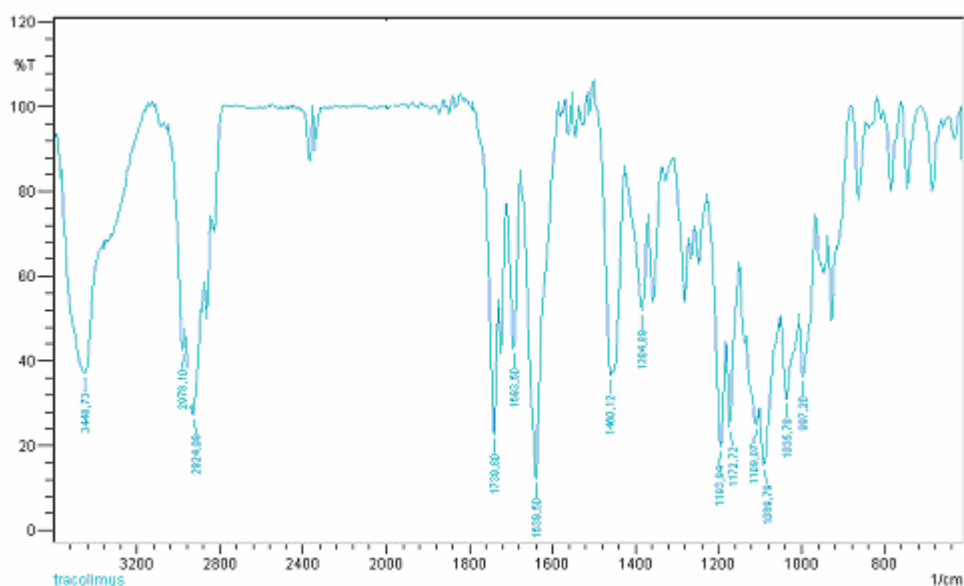


Figura 4 – Espectro na região do IV do tacrolimus (SQR)

3.2.3 Determinação da faixa de fusão

Esta análise qualitativa fornece informações do grau de pureza das substâncias em ensaio, e é utilizada para determinar a qualidade das mesmas. A simplicidade, rapidez e baixo custo do equipamento são algumas vantagens da medida do ponto de fusão (GIL et al., 2005).

A faixa de fusão do tacrolimus SQR foi determinada utilizando-se de aparelho de ponto de fusão Gehaka, modelo PF 1000. Pequena quantidade da SQR foi introduzida em tubo capilar e, posteriormente, inserida na célula de aquecimento. A temperatura em que os cristais da amostra começaram a se dissolver nas paredes no tubo foi definida como início da faixa de fusão, e a temperatura em que a substância se tornou líquida foi definida como final da faixa de fusão. Foram realizadas três determinações.

O tacrolimus apresentou faixa de fusão média de 127,6 a 128,9 °C. Os resultados obtidos podem indicar a pureza do tacrolimus SQR, uma vez que o valor obtido encontra-se dentro da faixa de 127 a 129 °C, descrita na literatura (The Merck Index, 1996).

3.2.4 Análise Térmica

Análise térmica é um termo usado para descrever as técnicas analíticas que medem as propriedades físicas e químicas de uma amostra em função da temperatura.

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é o método de análise térmica amplamente utilizada para caracterização de matérias-primas e produtos acabados, na determinação do grau de pureza, na realização de ensaios de estabilidade, ocorrência de polimorfismo e cinética de decomposição, fornecendo a temperatura e a entalpia de fusão (RODRIGUES et al., 2005). As medições de DSC fornecem informações sobre os efeitos térmicos que são caracterizados por uma mudança na entalpia e pela faixa de temperatura, como o comportamento de fusão, cristalização, transições sólido-sólido e reações químicas.

A curva de DSC do tacrolimus foi obtida em célula DSC-50 da Shimadzu, e foi realizada no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, utilizando cápsulas de alumínio parcialmente fechadas com 2 mg de tacrolimus, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (100 mL/min.) e razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25 a 500°C. O equipamento foi previamente calibrado com índio (ponto de fusão: 156,6°C), (entalpia de fusão = 28,54 J/g) e Zinco (ponto de fusão 419,6°C).

A curva de DSC do tacrolimus, apresentada na Figura 5, demonstra um primeiro evento endotérmico, na faixa de temperatura de 116 a 135 °C, característico da faixa de fusão do processo de fusão da substância, com um consumo de energia de 29,9 J/g. Os outros picos foram evidenciados a partir de 170 °C mas sua avaliação não foi, no entanto, detalhada no presente estudo. No estudo de DSC de cristais de tacrolimus, realizado por HONBO et al. (1987), foi observada a formação de um pico endotérmico a 132 °C, atribuído à fusão da estrutura cristalina.

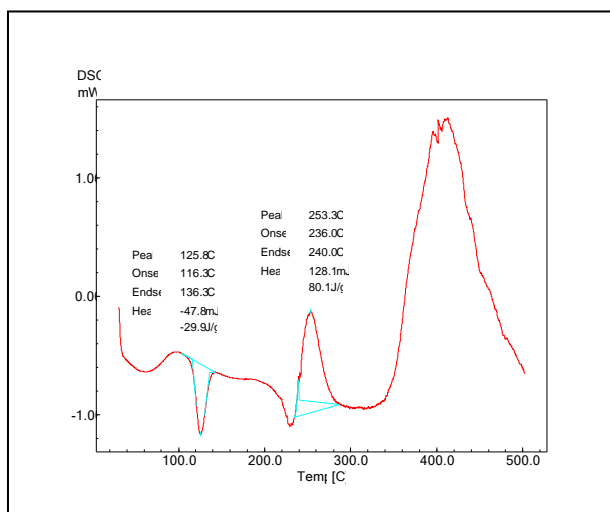


Figura 5 – Curva de DSC do tacrolimus, obtida em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) a 10°C/min.

3.3 Conclusões

Os resultados obtidos nas análises realizadas indicaram a identidade e a pureza da matéria-prima de tacrolimus adquirida, permitindo a utilização da mesma como substância química de referência, nos estudos posteriores.

4 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA

4.1 Introdução

A garantia da segurança e eficácia de um fármaco em uma dada forma farmacêutica depende de um controle rigoroso que deve ser realizado em diferentes etapas da produção do medicamento. Nestas diferentes etapas, a liberação ou rejeição do produto é baseada em medidas, que são realizadas com auxílio de diferentes técnicas analíticas, visando identificar, quantificar ou avaliar alguma propriedade importante para a forma farmacêutica, verificando-se a conformidade com as especificações estabelecidas. As técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada, CLAE com detecção no UV e cromatografia gasosa, assim como as técnicas espectrofotométricas, como a espectrofotometria de absorção nas regiões do UV, visível e IV, são as mais utilizadas em análise farmacêutica. Métodos mais simples, como os volumétricos, são também muito utilizados. Independente do método empregado, os resultados obtidos devem ser precisos, exatos e confiáveis. A qualidade dos resultados analíticos constitui-se, assim, em instrumento fundamental para a promoção e proteção à saúde.

A validação de um método é um aspecto vital na garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002), e tem por objetivo demonstrar que o mesmo é adequado para o seu propósito (BRASIL, 2003, ICH, 2005, USP, 2006). A validação é um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal, e continua da fase de experimentos e transferência do método (BARROS, 2002; RIBANI et al., 2004).

Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (BARROS, 2002).

Atualmente a literatura sobre validação é bastante vasta, incluindo artigos, guias e resoluções, destacando-se o ICH (2005), USP 29 (2006) e Resolução 899 (BRASIL, 2003).

Os parâmetros analíticos que devem ser avaliados no processo de validação de métodos são: especificidade/seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade); exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Esses termos podem ser descritos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, também como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004).

As características de desempenho que devem ser testadas no processo de validação devem ser baseadas na intenção do uso do método (ICH, 2005; USP 29, 2006; BRASIL, 2003), os quais são divididos em quatro categorias: I) testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas; II) testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matéria-prima; III) testes de performance (ex: dissolução) e IV) testes de identificação.

Para validar um método analítico que tenha por finalidade a determinação quantitativa de fármacos em formas farmacêuticas os parâmetros que devem ser avaliados são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Neste capítulo serão apresentados os métodos espectrofotométricos desenvolvidos para determinação do tacrolimus em cápsulas. O primeiro método empregou reação com ácido sulfúrico concentrado e o segundo, reação de complexo de transferência de carga com Iodo. Após a otimização dos parâmetros experimentais, os métodos foram validados, avaliando-se os parâmetros descritos anteriormente, para demonstrar sua aplicabilidade para fins de quantificação do fármaco na forma farmacêutica avaliada.

4.2 Produto farmacêutico

Amostras de cápsulas contendo 1 mg de tacrolimus, com o nome comercial de Prograf[®].

Excipientes: lactose, hipromelose, croscarmelose sódica e estearato de magnésio.

4.3 Substância química de referência

Como substância química de referência foi utilizada a matéria-prima de tacrolimus, caracterizada conforme descrito no Capítulo II.

4.4 Reagentes e solventes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido sulfúrico concentrado (98%), Merck[®]
- Iodo ressublimado, Merck[®]
- Água destilada[®]
- Água purificada[®]

4.5 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Sartorius[®]
- Banho de ultra-sônico, Thornton[®]
- Bomba de vácuo, Primar[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 Thermo Hypersil[®] (25 cm x 4 mm d.i.) 5 µm, Phenomenex[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 AD_{vp}, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP 5.0[®]
- Destilador, Biomatic[®]
- Espectrofotômetro UV/VIS, Spectronic Genesys 2
- Espectrofotômetro, UV/VIS, Shimadzu[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, Sartorius[®]
- Membrana filtrante de celulose, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Sartorius[®]
- Pipetador transferpette Brand[®]
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]

4.6 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria de absorção na região do UV é uma técnica amplamente utilizada nos laboratórios de controle de qualidade, devido ao seu baixo custo e sua facilidade de execução. Para ser analisado por essa técnica, o fármaco deve possuir grupamentos cromóforos e ter absorvidade adequada em dado solvente. Para ser aplicado para fins quantitativos, o método deve ser livre de interferência do solvente, de impurezas ou excipientes (WATSON, 1999).

Não foram relatados na literatura, até o presente, métodos para determinação de tacrolimus por espectrofotometria na região do ultravioleta na forma farmacêutica cápsulas, o que objetivou o desenvolvimento deste método.

Tabela 1 – Condições experimentais desenvolvidas para análise de tacrolimus através da espectrofotometria na região do UV.

Característica	Descrição
Diluyente	Acetonitrila
Reagente	400 µL de Ácido Sulfúrico Concentrado (98%)
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	295 nm
Solução Branco	400 µL de ácido sulfúrico em 10 mL de Acetonitrila

4.6.1 Validação do método analítico

Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (ICH, 2005; USP 29, 2006; BRASIL, 2003).

4.6.1.1 Especificidade

Foram preparadas soluções de amostras simuladas, contendo apenas os excipientes contidos nas cápsulas, denominadas de amostras simuladas de excipientes (ASE), as quais foram tratadas conforme descrito no item 4.6.1.3. Os

espectros de absorção foram traçados na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, para avaliar possível interferência dos excipientes.

4.6.1.2 Linearidade: curva de calibração

Pesou-se, analiticamente, 10 mg de SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se uma solução com concentração de 500 µg/mL. A partir dessa solução foram transferidas alíquotas de 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 e 1,1 mL, com auxílio de uma bureta, para balões volumétricos de 10 mL, adicionando-se, a cada balão, 400 µL de ácido sulfúrico concentrado. Os volumes foram completados com acetonitrila obtendo-se, respectivamente, soluções com concentrações finais de 30; 35; 40; 45; 50 e 55 µg/mL.

As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 295 nm, utilizando como branco a solução descrita na Tabela 1. As curvas foram preparadas em três dias diferentes. Com os valores de absorvância em função da concentração do tacrolimus foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta da curva de calibração, que foi validada pela análise de variância (ANOVA).

4.6.1.3 Precisão

Foi determinado o peso médio de 20 cápsulas, conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988). O conteúdo das cápsulas foi misturado em gral, para a formação de um pó homogêneo. Pesaram-se, desse pó, quantidades equivalentes a 5 mg de tacrolimus, que foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de 500 µg/mL. As soluções foram filtradas em papel filtro quantitativo, e alíquotas de 0,6 µL, 0,8 µL e 1,0 mL foram transferidas para três balões volumétricos de 10 mL, onde foram adicionados 400 µL de ácido sulfúrico concentrado. Os volumes foram completados com acetonitrila obtendo-se, respectivamente, soluções com concentrações de 30, 40 e 50 µg/mL. Estas soluções foram preparadas em triplicata e foram avaliadas no mesmo dia, para demonstrar a repetibilidade.

Para avaliar a precisão intermediária, as análises foram realizadas em um segundo dia (empregando as três concentrações citadas, igualmente em triplicata), e também utilizando outro espectrofotômetro (somente na concentração de 40 µg/mL).

As leituras foram efetuadas em comprimento de onda de 295 nm, utilizando como branco a solução descrita na Tabela 1.

A concentração do tacrolimus nas amostras foi determinada através da equação da reta obtida no item 4.6.1.2. O valor percentual de tacrolimus nas amostras foi calculado conforme equação abaixo:

$$C_A \% = (C_A \times 100) / C_T$$

Onde:

C_A % = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de tacrolimus encontrada na amostra (µg/mL)

C_T = Concentração teórica de tacrolimus na amostra (µg/mL)

4.6.1.4 Exatidão

Foi verificada pela comparação dos resultados obtidos com o método por CLAE, descrito por Taormina et al., (1992), empregando as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados para a execução do método por CLAE.

Característica	Descrição
Coluna	Thermo Hypersil C18 (25 cm x 4 mm) 5 µm
Fase móvel	Acetonitrila: Água (65:35, v/v)
Vazão	1,7 mL/min
Comprimento de onda	214 nm
Volume injetado	50 µL
Temperatura	60°C

Os constituintes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem da fase móvel, durante 30

minutos, com vazão de 1,7 mL/min. Soluções das amostras foram preparadas na concentração de 500 µg/mL, conforme descrito no item 4.6.1.3. A partir dessa solução foram preparadas soluções com concentrações de 30, 40, e 50 µg/mL em fase móvel. Todas as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 µm, antes de serem analisadas.

4.6.1.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade das soluções de tacrolimus SQR e das amostras, ambas na concentração de 500 µg/mL, diluídas em acetonitrila, as quais foram mantidas a 4°C e à temperatura ambiente (25°C ± 2 °C), por 48 horas. As amostras foram analisadas após os tempos de 0 e 48 horas, empregando procedimento descrito anteriormente. Verificou-se, também, o tempo de estabilidade das soluções após a reação com o ácido.

4.6.2 Resultados e discussão

O desenvolvimento de método espectrofotométrico na região do ultravioleta iniciou-se pela investigação dos espectros de absorção do tacrolimus em diferentes solventes, com o objetivo de definir as bandas de absorção máxima do fármaco e suas intensidades nos diferentes solventes, bem como para escolher o comprimento de onda de trabalho, no qual não fossem observadas interferências de excipientes, impurezas ou de solventes.

Com base na solubilidade do tacrolimus avaliou-se o emprego da acetonitrila, do etanol e do metanol como solventes avaliando-se, simultaneamente, os espectros de absorção da SQR e das amostras de cápsulas. Observou-se, no entanto, que além do tacrolimus apresentar baixa absorvidade nos diferentes solventes testados, houve interferência, possivelmente dos excipientes da formulação das cápsulas. Esses fatores indicaram que a determinação direta do fármaco, apenas por processo de diluição, acarretaria em baixa sensibilidade do método.

Verificou-se, na literatura científica, que antibióticos macrolídeos, com estruturas semelhantes ao tacrolimus, têm sido identificados e quantificados através de reação com ácido sulfúrico concentrado (DANIELSON et al., 1993; HAN et al., 2006) que reage com o antibiótico gerando produto de coloração amarelada, com

máximo de absorção em torno de 300 nm. Avaliou-se, então, a aplicação desse método para determinação de tacrolimus.

Na otimização do método, diferentes volumes de ácido sulfúrico, variando de 100 a 1000 μL , foram testados. Verificou-se que a menor quantidade de ácido sulfúrico, necessária para promover a reação com precisão, foi 400 μL . A acetonitrila foi o solvente escolhido, devido à melhor absorvidade do fármaco nesse solvente.

O espectro de absorção do produto de reação do tacrolimus com ácido sulfúrico concentrado mostrou um forte pico de absorção em torno de 220 nm, e outro pico, de menor intensidade, ao redor de 295 nm (Figura 6A). Os espectros das amostras de cápsulas apresentaram os mesmos máximos de absorção que a SQR (Figura 6B) havendo, no entanto, uma maior absorção em 220 nm, sugerindo uma possível interferência dos excipientes nesse máximo de absorção. Amostras simuladas das cápsulas, contendo apenas os excipientes contidos nas mesmas, foram preparadas, e seus espectros foram traçados, após reação com ácido sulfúrico. Conforme se verifica na Figura 6C, os excipientes apresentaram absorção em torno de 220 nm, não havendo interferência, no entanto, em 295 nm. Com base nesses resultados, o máximo de absorção escolhido para a quantificação de tacrolimus em cápsulas foi 295 nm. Verificou-se, também, que o tempo máximo para realização da leitura, após a reação com ácido sulfúrico, é de 10 minutos.

A intensidade de uma banda de absorção no UV é usualmente expressa como absorvidade molar a uma absorção máxima, ϵ máximo ou $\log \epsilon$ máximo. A absorvidade molar aparente calculada do tacrolimus, após reação com ácido sulfúrico, a 295 nm, foi de $6.794 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

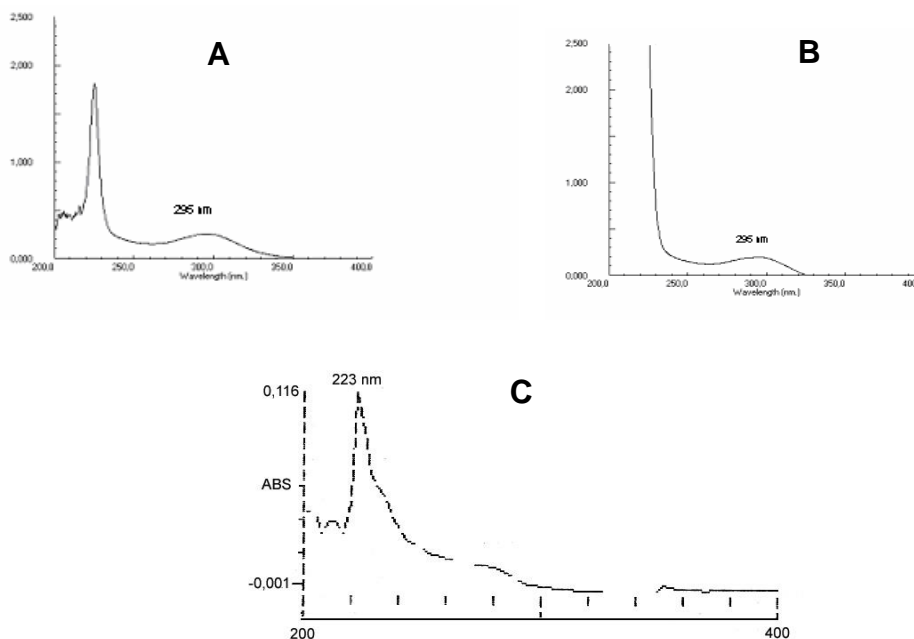


Figura 6 – Espectros de absorção de tacrolimus, após reação com 400 μ L de ácido sulfúrico concentrado, na concentração de 40 μ g/mL em acetonitrila: (A) tacrolimus SQR, (B) cápsulas e (C) amostra simulada de excipientes das cápsulas.

Conforme já mencionado, para demonstrar a aplicabilidade do método para fins de quantificação foram avaliados alguns parâmetros analíticos, que incluíram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade representa a capacidade do método de medir o composto de interesse na presença de outros, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005; USP 29, 2006; BRASIL, 2003). Como demonstrado anteriormente, não houve interferência dos componentes da formulação no comprimento de onda definido para a quantificação. Estudos de degradação forçada do fármaco não foram realizados e, dessa forma, não se pode indicar que o presente método possa ser utilizado para fins de estudo de estabilidade.

A linearidade representa a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de variação, que pode variar de 80 a 120% da concentração de trabalho, quando tiver por finalidade a determinação quantitativa. Para demonstrar a linearidade, o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,99 (BRASIL, 2003).

No presente estudo foram desenvolvidas curvas em três diferentes dias. As absorvâncias médias obtidas foram calculadas (Tabela 3), para traçar a curva de calibração, cuja representação encontra-se na Figura 7.

Tabela 3 – Valores de absorvâncias obtidos para elaboração da curva de calibração do tacrolimus, após reação com ácido sulfúrico concentrado, a 295 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias				CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	
30	0,231	0,230	0,230	0,230	0,25
35	0,278	0,277	0,280	0,278	0,55
40	0,330	0,329	0,329	0,329	0,18
45	0,378	0,379	0,378	0,378	0,15
50	0,430	0,429	0,429	0,429	0,13
55	0,477	0,477	0,487	0,480	1,20

CV% - coeficiente de variação percentual

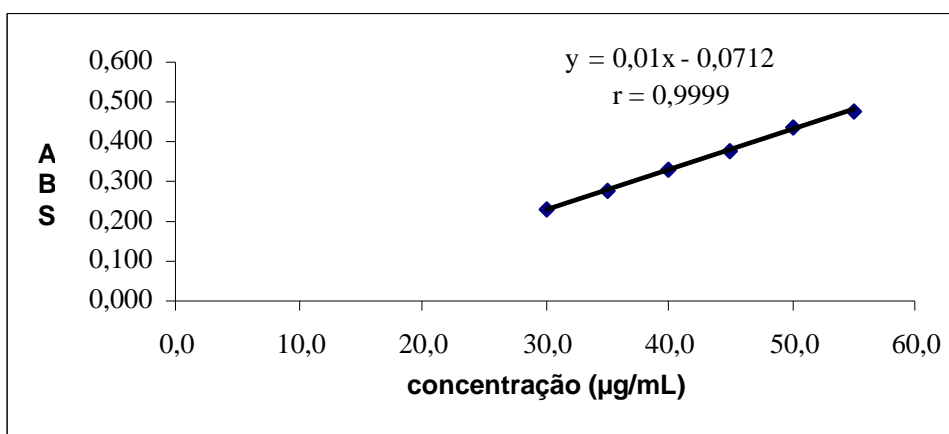


Figura 7 – Representação gráfica da curva de calibração do tacrolimus (SQR) obtida para o método espectrofotométrico, após reação com ácido sulfúrico concentrado, a 295 nm.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de tacrolimus SQR apresentaram correlação entre absorvância e concentração, no intervalo de concentração utilizado, com coeficiente de correlação de 0,9999. A equação da reta para o método foi $y = 0,01 x - 0,0712$, onde x representa a concentração (em $\mu\text{g/mL}$) e y representa a absorvância. A análise da variância (ANOVA) demonstrou que a regressão linear foi significativa, não havendo

desvio significativo da linearidade ($P < 0,05$), conforme Tabela 4. Os resultados obtidos conferem a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

Tabela 4 – Resultados da curva de calibração do tacrolimus SQR, obtida pelo método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA), para o método espectrofotométrico, após reação com ácido sulfúrico, a 295 nm.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	30 – 55 µg/mL
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,01x - 0,0712$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,01 \pm 0,0001$
Intercepto (b) ± desvio padrão	$- 0,0712 \pm 0,003$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
Análise de variância	
Regressão linear	21.331 (4,75)*
Desvio da linearidade	0,69 (3,26)*

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P < 0,05$

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade de resultados obtidos entre análises independentes efetuados na mesma amostra. É usualmente expresso como desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV%) de diversas medidas.

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, intermediária e reprodutibilidade, sendo que essa última é avaliada através de estudos colaborativos realizados entre diferentes laboratórios.

A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo, e pode ser verificada através de nove determinações (três concentrações, em triplicata) ou através de seis determinações na mesma concentração. No presente estudo, a repetibilidade (precisão intra-dia), foi avaliada através da análise do tacrolimus nas amostras em três diferentes concentrações (30, 40 e 50 µg/mL), com três repetições cada.

A precisão intermediária representa a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

No presente trabalho as amostras foram avaliadas em diferentes dias para demonstrar a precisão intermediária.

Os valores experimentais obtidos na determinação do tacrolimus nas amostras estão apresentados na Tabela 5. Os baixos valores dos coeficientes de variação obtidos (< 0,5 %), tanto nas análises realizadas no mesmo dia como em dias diferentes, indicam a boa precisão do método. A precisão intermediária foi avaliada, também, através de ANOVA, que indicou não haver diferença significativa entre os resultados obtidos em dias diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 5 – Valores experimentais obtidos na determinação do tacrolimus em cápsulas, pelo método espectrofotométrico, após reação com ácido sulfúrico concentrado, a 295 nm, para avaliação da precisão.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% \pm DP		
	Dia 1	Dia 2	Análise realizada em outro espectrofotômetro
30	99,52 \pm 0,57	99,34 \pm 0,31	-
40	99,50 \pm 0,64	99,30 \pm 0,24	99,35 \pm 0,78
50	99,29 \pm 0,52	99,12 \pm 0,21	-
% média intra-dias \pm dp	99,44 \pm 0,13	99,25 \pm 0,12	-
CV%	0,13	0,12	-
% média entre-dias \pm dp	99,34 \pm 0,134		
CV%	0,13		
ANOVA entre análises	0,27 (5,79)*		

*Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p < 0,05$

DP = desvio padrão

CV% = coeficiente de variação percentual

A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são baseados no uso de materiais de referência certificado; na comparação do método proposto com o método de referência; no uso de ensaios de adição de padrão (recuperação) e em estudos colaborativos.

No presente estudo, a avaliação da exatidão foi realizada através da comparação dos resultados obtidos entre o método proposto e o método por CLAE, descrito por Taormina et al., 1992. A comparação dos resultados obtidos por ambos os métodos foi realizada através de ANOVA, que demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos (Tabela 6), indicando exatidão equivalente ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Análise comparativa entre o método espectrofotométrico no UV e o método cromatográfico (CLAE) descrito por Taormina et al (1992).

	UV (n=3)	CLAE (n=3)
Média (%)	99,44	98,21
Desvio Padrão	0,13	0,52
Variância	0,017	0,270
ANOVA	3,9 (7,71)*	

* Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p < 0,05$

A robustez de um método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, provendo indicação da sua dependência durante o uso normal. Deve ser considerada durante o processo de desenvolvimento do método, pois se for constatado que o método é susceptível à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003). A estabilidade das soluções analíticas, a variação do pH das soluções, a temperatura e o uso de solventes de diferentes fabricantes são alguns dos fatores que podem ser considerados na avaliação da robustez. A estabilidade das soluções analíticas foi avaliada para demonstrar a robustez. Verificou-se que as soluções foram estáveis por até 48 horas em temperatura ambiente. Durante o processo de otimização do método foi possível verificar que alguns parâmetros não podem ser alterados, indicando que alterações deliberadas no método não são possíveis. Os parâmetros que não podem ser alterados são: a quantidade de ácido sulfúrico, que deve ser de 400 μL para para produzir a reação; a faixa de concentração, que não pode estar fora da faixa de linearidade (30 - 55 $\mu\text{g/mL}$) e o tempo decorrido entre o preparo da amostra e a leitura de absorvância, que não deve ser superior a 10 minutos.

O método espectrofotométrico, utilizando ácido sulfúrico concentrado e as condições descritas na Tabela 1, mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser utilizado para fins de quantificação de tacrolimus em cápsulas.

4.7 Espectrofotometria por complexo de transferência de carga com iodo

O principal objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para análise de tacrolimus em matéria-prima e em cápsulas, alternativo ao proposto anteriormente.

Elétrons aceptores π e σ reagem com compostos básicos nitrogenados para formar complexos de transferência de carga ou ânions radicalares, conforme a polaridade do solvente utilizado. O iodo tem sido utilizado como acceptor σ na análise de diversos fármacos como fluoxetina e sertralina (BEBAWY et al., 1999), lanzoprazol e pantoprazol (MOUSTAFA, 2000), loperamida (SHERIF et al., 2000), cefalosporina (SALEH et al., 2001), clobetazol (MOSTAFA et al., 2002), carvedilol (CARDOSO et al., 2007), entre outros.

A aplicação da reação do tacrolimus com iodo, para determinação quantitativa de fármaco, foi então considerada, tendo em vista que a aplicação deste método não se encontra descrita, ainda, na literatura. As condições experimentais otimizadas para análise do tacrolimus para esse método encontram-se descritas na tabela 7.

Tabela 7 – Condições experimentais utilizadas para a execução do método por complexo de transferência de carga, utilizando iodo.

Características	Descrição
Diluyente	Acetonitrila
Reagente	4 mL solução iodo 0,01 M, em acetonitrila
Cubeta	Quartzo com 1 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	365 nm
Solução Branco	4 mL solução de iodo 0,01M, qsp 10 mL acetonitrila

4.7.1 Validação do método analítico

Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (ICH, 2005; USP 29, 2006, BRASIL, 2003).

4.7.1.1 Especificidade

Foram preparadas soluções de amostras simuladas, contendo apenas os excipientes contidos nas cápsulas, denominadas de amostras simuladas de excipientes (ASE), as quais foram tratadas conforme descrito no item 4.6.1.3. Os espectros de absorção foram traçados na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, para avaliar possível interferência dos excipientes.

4.7.1.2 Linearidade: Curva de calibração

Pesou-se, analiticamente, 10 mg de SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se uma solução com concentração de 500 µg/mL. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 100; 120; 140; 160; 180 e 200 µL, com auxílio de pipetador automático, para balões volumétricos de 10 mL, adicionando-se, a cada balão, 4 mL de solução de iodo 0,01M. Os volumes foram completados com acetonitrila obtendo-se, respectivamente, soluções com concentrações finais de 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10 µg/mL.

As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 365 nm, utilizando como branco a solução descrita na Tabela 7. As curvas foram preparadas em três diferentes dias. Com os valores obtidos das absorvâncias em função da concentração do tacrolimus foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta da curva de calibração, que foi validada pela análise de variância (ANOVA).

4.7.1.3 Precisão

Pesou-se, da mistura dos conteúdos das cápsulas preparadas conforme item 4.6.1.3, quantidades equivalentes a 1 mg de tacrolimus, que foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações teóricas de 100 µg/mL. As soluções foram filtradas em filtro quantitativo, e alíquotas de 0,8 mL foram transferidas, com auxílio de pipetador, para balões volumétricos de 10 mL, onde foram adicionados 4 mL de solução de iodo 0,01M. Os volumes foram completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentração de 8 µg/mL. Foram realizadas análises no mesmo dia (n=6), para demonstrar a repetibilidade, e em diferentes dias (n=2), para demonstrar a precisão intermediária.

As leituras foram efetuadas no comprimento de onda de 365 nm, utilizando como branco a solução descrita na Tabela 7.

A concentração do tacrolimus nas amostras foi determinada utilizando a equação da reta obtida no item 4.7.1.2, e o valor percentual de tacrolimus nas amostras foi calculado conforme equação descrita no item 4.6.1.

4.7.1.4 Exatidão

Foi verificada pela comparação dos resultados obtidos com o método por CLAE, descrito por Taormina et al., (1992), empregando as condições descritas na Tabela 2, item 4.6.1.4.

4.7.1.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade das soluções de tacrolimus SQR e das amostras, ambas na concentração de 500 µg/mL, diluídas em acetonitrila, as quais foram mantidas a 4°C e à temperatura ambiente (25°C ± 2°C), por 48 horas. As amostras foram analisadas após os tempos de 0 e 48 horas, empregando procedimento descrito anteriormente.

4.7.2 Resultados e discussão

Alguns fármacos reagem com elétrons aceptores sigma do iodo formando complexo de transferência de carga, seguido pela formação do íon triiodeto. Este tipo de reação tem sido muito utilizada na determinação de compostos básicos nitrogenados doadores de elétrons, como mencionado anteriormente. O complexo de transferência de carga formado apresenta máximos de absorção em 300 nm (de alta intensidade) e em 365 nm (menor intensidade), seguido pela formação do íon triiodeto, que apresenta máximo de absorção na região de 270 a 310 nm (BEBAWY et al., 1999).

A coloração do iodo 0,01 M, em acetonitrila, é fortemente marron. Com adição da solução de tacrolimus em acetonitrila esta muda imediatamente para levemente caramelo, sugerindo que ocorra uma reação iônica entre tacrolimus e iodo, com transição do tacrolimus para o iodo.

Como pode ser observado na Figura 8A, o espectro de absorção do produto de complexação do tacrolimus com iodo, apresentou máximos de absorção em torno de 300 e em 365 nm. A solução de iodo 0,01M (Figura 8C), sem tacrolimus e utilizando como branco apenas acetonitrila, apresentou máximo de absorção em torno de 285 nm. Segundo a literatura, o íon I^- tem máximo de absorção característico em torno de 250 nm e o I_2 em 460 nm (KEBEDE & LINDQUIST, 1998). Nas Figuras 8B e 8D encontram-se, respectivamente, os espectro de absorção das amostras de cápsulas e os espectros da SQR e amostras sobrepostos, evidenciando os mesmos máximos de absorção, a 365 nm.

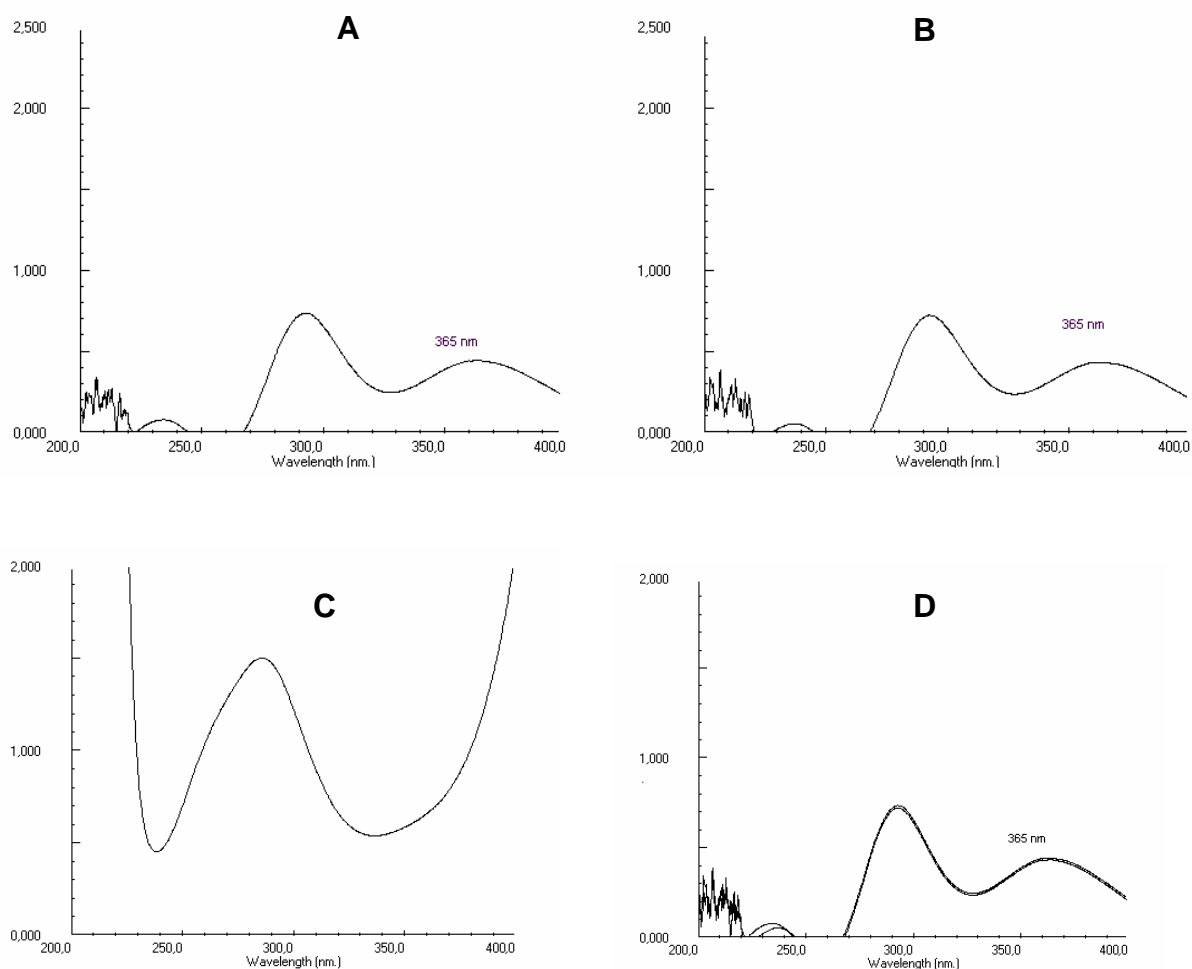


Figura 8 – Espectros de absorção de tacrolimus, após reação de complexo de transferência de carga com iodo 0,01N, na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$, em acetonitrila: (A) tacrolimus SQR; (B) cápsulas; (C) solução de iodo 0,01M em acetonitrila; (D) Sobreposição dos espectros de absorção da SQR e cápsulas.

Considerando que o máximo de absorção em torno de 300 nm pode ser atribuído à solução de iodo 0,01M, o máximo de absorção escolhido para a quantificação de tacrolimus em cápsulas foi 365 nm. A absorvidade molar aparente calculada do tacrolimus, após reação com iodo 0,01M, a 365 nm, foi de $64631\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Nas determinações das condições experimentais foi observado que 4 mL de iodo 0,01 M, em acetonitrila, foram suficientes para produzir uma coloração máxima e reproduzível. A coloração formada mostrou ser estável por 5 horas.

Assim como no método anterior, a aplicabilidade do método para fins de quantificação foi demonstrada através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade foi demonstrada através do espectro de absorção da amostra simulada de excipiente, que demonstrou não haver interferência dos componentes da formulação no comprimento de onda definido para a quantificação.

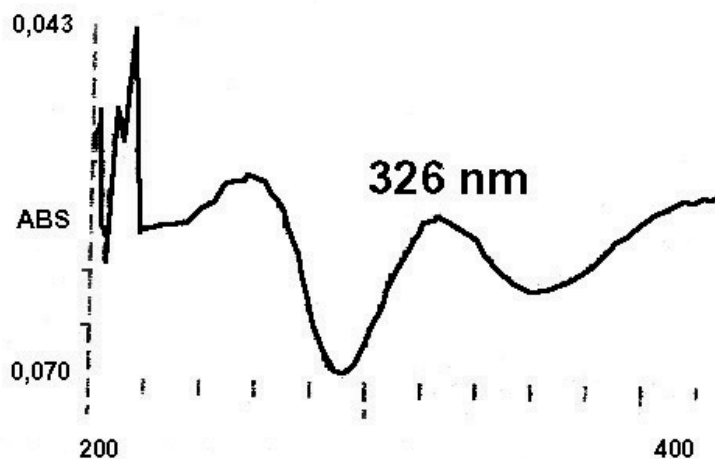


Figura 9 - Espectro da amostra simulada de excipientes de cápsulas.

Foram desenvolvidas curvas em três diferentes dias, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar a curva de calibração (Tabela 8), cuja representação encontra-se na Figura 10.

Tabela 8 – Valores de absorvâncias obtidos para elaboração da curva de calibração do tacrolimus, após reação com iodo 0,01M, a 365 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias				CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	
5,0	0,349	0,350	0,350	0,350	0,17
6,0	0,455	0,450	0,455	0,453	0,64
7,0	0,555	0,540	0,543	0,546	1,45
8,0	0,655	0,640	0,643	0,646	1,23
9,0	0,755	0,740	0,743	0,746	1,06
10,0	0,855	0,840	0,843	0,843	0,74

CV% - coeficiente de variação percentual

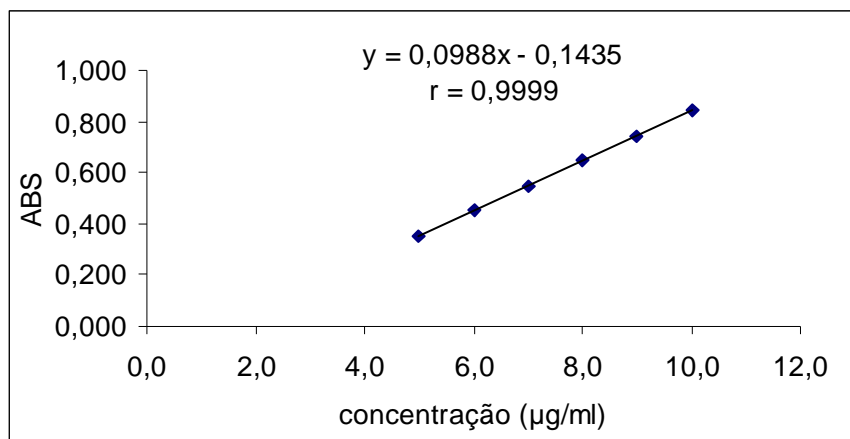


Figura 10 – Representação gráfica da curva de calibração do tacrolimus obtida para o método espectrofotométrico com Iodo, a 365 nm.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de tacrolimus SQR apresentaram correlação entre absorvância e concentração, no intervalo de concentração utilizado, com coeficiente de correlação de 0,999. A equação da reta para o método foi $y = 0,0988x - 0,1435$, onde x representa a concentração (em µg/mL) e y representa a absorvância. A análise da variância (ANOVA) demonstrou que a regressão linear foi significativa, não havendo desvio significativo da linearidade ($P < 0,05$), conforme Tabela 9. Os resultados obtidos conferem a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

Tabela 9 – Resultados da curva de calibração do tacrolimus SQR, obtida pelo método dos mínimos quadrados e análise da variância (ANOVA), para o método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com iodo 0,01M, a 365 nm.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	5 - 10 µg/mL
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,0988x - 0,1435$
Inclinação (a) ± desvio padrão	$0,0988 \pm 0,012$
Intercepto (b) ± desvio padrão	$-0,1435 \pm 0,015$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
Análise de variância	
Regressão linear	11807,44 (4,75)*
Desvio da linearidade	0,42 (3,26)*

* Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para $P < 0,05$

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia).

Os valores experimentais obtidos na determinação do tacrolimus nas amostras estão apresentados na Tabela 10. Os baixos valores dos coeficientes de variação obtidos ($< 0,2\%$), tanto nas análises realizadas no mesmo dia como em dias diferentes, indicam a boa precisão do método. A análise da variância (ANOVA) indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas em dias diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 10 – Valores experimentais obtidos na determinação do tacrolimus em cápsulas, pelo método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com iodo $0,01M$, a 365 nm , para avaliação da precisão.

Amostras	% \pm DP	
	Dia 1	Dia 2
1	99,8	99,8
2	99,8	99,8
3	99,5	99,8
4	99,5	-
5	99,5	-
6	99,8	-
% média intra-dias \pm dp	99,65 \pm 0,16	99,8 \pm 0,00
CV%	0,16	0,00
% média intra-dias \pm dp	99,73 \pm 0,07	
CV%	0,11	
ANOVA entre análises	2,33 (7,71)*	

*Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p < 0,05$

DP = desvio padrão

CV% = coeficiente de variação percentual

Da mesma forma que o método anterior, a avaliação da exatidão foi realizada através da comparação dos resultados obtidos entre o método por complexo de transferência de carga proposto e o método por CLAE, descrito por Taormina et al., 1992. A comparação dos resultados obtidos por ambos os métodos foi realizada através de ANOVA, que demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos (Tabela 11), indicando exatidão equivalente.

Tabela 11 - Análise comparativa entre o método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com iodo 0,01M e o método cromatográfico (CLAE) descrito por Taormina et al (1992).

	UV (n=6)	CLAE (n=3)
Média (%)	99,65	98,21
Desvio Padrão	0,16	0,52
Variância	0,026	0,270
ANOVA	13,55 (21,20)*	

*Valor entre parênteses corresponde ao valor crítico de F para $p < 0,01$

A avaliação da robustez do método indicou que o método não permite alterações nos parâmetros propostos. Alterações no volume de solução de iodo 0,01M ou na concentração da solução de iodo, acarretaram alterações significativas nos resultados. Demonstrou-se, no entanto, que as soluções, após a reação de complexação, são estáveis por um período de 5 horas.

O método espectrofotométrico por complexo de transferência de carga com iodo 0,01M apresentou linearidade, precisão, exatidão, não apresentando interferência dos excipientes, podendo ser utilizado para quantificação de tacrolimus em cápsulas. É um método que requer, no entanto, um controle cuidadoso das condições analíticas, para produzir resultados seguros e confiáveis.

4.8 Comparação dos métodos propostos

Neste estudo, foram desenvolvidos e validados dois métodos: a espectrofotometria na região do ultravioleta, após reação com ácido sulfúrico concentrado, e a espectrofotometria por reação de complexo de transferência de carga com iodo, tendo sido realizada comparação estatística com método por CLAE descrito na literatura (TAORMINA et al, 1992).

Vários requisitos devem ser considerados na escolha de um método analítico de quantificação de uma substância ativa. Além dos parâmetros de validação, tais como especificidade, linearidade, precisão e exatidão, deve-se levar em conta, também, a simplicidade de execução, tempo de análise, geração de resíduos e os custos dos equipamentos necessários para o seu desenvolvimento.

Conforme mencionado, o tacrolimus tem sido quantificado em produtos farmacêuticos através da CLAE. Os métodos descritos empregam, em sua maioria, coluna de fase reversa C18 e fases móveis relativamente simples, constituídas de acetonitrila e ácido fosfórico ou metanol e ácido fosfórico e detecção no ultravioleta, empregado comprimentos de onda em torno de 210 nm. Em alguns métodos há a necessidade de aquecimento da coluna, em temperaturas variando de 60 a 90°C. O tempo de retenção do fármaco varia de 4 a 10 minutos, o que pode tornar o processo de análise demorado.

Os métodos espectrofotométricos constituem-se, assim, em alternativas aos métodos por CLAE descritos na literatura. Em termos de custo e facilidade de execução pode-se indicar que os métodos espectrofotométricos são mais simples que a CLAE, e não necessitam de equipamentos e reagentes de maior custo, o que pode torná-los acessíveis para alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos. Apresentam a desvantagem de não ser específicos para análise de fármacos estruturalmente semelhantes.

Dentre os métodos espectrofotométricos propostos, o método que utiliza ácido sulfúrico como reagente requer maior treinamento por parte de analista, já que se utiliza, embora em pequeno volume, ácido concentrado. O método de complexo de transferência de carga com iodo, além de utilizar reagentes menos perigosos, apresentou melhor sensibilidade, demonstrada pela menor concentração necessária para a realização da análise.

Em relação aos parâmetros de validação, verificou-se que os métodos propostos apresentaram resultados satisfatórios em relação aos parâmetros avaliados.

Quanto à especificidade observou-se que as amostras simuladas de excipientes não apresentaram interferência no comprimento de onda de quantificação, para ambos os métodos.

Os dois métodos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,999 conforme preconizado pela literatura (BRASIL, 2003), indicando haver uma relação linear entre concentração e variáveis estudadas, comprovando a linearidade. Como já indicado, verificou-se que a faixa de concentração foi menor para o método com iodo (5,0 – 10,0 µg/mL), indicando a melhor sensibilidade do mesmo, quando comparado ao método com ácido sulfúrico (30,0 – 55,0 µg/mL).

A precisão de ambos os métodos foi satisfatória, com CV% inferiores a 0,5%. Conforme Resolução 899 da Anvisa (BRASIL, 2003), o valor máximo aceitável do CV% deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do fármaco na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo, no entanto, valores superiores a 5%.

A exatidão foi demonstrada através da comparação com o método por CLAE. Os métodos espectrofotométricos demonstraram menores desvios, quando comparados ao método por CLAE.

Os limites de detecção e quantificação são parâmetros de validação que indicam a sensibilidade de um método. Estes parâmetros não necessitam ser avaliados quando o método for aplicado para fins de determinação quantitativa. Por esse motivo, os mesmos não foram apresentados no presente trabalho.

Com o objetivo de avaliar se havia diferença significativa entre os teores obtidos pelos métodos propostos e o método por CLAE, realizou-se análise comparativa através de ANOVA, a qual indica se a diferença é significativa ou se pode ser atribuída ao acaso. Os valores obtidos com os diferentes métodos estão apresentados na Tabela 12, e a avaliação estatística realizada encontra-se na Tabela 13. Como pode ser verificado, não houve diferença significativa entre os teores obtidos pelos três métodos, para um nível de significância de $P < 0,01$, indicando que os métodos foram equivalentes.

Tabela 12 – Resultados obtidos para a determinação de tacrolimus através dos diferentes métodos.

Amostra	Métodos		
	Reação com ácido sulfúrico concentrado	Complexo de transferência de carga com iodo	CLAE
1	99,52	99,8	99,34
2	99,50	99,8	99,30
3	99,29	99,5	99,12
4		99,5	
5		99,5	
6		99,8	

Tabela 13 - Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de tacrolimus nas amostras de cápsulas, obtidos pelos métodos espectrofotométricos desenvolvidos e validados, e o método por CLAE, utilizado como referência.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F	P(1%)
Entre métodos	2	0,3295	0,1647	7,61	8,02
Resíduo	9	0,1949	0,0217		
Total	11	0,5244			

Os métodos apresentaram robustez relativa, já que as condições experimentais propostas, tais como volume de reagentes, tempo de análise e concentrações, devem ser controladas.

5 CAPÍTULO III - ESTUDO PRELIMINAR DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE TACROLIMUS

As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral são amplamente prescritas na prática médica e a eficácia do fármaco a partir dessas formulações depende, dentre outros fatores, da desagregação, da solubilização e da absorção do fármaco (MARCOLONGO, 2003; PITA ET AL., 2004). O processo de absorção é, no entanto, complexo e variável, tendo em vista que tanto fatores relacionados ao fármaco e formulação (como solubilidade, natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, tamanho de partículas, entre outros) quanto relacionados ao paciente (fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo, pH do trato gastrointestinal) podem afetar esse processo (LEHIR, 1995; STORPIRTIS et al., 1999; DOKOUMETZIDS & MACHERAS, 2006). A dissolução do fármaco nos líquidos do trato gastrointestinal é uma das etapas limitantes para que formas farmacêuticas sólidas e sólidas dispersos/suspensos em líquidos sejam capazes de transpor membranas biológicas e exercer seus efeitos clínicos (LEHIR, 1995; STORPIRTIS et al., 1999; DOKOUMETZIDS & MACHERAS, 2006).

Os testes de dissolução *in vitro* constituem-se em instrumentos essenciais para avaliar a liberação do fármaco tanto em formas farmacêuticas sólidas como em adesivos transdérmicos e suspensões. São rotineiramente utilizados em controle de qualidade (CQ) e em pesquisa e desenvolvimento (P&D). O foco do teste de dissolução no CQ é a verificação da consistência lote-a-lote e a detecção de desvios da produção. Na P&D o objetivo é permitir a estimativa da liberação do fármaco relacionado à sua performance *in vivo*. Os testes *in vitro* não substituem a necessidade de trabalho clínico, mas podem localizar com precisão, durante o desenvolvimento da formulação, os fatores determinantes da liberação do fármaco (AZARMI et al, 2007).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, depois de determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988; USP 29, 2006).

A Farmacopeia Brasileira (1988) e outras farmacopéias, como Americana e Britânica, preconizam dois aparelhos para avaliar a dissolução de comprimidos e

cápsulas: um com dispositivo de agitação na forma de pá e outro com dispositivo na forma de cesta, que são comumente utilizados para comprimidos e cápsulas, respectivamente.

Basicamente os equipamentos são constituídos de:

- a) cuba cilíndrica de vidro ou de outro material transparente, não reagente, com fundo arredondado, com uma cobertura que evite a evaporação do meio mas que permita a passagem da haste, do termômetro e coleta de amostras. Existem equipamentos com 1 a 24 cubas;
- b) um agitador constituído por uma haste de aço inox ou coberta por algum material não reativo, com rotação uniforme, sem oscilações apreciáveis. A parte superior da haste liga-se a um motor munido de regulador da velocidade;
- c) cesta cilíndrica ou pá de aço inox, fixadas na parte inferior do agitador;
- d) banho termostatizado que permite manter a temperatura do líquido de dissolução a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo o ensaio.

As farmacopéias americana, britânica e japonesa denominam o aparato na forma de cesta como aparato 1 e o na forma de pá de aparato 2.

Os equipamentos devem ser calibrados anualmente em relação aos parâmetros mecânicos, rotação das hastes, temperatura, nível, perpendicularidade, balanço, profundidade e vibração. Deve-se realizar, também, calibração com comprimidos desintegrante (prednisona) e não desintegrante (ácido salicílico). Outros equipamentos descritos pela farmacopéia americana (USP 29,2006) são:

- cilindros recíprocos (aparato 3), baseado no aparelho de desintegração no qual a forma farmacêutica fica suspensa em um tubo que se move através do meio;
- célula de fluxo (aparato 4), que consiste em um sistema no qual o meio de dissolução é impulsionado para cima, passando pela forma farmacêutica presa na célula;
- pá sobre disco (aparato 5): destinado às formas transdérmicas de liberação de fármacos (adesivos transdérmicos);
- cilindro rotatório (aparato 6) também utilizado para sistemas transdérmicos;
- suportes recíprocos (aparato 7): utiliza sistema similar ao dos cilindros recíprocos com modificações para colocação do sistema transdérmico.

Diversos fatores podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução fazendo com que sua análise seja complexa (STORPIRTIS et al., 1999; MANADAS et al., 2002; MARCOLONGO, 2003). Dentre esses fatores citam-se:

a) *relacionados com fármaco e formulação:*

- solubilidade: representa a concentração do fármaco dissolvido em equilíbrio com o soluto, e é o fator mais relevante sobre a velocidade de dissolução;
- tamanho de partícula: a velocidade de dissolução é diretamente proporcional à área superficial exposta ao solvente, ou seja, quanto menor o tamanho das partículas, mais rapidamente o fármaco dissolverá;
- natureza do fármaco: para um mesmo fármaco, as formas amorfas dissolvem mais rapidamente em relação às cristalinas; assim como as substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas. Em relação aos polimorfos, os de maior energia livre, termodinamicamente mais instáveis, são os mais solúveis;
- excipientes: praticamente todos os excipientes exercem alguma influência, aumentando ou diminuindo o processo de dissolução. Dentre as principais classes de excipientes destacam-se: lubrificantes, tensoativos, desintegrantes e lubrificantes;
- tecnologia de fabricação: fatores como o tipo de processo, tempo e velocidade de agitação, tipo de granulação (seca ou úmida), temperatura de secagem e força de compressão podem influenciar a dissolução.

b) *relacionados com o equipamento:* o aparato utilizado, a geometria do sistema, a velocidade do sistema, a vibração do sistema, a posição da haste, a posição e método de amostragem e o dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam, são fatores que podem afetar a taxa de dissolução dos fármacos. A utilização de condições adequadas e equipamentos calibrados minimizam ou eliminam esses problemas.

c) *relacionados com o meio de dissolução:*

- volume: depende da solubilidade do fármaco, sendo que para a maioria dos fármacos utiliza-se 900 mL. A concentração do fármaco não deve exceder 10 – 15% da sua solubilidade máxima no meio selecionado;

- presença de ar/gases: podem afetar o pH e impedir o fluxo adequado do meio de dissolução, provocar mudanças no movimento das partículas e diminuir o contato entre o líquido e o sólido. Pode ser desaerado por aquecimento a 45°C seguido por filtração à vácuo, por sonificação a 37°C, entre outros processos;
- presença de bolhas de ar: essas podem aparecer quando se utiliza o aparato cesta ou ao redor da forma farmacêutica, prejudicando a dissolução;
- pH: depende do tipo de liberação, do sítio de liberação do fármaco e estabilidade do fármaco, e a correta escolha do pH deve ser considerada. É permitida uma variação de 0,05 unidades em relação ao especificado no teste de dissolução estabelecido.
- temperatura: utiliza-se 37°C, sendo permitida variação de no máximo 0,5°C
- viscosidade: quando maior a viscosidade do meio, mais lenta é a dissolução;
- força iônica/pressão osmótica: o aumento nos valores de força iônica ou pressão osmótica favorecem a dissolução;
- tensoativos: favorecem a dissolução e podem ser utilizados quando se deseja aproximar o teste *in vitro* da situação *in vivo*.

d) *relacionados com o meio ambiente*: as condições de estocagem do produto podem afetar a dissolução, sendo a umidade um dos principais fatores que afetam a dissolução dos produtos estocados.

e) *relacionadas com o método analítico*: Normalmente utiliza-se a espectrofotometria na região do ultravioleta, empregada se o fármaco tiver um cromóforo e não for observada interferência dos excipientes e/ou invólucros das cápsulas, ou a cromatografia líquida de alta eficiência, desde que também não sejam observadas interferências. A espectrometria de massas e os métodos potenciométricos podem também ser utilizados (WANG et al., 2006).

Muitos fármacos, como é o caso do tacrolimus, não possuem monografia oficial, sendo necessário desenvolver as condições do ensaio para aplicação na avaliação da qualidade dos produtos contendo o fármaco, na avaliação da intercambialidade entre formulações e no desenvolvimento/otimização de novas formulações (MANADAS et al., 2002).

Segundo Marques & Brown (2002), vários são os desafios no desenvolvimento e validação de um método de dissolução, devido à variabilidade intrínseca desse e devido à variabilidade de fatores que podem afetar o processo de dissolução, como já mencionado. O conhecimento dos fatores que afetam a dissolução favorece, no entanto, a obtenção de resultados reprodutíveis, permitindo o seu controle. Esse controle é necessário para reduzir a variabilidade teste-a-teste, para garantir a sua confiabilidade e reprodutibilidade, e para garantir que pequenas alterações na formulação ou no processo de produção sejam detectadas (MANADAS et al., 2002; MARQUES & BROWN, 2002; FORTUNATO, 2005).

O desenvolvimento do teste de dissolução requer que informações sobre o fármaco, como pKa, solubilidade e estabilidade (em diferentes condições de pH, de temperatura, umidade e luz), bem como informações sobre a faixa de dosagem, forma farmacêutica e excipientes, sejam previamente conhecidas, para estabelecer os meio de dissolução, o volume do meio, os aparatos e as rotações que serão testadas (FDA, 1997; MARQUES & BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2002; FORTUNATO, 2005). Segundo Fortunato (2005) é necessário definir, antes de iniciar o desenvolvimento propriamente dito do teste, o método de quantificação que será utilizado, o processo de filtração do meio e a estabilidade do fármaco nos meios que serão avaliados.

O tacrolimus exibe baixa biodisponibilidade oral e uma ampla faixa de variabilidade na absorção, variando de 4 a 89%, no rim e fígado transplantados. Algumas das razões para isso são a baixa solubilidade aquosa do tacrolimus e o seu metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado (ARIMA et al., 2001).

Com o intuito de aumentar a biodisponibilidade oral e reduzir a variabilidade na absorção do tacrolimus Honbo et al. (1987) realizaram estudos de solubilidade, estabilidade (a 40°C e sob luz fluorescente), análise térmica, dissolução *in vitro* e absorção oral em animais, de três diferentes formas de uso oral, com diferentes formulações, incluindo soluções aquosas (solução e solução micelar); soluções não aquosas (elixir, óleo/etanol e gel oleoso) e formas sólidas (dispersão sólida, dispersão sólida oleosa e cristais micronizados). Para avaliar a liberação do fármaco foi realizado perfil dissolvendo 10 mg do fármaco em 900 mL solução contendo 2,0 g de NaCl e 7,0 mL de HCl por litro, pH 1,2, mantida a 37°C±0,5°C e utilizando o aparato pá. As coletas foram realizadas após 0,25; 0,5; 1, 2 e 4 horas. O tacrolimus foi extraído das soluções com benzeno e seco sob atmosfera de nitrogênio. O

resíduo foi reconstituído em etanol e a concentração do fármaco foi determinada por CLAE, empregando as seguintes condições: coluna contendo grupos glicerila ligados à sílica (TSK gel OH-120); fase móvel constituída de etanol: hexano (1:4), vazão: 1mL/min; detecção no UV (230 nm). As análises foram realizadas à temperatura ambiente e o tempo de retenção foi de 6,5min. A formulação contendo dispersão sólida foi a que apresentou melhores resultados, pois nessa formulação, segundo os autores, o fármaco encontrava-se no estado amorfo, que tornou o fármaco termodinamicamente mais ativo que sua forma cristalina, aumentando sua velocidade de dissolução no trato gastrointestinal.

Estudo avaliando a formação de complexo do tacrolimus com ciclodextrinas e os efeitos da incorporação da ciclodextrina na solubilidade e biodisponibilidade oral do tacrolimus em ratos foi realizado por Arima et al (2001). Estudos de solubilidade, espectroscópicos, de dissolução, de absorção *in vivo*, ensaios imunoenzimáticos e parâmetros farmacocinéticos foram realizados, comparando os resultados com o produto comercial Prograf[®], na forma de dispersão sólida contido em cápsula gelatinosa dura. A velocidade de dissolução foi avaliada através da dispersão de quantidades de amostra pulverizada contendo o equivalente a 5 mg de tacrolimus, adicionadas a 25 mL solução contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio e 23.6 mM de NaOH, pH 6,8, sob agitação de 100 rpm, a 37°C. A intervalos apropriados foram realizadas coletas de 0,5 mL do meio, e a concentração do fármaco foi determinada por CLAE utilizando as seguintes condições: coluna ODS-80TM; fase móvel constituída de acetonitrila:água (3:1, v/v), vazão: 1mL/min; detecção no UV (214 nm). As análises foram realizadas à 60 °C. Os resultados obtidos indicaram que a complexação do fármaco com β -ciclodextrinas aumentou a velocidade de dissolução do tacrolimus, devido ao aumento da solubilidade aquosa do fármaco.

Com base no exposto, planejou-se desenvolver e validar condições de dissolução para aplicação em controle de qualidade do tacrolimus em cápsulas, já que os estudos descritos até o momento objetivavam a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações para o fármaco.

5.1 Solventes e reagentes

- Acetonitrila, Tedia[®]
- Ácido clorídrico fumegante, Tedia[®]
- Ácido orto-fosfórico 85%, Merck[®]
- Água destilada
- Água purificada
- Fosfato de potássio monobásico, Tedia[®]
- Hidróxido de sódio 1N, Merck[®]
- Trietilamina, Merck[®]
- Acetato de sódio trihidratado[®]

5.2 Equipamentos e acessórios

- Aparelho para teste de dissolução, Pharma Test[®]
- Balança analítica, Sartorius[®]
- Banho de ultra-som, Thornton[®]
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18 hypersil (25cm x 4mm d.i) 5 µm, Phenomenex[®]
- Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 AD_{vp}, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP 5.0[®]
- Destilador, Biomatic[®]
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, Sartorius[®]
- Membrana filtrante de acetato de celulose, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Sartorius[®]
- Filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell[®]
- Kit para filtração, Millipore[®]
- Pipetador Transferpette, Brand[®]
- Potenciômetro, Fieldlab Schott[®]
- Termômetro de imersão, Incoterm[®]

5.3 Estudos preliminares

Para avaliar a liberação do tacrolimus das cápsulas, diversas condições de dissolução foram testadas, variando-se o meio utilizado e a velocidade de rotação, conforme indicado na Tabela 14.

Os testes foram realizados em equipamento de dissolução Pharma Test, equipado com seis cubas. Nessa etapa preliminar, realizou-se o perfil de dissolução com três cubas, contendo cada uma 500 mL de meio, em temperatura de $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Estudos com o aparato pá demonstraram que as cápsulas flutuavam nos meios, e os estudos foram conduzidos utilizando apenas o aparato cesta.

Os meios de dissolução foram preparados e desaerados utilizando procedimento descrito na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006).

Tabela 14 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de cápsulas contendo 1 mg de tacrolimus, empregando aparato cesta.

Meio (500 mL)	Velocidade (rpm)
Tampão fosfato de sódio, pH 6,8	75
Tampão fosfato de sódio pH 6,8	100
Tampão acetato de sódio pH 5,5	75
HCl 0,1N	75

As coletas de 5 mL de meio foram realizadas manualmente, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos, com a reposição do mesmo volume de meio a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

A percentagem de tacrolimus dissolvida em cada condição foi determinada, sem posterior diluição, empregando método por CLAE descrito por Taormina et al (1992), após filtração das amostras através de filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose com poro de $0,45 \mu\text{m}$. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 2 do Capítulo II.

O teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e as devidas correções referentes às retiradas de fármaco e reposições de meio em cada tempo foram considerados nos cálculos da percentagem dissolvida.

A percentagem cumulativa do fármaco foi plotado *versus* o tempo, para obtenção de liberação *in vitro*.

Após a escolha do meio, foram preparadas curvas de calibração, para demonstrar a linearidade do método.

5.4 Resultados e discussão

Como já mencionado, os estudos de dissolução são indispensáveis nas etapas de desenvolvimento das formulações, na identificação de variáveis críticas, na produção e no controle de qualidade (MANADAS, 2002; AZARMI et al., 2007).

Em muitos casos é necessário desenvolver diferentes protocolos de dissolução para atender os objetivos dessas diferentes etapas. Para fins de controle de qualidade, um método discriminativo pode ser adequado para detectar pequenas mudanças na formulação ou no processo de produção (FORTUNATO et al., 2005), mas pode não ser desejável para prever a performance *in vitro* do fármaco. Nesse caso, o teste deve ser sensível e confiável e requer que os comportamentos *in vitro* e *in vivo* da forma de dosagem sejam similares ou tenham uma relação um com o outro (AZARMI et al., 2007). Essas diferenças no protocolo de CQ e P&D trazem o seguinte questionamento: qual seria o meio mais apropriado para o propósito pretendido?

Os meios de dissolução listados nas farmacopéias, como a brasileira e americana, são ácido clorídrico (0,01 a 0,1N); soluções tampões, como acetato e fosfato, na faixa de pH fisiológico (1,2 a 7,5); fluido gástrico simulado (com ou sem enzimas); água (embora algumas condições como pH e tensão superficial possam variar conforme sua procedência, não sendo recomendada por alguns autores) e soluções com tensoativos, como polissorbato 80 e laurilsulfato de sódio. Esses meios apenas simulam o efeito do pH e da osmolaridade na liberação do fármaco ou, no caso do uso de tensoativos, aumentam a solubilidade dos fármacos em meios aquosos. Tais meios são bem caracterizados e facilmente reprodutíveis, e são rotineiramente utilizados em protocolos de CQ. Entretanto, meios fisiologicamente mais adaptados são necessários se o teste de dissolução for utilizado como ferramenta preditiva da biodisponibilidade e meios de dissolução biorrelevantes devem ser utilizados e têm sido indicados na literatura (AZARMI et al., 2007).

A avaliação do perfil de dissolução em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 a 7,5) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução (ADAMS et al., 2001; MOORE & FLANNER, 1996; FDA, 1997). A escolha dos meios HCl 0,1 N e tampão fosfato pH 6,8 foi baseada nos trabalhos de Honbo et al, (1987) e Arima et al (2001), respectivamente. Optou-se por realizar o teste com outro tampão, com pH intermediário aos anteriores.

O volume de meio de dissolução pode variar de 500 até 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado (MARQUES & BROWN, 2002). Devido à baixa concentração do tacrolimus nas cápsulas (1 mg/unidade) utilizou-se o volume de 500 mL para evitar que o fármaco ficasse muito diluído, principalmente considerando os primeiros minutos de um perfil de dissolução.

As concentrações de tacrolimus nos diferentes tempos foram avaliadas pelo método de CLAE descrito por Taormina et al (1992) e utilizado na análise comparativa dos métodos propostos apresentadas no Capítulo II. Outras condições cromatográficas foram avaliadas antes de optar-se pelo referido método, na tentativa de eliminar a necessidade de temperatura na faixa de 60 a 70°C, e melhorar a simetria e detectabilidade do pico, tendo em vista que nos testes dissolução realizados a concentração máxima do fármaco seria de 2 µg/mL. Dentre as diversas condições testadas, verificou-se que o método proposto por Taormina et al (1992) foi o que apresentou melhores resultados. Tentou-se, igualmente, utilizar os métodos espectrofotométricos previamente desenvolvidos e validados, que não se mostraram adequados basicamente pelos seguintes motivos: baixa concentração do fármaco nos meios de dissolução, inviabilizando diluição posterior em acetonitrila (solvente utilizado nos métodos propostos antes das respectivas reações) e interferência dos meios de dissolução nas reações.

Os resultados dos estudos de dissolução realizados em diferentes meios e os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições testadas encontram-se, respectivamente, na Tabela 15 e na Figura 11.

Tabela 15 – Porcentagens de tacrolimus dissolvido nas diferentes condições testadas.

Tempo (min)	Tampão fosfato pH 6,8		Tampão acetato pH 5,5	HCl 0,1N
	75 rpm	100 rpm	75 rpm	75rpm
5	4,3	8,5	1,3	36,7
10	12,3	17,8	10,6	39,7
15	24,7	30,3	25,8	40,6
20	33,0	37,8	35,7	41,5
30	48,6	55,9	48,2	44,1
45	70,1	65,6	70,7	50,8
60	86,5	77,8	84,9	57,5

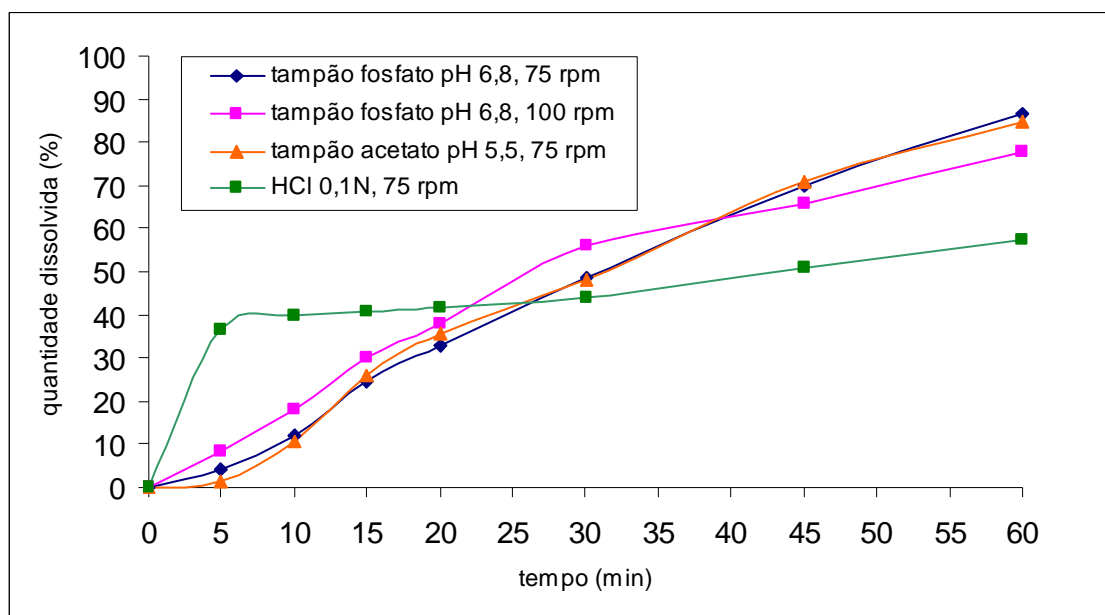


Figura 11 - Perfis obtidos para a dissolução de tacrolimus em cápsulas de 1 mg (n=3), em diferentes meios, mantidos a $37,0 \pm 0,5$ °C, utilizando aparato cesta em diferentes rotações.

Como pode ser observado na Figura 11, em 30 minutos apenas 50% do fármaco foi liberado nas diferentes condições empregadas. As % dissolvidas foram semelhantes tanto em tampão fosfato quanto em tampão acetato, atingindo em torno de 80% em 60 minutos. Em ácido clorídrico 0,1N, entretanto, a liberação máxima foi

de 60 %. Em tampão fosfato pH 6,8 a liberação do fármaco foi semelhante nas duas rotações avaliadas (75 e 100 rpm).

Com base nesses resultados, novos perfis foram realizados com seis unidades de cápsulas, para avaliar a precisão do método, utilizando apenas tampão fosfato pH 6,8, na rotação de 75 rpm, nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. Os resultados desse estudo estão apresentados na Tabela 16 e na Figura 12.

Tabela 16 – Valores médio das porcentagens dissolvidas de tacrolimus e coeficientes de variação percentual (CV%), utilizando tampão fosfato pH 6,8, aparato cesta, 100 rpm.

Tempo (min)	% Dissolvida	CV%
5	40,08	26,1
10	40,07	12,3
15	53,38	18,5
30	70,60	10,1
60	85,22	13,2

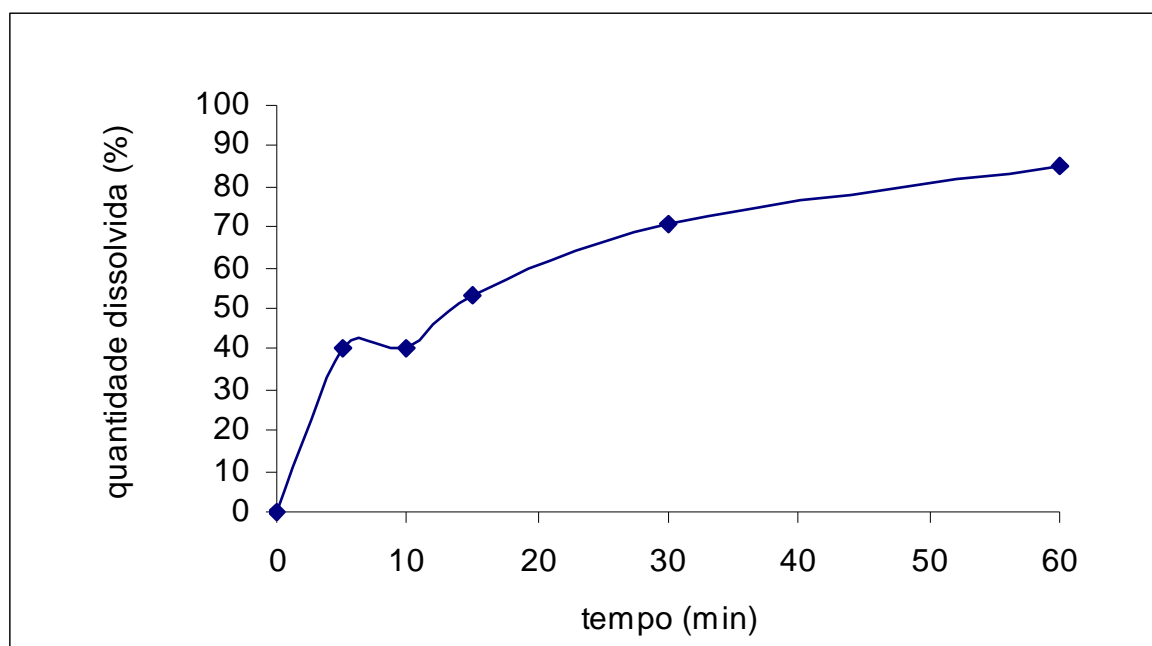


Figura 12 – Perfil de dissolução obtido para a dissolução de cápsulas de 1 mg de tacrolimus, utilizando seis cubas, 500 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio, aparato cesta e rotação de 75 rpm.

Como pode se observar, os resultados obtidos com cinco tempos de coleta foram significativamente diferentes daqueles encontrados na avaliação realizada com o mesmo meio de dissolução, mas com sete pontos de coleta (Tabela 14, Figura 11). A precisão entre as cubas ficou dentro dos valores aceitáveis, exceto em 5 minutos, que apresentou valores superiores a 20%.

A linearidade do método foi avaliada na faixa de concentração de 0,25 a 2,0 µg/mL, diluindo-se as amostras em tampão fosfato pH 6,8. A curva de calibração está apresentada na Figura 13.

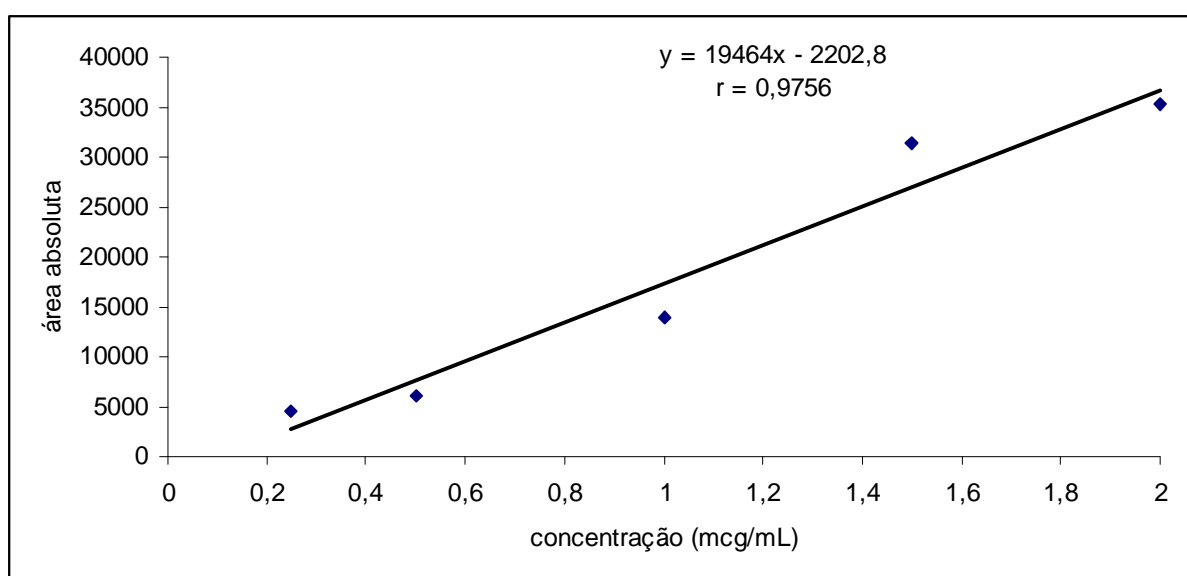


Figura 13 - Representação gráfica da curva de calibração do tacrolimus, obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, diluindo as amostras em tampão fosfato pH 6,8.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstram que a correlação entre as absorvâncias e as concentrações não foi adequada no intervalo de concentração utilizado, com coeficiente de correlação inferior a 0,999.

Diversos fatores podem ter contribuído para os resultados obtidos, tais como: fármaco com baixa solubilidade aquosa, baixa concentração do fármaco nas cápsulas, baixa absorvidade molar do tacrolimus e utilização de método com baixa sensibilidade (alta variabilidade a baixas concentrações). Dentre esses fatores acredita-se que o método de quantificação deva ser o primeiro fator a ser avaliado. Outras condições cromatográficas ou outro método de detecção mais sensível poderiam ser igualmente testados. O alto custo de aquisição do medicamento limitou, no entanto, a continuidade dos estudos, já que as amostras disponíveis no momento são insuficientes. Pretende-se, entretanto, dar prosseguimento a esses

estudos e estabelecer as condições adequadas para avaliar a dissolução de tacrolimus em cápsulas, assim que novas amostras forem adquiridas.

6 CONCLUSÕES

- As análises espectroscópicas (RMN¹H, RMN¹³C e IV) e as determinações da faixa de fusão e análises térmicas permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo.
- O método por espectrofotometria na região do ultravioleta, utilizando ácido sulfúrico concentrado (98%) como reagente e acetonitrila como solvente, apresentou máximo de absorção em 295 nm, e mostrou-se linear, sensível, específico, preciso e exato para análise quantitativa de tacrolimus em cápsulas.
- O método por espectrofotometria de complexação, utilizando Iodo 0,01M como reagente e acetonitrila como solvente, apresentou máximo de absorção em 365 nm, e mostrou-se linear, específico, preciso e exato para análise quantitativa de tacrolimus em cápsulas.
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de tacrolimus, com aqueles obtidos por CLAE, empregando método de Taormina et al., 1992, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo caracterizada a equivalência entre os métodos.
- Os estudos realizados não permitiram o estabelecimento das condições adequadas para avaliar a dissolução *in vitro* do tacrolimus em cápsulas, sendo necessário realizar novas avaliações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L. Application of linear mixed models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmacy**, Amsterdam, v. 226, p. 107-125, 2001.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M; TALEBNIA, J. The Development and Validation of Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Form. **Dissolution Technologies**, p.16 – 24, 2004.

ARIMA, H.; YUNOMAE, K.; MIYAKE, K.; IRIE, T.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, KANETO. Comparative studies of the enhancing effects of cyclodextrins on the solubility and oral bioavailability of tacrolimus in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90 p. 690 – 701, 2001.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, p.12-21, 2007.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002 .

BARROS, E.J.; BOIM, M.A.; AJZEN, H.; RAMOS, O.L.; SCHOR, N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Institute**, v. 32, n.1, p.19-25, 1987.

BEBAWY, L. I.; KOUSY, N.; SUDDIK, J. K.; MOHAMED, S. Spectrophotometric determination of fluoxetine and sertraline using chloranil, 2, 3 dichloro-5,6 dicyano benzoquinone and iodine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p.133 -142, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003a. Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

CARDOSO, S. G.; IEGGLI, C. V. S.; POMBLUM, S. C. G. Spectrophotometric determination of carvediol in pharmaceutical formulations through charge-transfer and ion-pair complexation reactions. **Pharmazie**, v. 62, p.1, 2007.

CHANG, QIN. HAN. Et al. Establishment of a fast chemical identification system for screening of counterfeit drugs of macrolide antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.1, p.68-74, 2006.

DALE, F. MIERKE, PETER SCHMIEDER, PETER KARUSO.; HORST KESSLER. Conformational Analysis of the cis-and-trans-Isomers of FK506 by NMR and Molecular Dynamics. **Helvetica Chimica Acta**, v.74 p. 1027-1046, 1991.

DANIELSON, N. D.; HOLEMAN, J. A.; BRISTOL, D. C.; KIRZNER, D. H. Simple methods for the qualitative identification and quantitative determination of macrolide

antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.2, n. 2, p. 121-130, 1993.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whytney to the Biopharmaceutical Classification System. **International Journal of Pharmaceutics**, v.321 p.1-11, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^aed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FDA, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, US Department of Health and Human Services (CDER), August, 1997.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, p.12-14, 2005.

GARCIA, S.C.; LOPES, L.S.; SCHOTT, K.L.; BECK, S.T.; POMBLUM, V.J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.6, p. 393-401, dez., 2004.

GIL, E.S; ORLANDO, R.M.; MATIAS, R.; SERRANO, S.H.P. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos, Campo Grande: Editora UNIDERP, 348p., 2005.

GOTO, T.; KINO, T.; HATANAKA, H., et al. FK506, historical perspectives. **Transplantation Proceedings**, v.23, n.6, p.2713-2717, 1991.

HAN, J.; BEETON, A.; LONG, P. F.; WONG, I.; TULEU, C. Physical and microbiological stability of an extemporaneous tacrolimus suspension for pediatric use. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, n.2, p.167-172, 2006.

HONBO, T.; KOBAYASHI M.; K. Hane, T. Hata, and Y. Ueda, the oral dosage form of FK-506. **Transplantation Proceedings**, vol XIX, n. 5, v. 6,p.17-22, 1987.

HOOKS, M. A. Tacrolimus, a new immunosuppressant – a review of the literature. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 28, p. 501-511, 1994.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2 (R1): Text and Methodology, 2005.

JACOBSON, P.A.; JOHNSON, C.E.; WEST, N.J.; FOSTER, J.A. Stability of tacrolimus in an extemporaneously compounded oral liquid. **American Journal of Health-System Pharmacists**, v.54, n.15, p.178-80, 1997.

JOHNSON, C.E., TRUONG, N. M. Stability and compatibility of tacrolimus and fluconazole in 0,9% sodium. **Journal of American Pharmacists Association (Washington)**, v.39, n. 4, p.505-508, 1996.

JUREWICZ, W.A. Tacrolimus versus cyclosporin immunosuppression: long-term outcome in renal transplantation. **Nephrol Dial Transplant**, v.18, suppl.1, p.07-11, 2003.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23 n.2, 2000.

KEBEDE, Z.; LINDQUIST, S.E. Donor-acceptor interaction between non-aqueous solvents and I₂ to general I₃, and its implication in dye sensitized solar cells. **Solar Energy Materials & Solar Cells**, V. 57, p. 259-275, 1998.

KHAN K. A., RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, London, v.27, p. 48-. 49, 1975.

KINO, T.; HATANAKA, H.; MIYATA, S.; INAMURA, N.; NISHIYAMA, M.; YAJIMA, T.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H. FK506 a novel immunosupplement isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physicochemical and biological characteristics. **Journal of Antibiotics**, v.40, n.9, p.1249-1255, 1987.

KU, Y. M.; MIN, D. I.; KUMAR, V.; NOORMOHAMED, S.A. Stability of tacrolimus injection in total parenteral nutrition solution. **Journal of Pharmacy Technology**, v.12, n.2, p. 58-61, 1996.

LASMAR, E.P.; LASMAR, M.F. Perspectivas atuais e futuras em transplantes de órgãos. Disponível em: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2029/paginas/matéria%2010-29.html>> Acesso em: 14 nov. 2005.

LEHIR, A Farmácia Galênica. Barcelona : Masson, 383 p.,1995.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. **Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analítica**, v. 1, p.48-51, 2002.

MOORE, J. W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technologies**, v.20, n.6, p. 64-74, 1996.

MOSTAFA, A. A., BEBAWY, L. I.; REFAAT, H. H. Spectrophotometric determination of clobetasol propionate, halobetasol propionate, quinagolide hydrochloride, through charge transfer complexation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 889-899, 2002.

MOUSTAFA, A. A. M. Spectrophotometric methods for the determination of lansoprazole and pantoprazole sodium sesquihydrate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, p.45-58, 2000.

MOYANO, M. A.; SIMIONATO, L. D.; PIZZORNO, M. T.; SEGALL, A. I. Validation of a liquid chromatographic method for determination of tacrolimus in pharmaceutical dose forms. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v.89, n.6, p.1547-1551, 2006.

NAMIKI, Y.; FUJIWARA, A.; KIHARA, N.; KODA, S.; HANE, K.; YASUDA, T. Determination of the immunosuppressive drug tacrolimus in its dosage forms by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 40, n.5-6, p. 253-258, 1995.

NGHIEM, P.; PEARSON, G.; LANGLEY, R.G. Tacrolimus and pimecrolimus: from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. **Journal of American Academics of Dermatology**, v.46, p.228-241, 2002.

PEARL, L.G.; MORRIS, R.; AVANISS-AGHAJANI, E.; SORIANO, T.; MERAZ, M.; METZGER, A. Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. **Journal of American Academics of Dermatology**, v.51, n.1, p.52-61, 2004.

Pharmaceutical Pharmacology, v. 28, p. 48-49, 1975.

PITTA, N. O. G.; PRATES, E. C.; FERRAZ, H. G. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004.

PRATSCHKE, J.; NEUHAUS, R.; TULLIUS, S.G.; JONAS, S.; BECHSTEIN, W.O.; NEUHAUS, P. Treatment of Cyclosporine-related adverse effects by conversion to tacrolimus after liver transplantation: long-term results. **Transplantation Proceedings**, v.30, p.1419-1421, 1998.

RIBANI, A.; C.B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C.S.F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S. MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24 n.3,p.383-387, 2005.

SALEH, G. A.; ASKAL, ASKAL, H. F.; RADWAN, M. F.; OMAR, M. A; SALEM, H. Spectrophotometric determination of β -adrenergic blocking agents in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 29, p. 527-538, 2002.

SALEH, G. A.; ASKAL, H. F.; RADWAN, M. F.; OMAR, M. A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins. **Talanta**, v. 54, p. 1205-1215, 2001.

SCOTT, L.J.; MCKEAGE, K.; KEAM, S.J.; PLOSKER, G.L. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. **Drugs**, v.63, n.12, p. 1247-1297, 2003.

SELZNER, N.; DURAND, F.; BERNUAU, J., et al. Conversion from cyclosporine to FK506 in adult liver transplant recipients a combined North American and European experience. **Transplantation**, v.72, n.6, p.1061-1065, 2001.

SHERIF, Z. A.; MOHAMED, A. O.; WALASH, M. I.; TARRAS, F. M. Spectrophotometric determination of loperimide hydrochloride by acid-dye and charge-transfer complexation methods in the presence of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, p.13-23, 2000.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, Tradução Ignez Caracelli et al. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 837 p., 2002.

SPENCER, C.M.; GOA, K.L.; GILLIS, J. Tacrolimus an update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. **Drugs**, v.54, n.6, p.925-975, 1997.

STORPIRTS, S.; OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, V.35, n.1, p.1-11, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TANAKA, H. et al. Physicochemical properties of FK506 a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. **Transplantation Proceedings**, v.14, n.5, suplemento 6, p.11-16, 1987.

TAORMINA, D.; ABDALLAH, H. Y.; VENKATARAMANAM, R.; LOGUE, L.; BURCKART, G.J.; PTACHCINSKI, R.J.; TODO, S.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. Stability and sorption of FK 506 in 5% dextrose injection and 0,9% sodium chloride injection in glass, polyvinyl chloride, and polyolefin containers. Disponível em <<http://www.ajhp.org/cgi/content/abstract/49/1/119.html>> Acesso em: 25 out. 2005.

TAYLOR, A.L.; WATSON, C.J.E.; BRADLEY, J.A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Critical Review of Oncological Hematology**, v.56, p.23-46, 2005.

TAYLOR, P.J.; JONES, A.; BALDERSON, G.A.; LYNCH, S.V.; NORRIS, R.L.; POND, S.M. Sensitive, specific quantitative analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 279-285, 1996.

THE MERCK INDEX, p.1546, 12^a ed., Whitehouse Station, 1996.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 29^a ed., Rockville, United States Convention, 2006.

TRIPODI, v. P.; LUCANGIOLLI, S. E.; BARBARA, C. L.; RODRIGUEZ, V. G.; CARDUCCI, C. N. Analysis of immunosuppressive drugs and their pharmaceuticals by micellar electrokinetic chromatography. **Chromatographia**, v. 54, n. 1-2, p. 93-98, 2001.

UCHIDA, K.; TAKAHASHI, K.; TAKAHARA, S.; OSHIMA, S.; TOMA, H.; SONODA, T. Excellent 3-year results following living-donor kidney transplantation and tacrolimus immunosuppression in Japan. **Transplantation Proceedings**, v.109, p. 1606-1607, 2002.

VENKATARAMANAN, R.; SWAMINATHAN, A.; PRASAD, T.; JAIN, A.; ZUCKERMAN, S.; WARTY, V.; McMICHAEL, J.; LEVER, J.; BURCKART, G.; STARTL, T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. **Clinical Pharmacokinetic**, v.29, p.404-430, 1995.

WANG, Q.; M, DECHENG.; HIGGINS, J.; P. Analytical Method Selection for Drug Product Dissolution Testing. **Dissolution Technologies**, v.13, p.3, 2006.

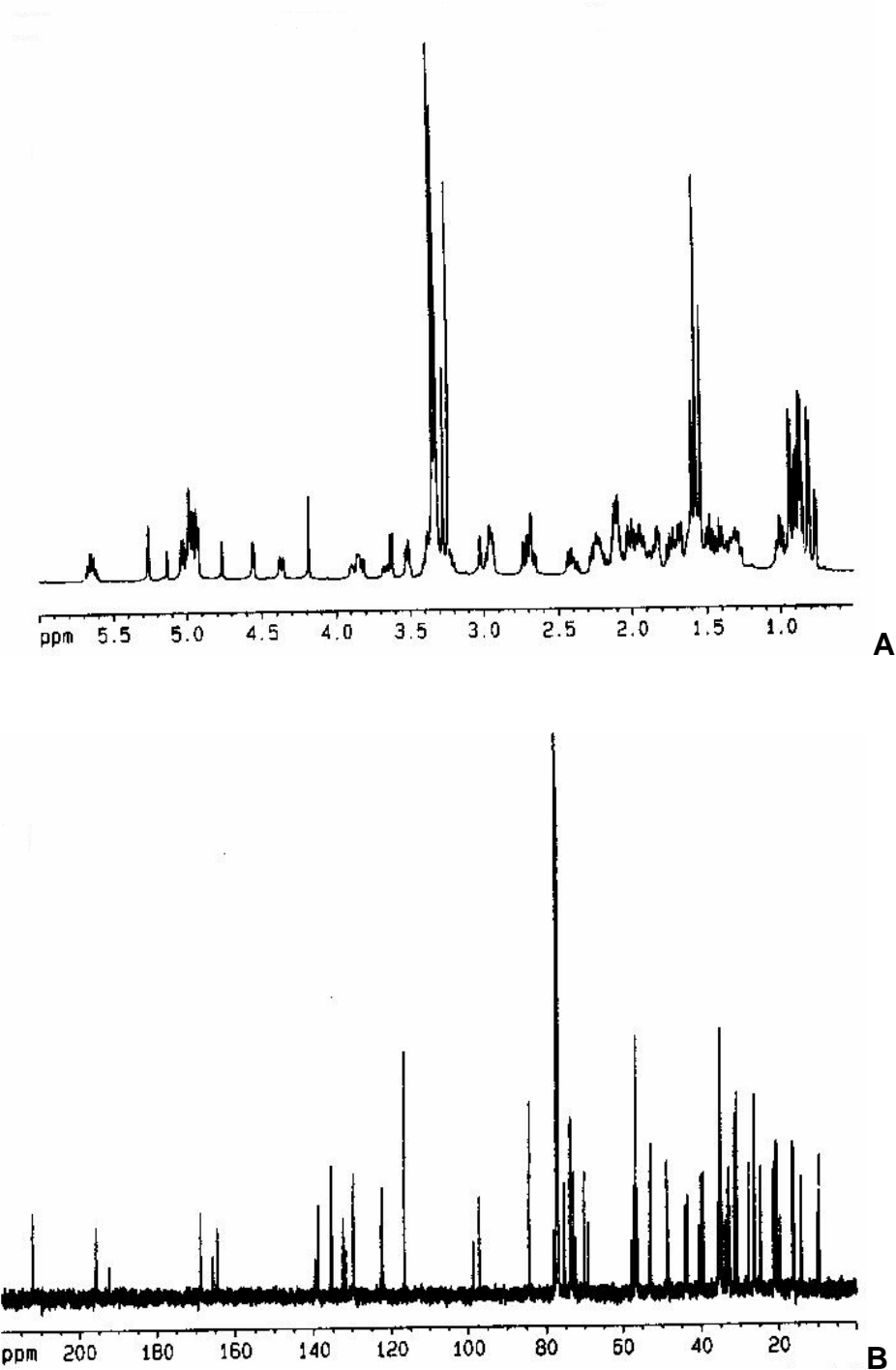
WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis – A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**, Ed. Churchill Livingstone, Glasgow, UK, 1999.

WOODLE, E. S.; THISLETHWAITE, J. R.; GORDON, J. H. et al. A multicenter trial of FK 506 (tacrolimus) therapy in refractory acute renal allograft rejection, **Transplantation**, p. 62-594, 1996.

XU, M. Z.; HU, C. Q. Content determination and content uniformity of tacrolimus ointment by HPLC. **Chinese Journal of Antibiotics**. v. 30, n.12, p. 748-755, 2005.

YAZDANIAN. M.; BRIGGS, K.; JANKOVSKY, C.; HAWI, A. The “high solubility” of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.2, 2004.

8 ANEXOS



Espectros de ressonância magnética nuclear do tacrolimus: (A) RMN ^1H (600 MHz); (B) RMN ^{13}C (150 MHz), obtidos em clorofórmio deuterado (Dale et al, 1991).