

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DO ITRACONAZOL MATÉRIA-
PRIMA E CÁPSULAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcos Roberto dos Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO ITRACONAZOL
MATÉRIA-PRIMA E CÁPSULAS**

por

Marcos Roberto dos Santos

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.**

Orientador: Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**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 METODOLOGIAS
ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO ITRACONAZOL MATÉRIA-
PRIMA E CÁPSULAS**

elaborada por
Marcos Roberto dos Santos

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

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt
(Presidente/Orientador)

Prof^a.Dr^a. Marta Palma Alves (Unifra/Santa Maria)

Prof.Dr. Érico Marlon de Moraes Flores (UFSM/Santa Maria)

Santa Maria, 13 de maio de 2008.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha família, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

A minha noiva Clarissa pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Celso F. Bittencourt, pela confiança, orientação e aprendizado na realização deste trabalho;

A Professora e amiga Luciane Laporta pelo seu auxílio e apoio na realização deste trabalho e pelo seu exemplo profissional;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, principalmente as Professoras Clarice Rolim e Simone Cardoso;

Ao professor Cleber Schmidt, pela amizade e contribuições durante a elaboração deste trabalho;

Aos amigos, Prof^a Marta Palma Alves, Cláudio Herbst, Isabel Roggia, Alexandre Rubim, Júnior e Milene Friedrich pelo auxílio, companheirismo e momentos de descontração durante todas as etapas deste trabalho;

Ao Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) que possibilitou a execução deste trabalho de pesquisa;

À Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, pelo apoio recebido;

A todos que, embora não tenham sido citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO ITRACONAZOL MATÉRIA-PRIMA E CÁPSULAS

AUTOR: Marcos Roberto dos Santos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de Maio de 2008

O itraconazol é um antifúngico triazólico de amplo espectro de ação pertencente à classe dos azóis, indicado no tratamento de diferentes tipos de infecções micóticas sistêmicas e superficiais. Seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de inibição da síntese do ergosterol que é um componente de vital importância para a membrana das células dos fungos.

Este fármaco possui metodologia descrita, somente, para matéria-prima, que se encontram oficializadas nas Farmacopéias Britânica e Européia.

Neste trabalho foram desenvolvidos e validados, em conformidade com guias nacionais e internacionais, métodos analíticos quantitativos que podem ser empregados tanto para matéria-prima quanto para forma farmacêutica de cápsulas contendo itraconazol. Utilizaram-se as metodologias: cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta (UV) em 254 nm, coluna de fase reversa C8, fase móvel acetonitrila : água (65:35), na temperatura de 25 °C; Ensaio microbiológico por difusão em ágar com planejamento 3x3, empregando *Cândida Albicans* ATCC 10231 como microrganismo teste em meio de cultura antibiótico n°19 e Espectrofotometria na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 256 nm , com soluções finais em ácido clorídrico 0,1 mol.l⁻¹ . Todos os métodos apresentaram linearidade, precisão, exatidão, robustez e especificidade adequados.

Palavras-chave: validação; itraconazol; espectrofotometria na região do UV; ensaio microbiológico por difusão em ágar; cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).

ABSTRACT

Master Dissertation

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINING ITRACONAZOLE RAW MATERIALS AND CAPSULES

AUTHOR: Marcos Roberto dos Santos

ADVISER: Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt

LOCAL AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, May 13th, 2008

Itraconazole is a triazole antifungal agent with a broad spectrum of activity belonging to the class of azole, indicated in the treatment of different types of mycotic infections systemic and local. Its mechanism of action is based on the ability to inhibition of synthesis of ergosterol which is a component of vital importance to the cell membrane of the fungi. This drug has only official methodology for raw material, described in British and European Pharmacopeia. In this paper, following the main guidelines for validation, were developed and validated quantitative analytical methods that can be applied both for the raw materials as the finished product containing itraconazole capsules through a high performance liquid chromatography (HPLC) with detection in the ultraviolet (254 nm, C8 reversed-phase column, mobile phase acetonitrile : water (65:35), the temperature of 25 °C) and microbiological assay by agar diffusion, with planning 3x3, employing *Candida Albicans* ATCC 10231 as microorganism testing in the culture medium antibiotic N° 19 in the region of the ultraviolet spectrophotometry (256 nm, with final solutions in 0.1 mol l⁻¹ hydrochloric acid). All methods showed appropriate linearity, precision, accuracy, robustness and specificity.

Keywords: validation; itraconazole; spectrophotometry in the UV; microbiological assay agar diffusion; high performance liquid chromatography (HPLC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica de heterociclos aromáticos azóicos: imidazol (A) e 1,2,3 triazol (B).....	22
Figura 2 - Estrutura química do itraconazol.....	23
Figura 3 - Espectro de absorção do itraconazol SQR, para determinação do comprimento de onda ideal, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ , como diluente.....	67
Figura 4 – Representação gráfica da Curva de Ringbom do itraconazol, por método espectrofotométrico, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹	69
Figura 5 – Representação gráfica da curva analítica média do itraconazol, por método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente..	71
Figura 6 – Representação gráfica do teste de exatidão de itraconazol cápsulas, por método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	75
Figura 7 – Espectros de absorção (a) Itraconazol SQR; (b) Itraconazol cápsulas; (c) Amostra simulada de excipientes (Placebo); (d) Itraconazol SQR e Itraconazol cápsulas; (e) Itraconazol SQR e amostra simulada de excipientes (Placebo)	76
Figura 8 – Representação gráfica da curva analítica do itraconazol, através da CLAE com detecção em 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	80
Figura 9 – Representação gráfica do teste de exatidão de itraconazol cápsulas, através de CLAE com detecção em 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	83

Figura 10 – Representação gráfica dos cromatogramas obtidos no ensaio de especificidade. (a) Solução da amostra simulada do placebo, (b) cromatograma obtido através da injeção utilizando somente HCl 0,1 mol l ⁻¹	84
Figura 11 – Cromatogramas da degradação forçada, (a) Degradação em hidrólise ácida, (b) Degradação fotolítica, (c) Degradação oxidativa, (d) Cromatograma referente a injeção da amostra no tempo inicial (tempo zero).....	86
Figura 12 – Representação gráfica da curva analítica do itraconazol SQR, obtida através de ensaio microbiológico.....	89
Figura 13 – Potência média e respectivos desvios padrão para precisão do ensaio microbiológico.....	92
Figura 14 – Representação gráfica dos ensaios de especificidade somente com o diluente HCl 0,1 M mol l ⁻¹ (a), representação gráfica dos halos de inibição obtidos nos Ensaio microbiológicos de difusão em ágar cilindro em placas (b).....	94
Figura 15 – Representação gráfica dos cromatogramas obtidos com a solução utilizada no ensaio de especificidade do método microbiológico, comparado com o método através da CLAE, (a) cromatograma referente à solução injetada antes da realização da condição de degradação em hidrólise ácida, (b) cromatograma obtida com a solução após as condições de degradação em hidrólise ácida, (c) Sobreposição dos cromatogramas obtidos antes e depois da condição de degradação anteriormente citadas.....	95
Figura 16 – Resultados dos ensaios de precisão obtidos nos métodos validados (A) Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta; (B) Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE); (C) Ensaio microbiológico de potência - difusão em ágar - cilindros em placa.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da eficácia clínica do uso do itraconazol em diferentes tipos de micoses.....	27
Tabela 2 - Análises realizadas para determinação de itraconazol através de CLAE em diferentes condições cromatográficas.....	29
Tabela 3 - Ensaio microbiológico para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando itraconazol.....	30
Tabela 4 – Volume (ml) e concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de itraconazol SQR utilizados na construção da Curva de Ringbom, utilizando HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$	40
Tabela 5 - Curva analítica do itraconazol, determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta, utilizando HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, no comprimento de onda de 256 nm, e suas concentrações finais, expressas em $\mu\text{g ml}^{-1}$	41
Tabela 6 – Preparo das soluções para o teste de recuperação do itraconazol e suas concentrações teóricas finais.....	44
Tabela 7 - Alterações efetuadas no método original para avaliar a robustez do método espectrofotométrico.....	46
Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos utilizados nos ensaios analíticos para o itraconazol.....	47
Tabela 9 - Curva analítica do itraconazol, determinada por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, no comprimento de onda de 254 nm, e suas concentrações finais, expressas em $\mu\text{g ml}^{-1}$	49
Tabela 10 – Preparo das soluções para o teste de recuperação do itraconazol e suas concentrações teóricas finais.....	51

Tabela 11- Alterações efetuadas no método original para avaliar a robustez método espectrofotométrico.....	54
Tabela 12 – Parâmetros utilizados na avaliação da potência do itraconazol cápsulas.....	56
Tabela 13 - Curva analítica do itraconazol SQR, determinada através do ensaio microbiológico de difusão em ágar - cilindros em placas, utilizando ácido clorídrico 0,1 mol l ⁻¹ como diluente, e as concentrações finais, expressas em µg ml ⁻¹	58
Tabela 14 – Preparo das soluções para o teste de exatidão do itraconazol nas concentrações teóricas de 80%.....	62
Tabela 15 – Preparo das soluções para o teste de exatidão do itraconazol nas concentrações teóricas de 100%.....	63
Tabela 16 – Preparo das soluções para o teste de exatidão do itraconazol nas concentrações teóricas de 120% µg ml.....	64
Tabela 17 - Alterações efetuadas no método original para avaliar a robustez ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	65
Tabela 18 – Resultados obtidos na determinação da Curva de Ringbom do itraconazol, no comprimento de onda de 256 nm.....	68
Tabela 19 – Valores das absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do itraconazol SQR, pelo método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹	70
Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas na determinação da curva de calibração do itraconazol, por método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	71

Tabela 21 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade de itraconazol cápsulas, por método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	72
Tabela 22 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de itraconazol cápsulas, por método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	74
Tabela 23 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do itraconazol, por método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como diluente.....	75
Tabela 24 – Valores das áreas obtidas na determinação da curva analítica do itraconazol SQR, através da CLAE.....	79
Tabela 25 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade de itraconazol cápsulas, através da CLAE com detecção na região do ultravioleta em 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como solução final.....	81
Tabela 26 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de itraconazol cápsulas, através da CLAE.....	82
Tabela 27 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do itraconazol, através da CLAE no comprimento de onda de 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l ⁻¹ como solução final.....	83
Tabela 28 – Diâmetros médios dos halos de inibição, obtidos para determinação da curva analítica do itraconazol SQR, através do ensaio microbiológico.....	88
Tabela 29 - Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade do ensaio microbiológico com itraconazol.....	90

Tabela 30- Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão inter-dias do ensaio microbiológico do itraconazol.....	91
Tabela 31- Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão inter-analistas do ensaio microbiológico do itraconazol cápsula.....	91
Tabela 32- Resultados obtidos no estudo da exatidão do ensaio microbiológico do itraconazol.....	93
Tabela 33- Condições avaliadas no teste de robustez do método microbiológico.....	96
Tabela 34 – Métodos analíticos desenvolvidos e validados para análises quantitativas do itraconazol matéria-prima e cápsulas.....	97
Tabela 35 - Análise de variância entre os resultados obtidos nos testes de precisão para os ensaios de espectrofotometria na região do UV, CLAE e ensaio microbiológico.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AOAC	American Association of Pharmaceutical Scientists
ATCC	American Type Culture Collections
C8	Octilsilano
C18	Octadecilsilano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia a Líquido de alta eficiência
CV%	Coeficiente de Variação Percentual
DP	Desvio Padrão
gl	Graus de liberdade
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
r	Coeficiente de correlação de Pearson
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SQR	Substância Química de Referência
UV	Ultravioleta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Considerações gerais	21
2.2 Indicações e características físico-químicas	22
2.3 Mecanismo de ação	24
2.4 Característica farmacocinéticas	24
2.5 Principais interações medicamentosas	25
2.6 Contra-indicações e reações adversas	26
2.7 Eficácia terapêutica	27
2.8 Métodos analíticos	27
2.9 Validação de metodologia analítica	30
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	35
4.1.1 Sustância química de referência (SQR).....	35
4.1.2 Matéria-prima.....	35
4.1.3 Forma farmacêutica.....	35
4.1.4 Reagentes e solventes.....	36
4.1.5 Equipamentos e acessórios.....	36
4.2 Metodologia	37
4.2.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	38
4.2.1.1 Método espectrofotométrico.....	38
4.2.1.2 Preparo do HCl 0,1 mol l ⁻¹	38
4.2.1.3 Determinação do comprimento de onda	38
4.2.1.4 Obtenção da Curva de Ringbom.....	39
4.2.1.5 Validação do método espectrofotométrico para determinação do itraconazol	

na região do ultravioleta.....	40
4.2.1.5.1 Preparo da curva analítica.....	40
4.2.1.5.2 Precisão.....	42
4.2.1.5.3 Exatidão.....	43
4.2.1.5.4 Especificidade.....	44
4.2.1.5.5 Robustez.....	46
4.2.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).....	46
4.2.2.1 Método cromatográfico através da CLAE.....	47
4.2.2.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos e comprimento de onda	47
4.2.2.3 Preparo da fase móvel.....	48
4.2.2.4 Preparo do HCl 0,1 mol l ⁻¹	48
4.2.2.5 Validação da metodologia através da CLAE.....	48
4.2.2.5.1 Preparo da curva analítica.....	48
4.2.2.5.2 Precisão.....	49
4.2.2.5.3 Exatidão.....	50
4.2.2.5.4 Especificidade.....	52
4.2.2.5.5 Robustez.....	54
4.2.3 Ensaio microbiológico por difusão em ágar.....	54
4.2.3.1 Método de difusão em ágar – cilindros em placas.....	55
4.2.3.1.1 Preparo do HCl 0,1 mol l ⁻¹	55
4.2.3.1.2 Preparo dos Materiais.....	55
4.2.3.1.3 Preparo dos meios de cultura e diluentes.....	55
4.2.3.1.4 Padronização do método.....	56
4.2.3.1.5 Preparo do inóculo.....	57
4.2.3.1.6 Preparo da solução de itraconazol SQR.....	57
4.2.3.1.7 Preparo da solução amostra de itraconazol cápsulas.....	58
4.2.3.1.8 Ensaio.....	58
4.2.3.1.9 Determinação do teor e análise estatística dos ensaios microbiológicos....	59
4.2.3.2 Validação da metodologia do ensaio microbiológico.....	59
4.2.3.2.1 Intervalo.....	59
4.2.3.2.2 Linearidade.....	60
4.2.3.2.3 Precisão.....	60
4.2.3.2.4 Exatidão.....	60

4.2.3.2.5 Especificidade.....	64
4.2.3.2.6 Robustez.....	65
4.2.4 Análise comparativa dos métodos propostos.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 Validação da metodologia através da espectrofotometria na região do ultravioleta.....	66
5.1.1 Método espectrofotométrico.....	66
5.1.2 Escolha do comprimento de onda.....	67
5.1.3 Curva de Ringbom.....	67
5.1.4 Curvas analíticas método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	69
5.1.5 Precisão.....	72
5.1.6 Exatidão.....	75
5.1.7 Especificidade.....	76
5.1.8 Robustez.....	77
5.2 Validação da metodologia através da CLAE.....	77
5.2.1 Método cromatográfico.....	77
5.2.2 Escolha do comprimento de onda.....	78
5.2.3 Curva analítica.....	78
5.2.4 Precisão.....	80
5.2.5 Exatidão.....	82
5.2.6 Especificidade.....	84
5.2.7 Robustez.....	86
5.3 Validação da metodologia através do ensaio microbiológico.....	87
5.3.1 Intervalo de trabalho.....	87
5.3.2 Linearidade.....	88
5.3.3 Precisão.....	89
5.3.4 Exatidão.....	93
5.3.5 Especificidade.....	93
5.3.6 Robustez.....	95
5.4 Comparação dos métodos propostos.....	97
6. CONCLUSÕES.....	99

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
APÊNDICE A – Parâmetros analíticos utilizados nos métodos empregados.....	106
APÊNDICE B – Fluxograma do preparo da SQR e amostra das cápsulas contendo itraconazol nos métodos empregados.....	107

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos a incidência das micoses sistêmicas, principalmente as oportunistas, tem crescido drasticamente em todo o mundo, associando-se a isto, fatores que relacionam o avanço da medicina em transplantes de órgãos, sobrevida de pacientes neoplásicos através de quimioterapia, uso abusivo de antibióticos, crescente aumento de pacientes imunodeprimidos, devido à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), além de outros fatores (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

O uso de novos antifúngicos permitiu importantes progressos na terapêutica dos diferentes tipos de infecções micóticas superficiais e sistêmicas (ARAÚJO e SILVEIRA, 1996). O itraconazol é um derivado triazólico de amplo espectro de ação terapêutica, com ação sobre fungos que possam produzir infecções de pele, unhas, mucosas e órgãos internos (CARAZO *et al.*, 1999). É um fármaco de atividade primária fungistática e posteriormente fungicida dependendo de sua concentração e microrganismo (AQUINO, 2006), seu mecanismo de ação é semelhante aos outros antifúngicos de sua classe, atuando na inibição da biossíntese do ergosterol, um importante componente para formação da membrana celular fúngica (MEINERZ *et al.*, 2007).

Na bibliográfica consultada encontraram-se poucas técnicas analíticas para o controle de qualidade de especialidades farmacêuticas contendo itraconazol. No entanto, estão disponíveis um grande número de informações sobre o uso e atividade antifúngica do itraconazol no tratamento de diferentes infecções micóticas tanto em seres humanos como animais. São preconizadas diversas metodologias analíticas quantitativas deste fármaco em fluidos biológicos, ensaios para a determinação da potência e comparação da atividade antifúngica *in vitro* (CIM) frente a diversos fungos e agentes anti-infecciosos. Atualmente encontram-se monografias farmacopéicas, apenas para a quantificação da matéria-prima do itraconazol nas farmacopéias Britânica (2007) e Européia (2007).

Um método analítico devidamente validado, fornece informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. A validação de um método é considerada um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento.

De acordo com a legislação de nosso país, a resolução nº 899, os principais parâmetros que devem ser avaliados no processo de validação são precisão, exatidão, especificidade, robustez, linearidade, limite de detecção e quantificação.

Conforme exposto anteriormente, neste trabalho foram propostos o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas quantitativas que possam ser empregadas tanto para análises do itraconazol matéria-prima, como na forma farmacêutica cápsulas, com o emprego de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta, espectrofotometria na região do ultravioleta e ensaio microbiológico de potência por difusão em ágar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

As infecções fúngicas nos seres humanos ocorrem de formas variadas, podendo tratar-se de micoses superficiais e de fácil tratamento até micoses sistêmicas, disseminadas a vários órgãos, tornando-se potencialmente fatais (SILVA, 2002).

Estes tipos de infecções têm aumentado de forma drástica e severa nas duas últimas décadas, como resultado do enorme avanço na tecnologia médica e na capacidade de prolongar a vida de pacientes gravemente enfermos, em função de doenças consideradas fatais até recentemente. A exemplo, as novas terapêuticas oferecidas para doenças como SIDA, leucemias e neoplasias sólidas, afecções crônicas e irreversíveis dos rins, coração e fígado. Com isso, uma população de pacientes imunocomprometidos tem surgido de maneira significativa, favorecendo assim o aparecimento de processos micóticos oportunistas que aumentaram cerca de 307% entre os anos de 1979 e 2000, além do aumento da resistência às drogas atualmente disponíveis, (LORTHOLARY e DUPONT, 1997; CARAZO *et al.*, 1999; ZAOUTIS *et al.*, 2005).

Respondem ainda por um dos principais problemas sanitários em nível mundial, pois são responsáveis por cerca de até 10% das consultas dermatológicas, além de aproximadamente 15% das infecções hospitalares transmitidas a pacientes internados, que podem ser fatais em vários casos (VERA e CERVERA, 2001).

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas é limitado, e o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos tem sido muito lento em comparação ao desenvolvimento de fármacos antibacterianos e antivirais (MOYA, 2002).

Os azóis são compostos antifúngicos totalmente sintéticos, divididos em dois grupos, caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, contendo três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos) (Figura A), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos) (Figura B), (MARTINEZ, 2006).

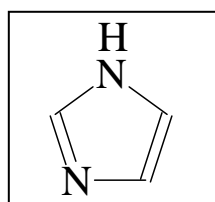


Figura A

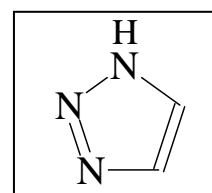


Figura B

Figura 1- Representação gráfica de heterociclos aromáticos azóicos: imidazol (A) e 1,2,3 triazol (B).

O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição do estero-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsossomal dependente do citocromo P450, prejudicando assim a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática dos fungos, levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e como consequência disto acabam alterando as propriedades fisiológicas da membrana como fluidez e permeabilidade adequada para a captação de nutrientes necessários ao crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004; NOBRE *et. al.*, 2002).

2.2 Indicações e características físico-químicas

Dentre os antifúngicos derivados dos imidazóis destaca-se pelo uso, o bis-triazólico itraconazol (Figura 2) (CARAZO *et al.*, 1999). É indicado no tratamento de infecções micóticas sistêmicas e superficiais, tanto em seres humanos quanto em animais (MUNDEL, 1996).

Sistêmicas: agente terapêutico de escolha, nos casos de infecções sistêmicas causadas por blastomicoses, histoplasmoses (incluindo aqueles pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, SIDA), coccidioidomicoses não meningicas, paracoccidioidomicoses e esporotricoses, entre outras.

Superficiais: pode ser efetiva no tratamento de micoses superficiais como candidíase oral, candidíase vulvovaginal, ceratite micótica, dermatofitoses, *tinea cruris*, *tinea pedis* entre outras (KOROLKOVAS, 2007).

Também, é indicado clinicamente nos casos de prevenção de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos, a exemplo dos pacientes transplantados ou com SIDA e em tratamentos de neutropenia febril (LUMBRERAS *et al.*, 2003).

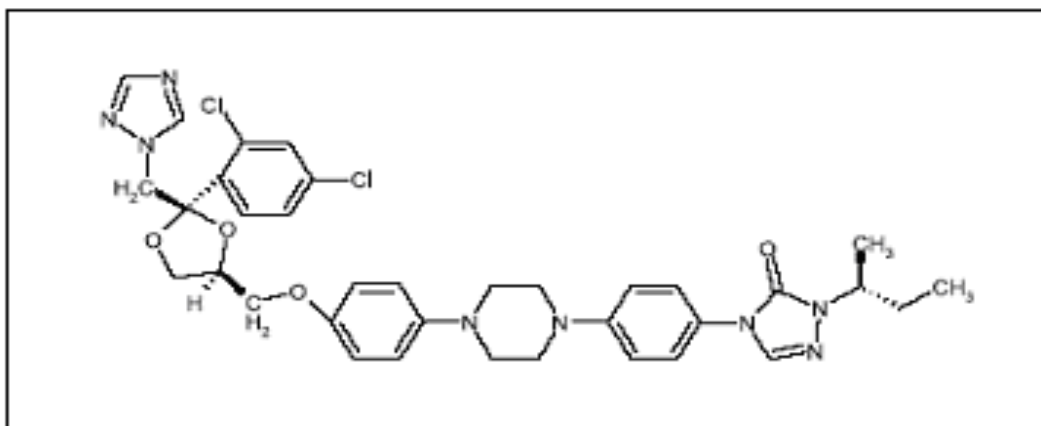


Figura 2 - Estrutura química do itraconazol

- Nome químico: 4 - [4 - [4 - [4 - [cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-metil)-1,3-dioxolan-4-il] metoxi] fenil] piperazinil-1] fenil]-2-[(1 RS)-1-metilpropil]-2,4-diidro-3H-1,2,4triazol-3-ona.
- DCB: itraconazol
- Fórmula: $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$.
- Temperatura de fusão: 166,2 °C
- Massa molecular: 706
- Aparência: pó branco a quase branco.
- Solubilidade: praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em cloreto de metileno, ligeiramente solúvel em tetraidrofurano, muito pouco solúvel em álcool (THE MERCK INDEX, 2001).

Este é o único membro da classe dos azóis que contém em sua estrutura dois grupamentos triazóis (bis-triazólico), sendo um fracamente básico 1,2,4-triazol e outro não básico 1,2,4-triazol-3-ona e apresentando amplo espectro antimicótico (DELGADO e REMERS, 1998).

2.3 Mecanismo de ação

O itraconazol atua inibindo a síntese da enzima lanosterol 14- α -desmentilase, no complexo do citocromo P450 dos fungos, tendo como resultado a inibição da conversão do lanosterol a ergosterol responsável pela biorregulação de fluidos e simetria da membrana de células fúngicas (GHANNOUM e RICE, 1999). Assim, interfere na biossíntese de ergosterol na membrana citoplasmática e conduz a um acúmulo de 14- α -metilesteróis, que pode desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolípidios e prejudicar as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana como transporte de elétrons, fixação de enzimas ativas e permeabilidade celular (GOODMAN e GILMAN, 1996; KOKS, *et al.*, 2002), tornando assim estas células fúngicas mais suscetíveis a lesões osmóticas que podem levar a morte celular fúngica (JAIN e SEHGAL, 2001).

Mas, apesar de possuir mecanismo de ação similar ao de outros antifúngicos de mesma categoria, o itraconazol possui uma menor afinidade por enzimas dependentes do citocromo P 450 dos mamíferos, o que lhe confere menor toxicidade ao bloquear a síntese de hormônios esteróides (VARGAS *et al.*, 2005).

2.4 Características farmacocinéticas

O itraconazol é rapidamente absorvido após a administração oral. Picos de concentração plasmática do fármaco inalterado são obtidos 2 a 5 horas após a administração de uma dose oral. A biodisponibilidade máxima é observada imediatamente após uma refeição completa (KOROLKOVAS, 2007).

Mais de 99% do itraconazol, ligam-se às proteínas séricas principalmente à albumina, atingindo maiores concentrações nos pulmões, rins, fígado, glândulas adrenais e pâncreas. Ocorre também uma ampla ligação aos tecidos, como o da pele devido as suas características lipofílicas e às regiões ungueais por apresentar caráter queratinofílico, porém o itraconazol alcança concentrações mínimas no líquido cefalorraquidiano (LCR) e saliva (VARGAS, *et al.*, 2005).

A metabolização se realiza no fígado originando um derivado hidroxilado ativo (hidroxiitraconazol) que chega a ser detectado no sangue em concentrações que correspondem ao dobro do fármaco inalterado, e possui também atividade antifúngica observando-se ainda mais de 25 metabólitos inativos que são eliminados principalmente pela bile. É possível a detecção de concentrações terapêuticas ativas, até quatro semanas após ter cessado o tratamento, em razão da permanência de altas concentrações nos tecidos, que são superiores a aquelas detectadas no plasma (LUMBRERAS, 2003).

O fármaco é excretado através das fezes cerca de 3 a 18% na forma inalterada. Na urina aproximadamente 40% da dose na forma de metabólitos e menos de 0,03% na forma inalterada, sendo eliminada também em grande quantidade pelo suor e secreção sebácea (KOROLKOVAS, 2007).

2.5 Principais interações medicamentosas

Os níveis de concentração de itraconazol, administrados por via oral variam muito entre os pacientes, pois é um fármaco que depende de pH ácido para sua absorção, o que determina variações em sua biodisponibilidade plasmática, em diversas situações, como nos casos de pacientes em jejum, que apresentem redução na acidez gástrica pelo uso de medicamentos inibidores de H₂ como o omeprazol e a ranitidina ou pacientes que estejam em quadros avançados de SIDA apresentando hipocloridria associada (FICA, 2004).

O itraconazol tem sua absorção reduzida com a administração concomitante de antiácidos e anti-histamínicos H₂, pois estes reduzem a acidez estomacal, ocorrendo o mesmo com a didanosina que é formulada com tampões que podem também neutralizar a acidez estomacal. Fármacos como a digoxina, ciclosporina e a fenitoína podem ter suas concentrações plasmáticas aumentadas pelo fato de serem metabolizadas pela enzima CYP3A4 do citocromo P450, assim como elevar os níveis de anti-histamínicos como a terfenadina e o astemizol, podendo conduzir a efeitos letais (GOODMAN e GILMAN, 1996).

2.6 Contra – indicações e reações adversas

O itraconazol é contra indicado para pacientes que apresentam hipersensibilidade aos antifúngicos imidazólicos, em casos de gravidez, lactação e hepatopatias. O uso em crianças deve ser avaliado levando-se em conta o risco benefício.

Cerca de 1% a 2% dos pacientes tratados podem apresentar elevações das transaminases, as quais são transitórias e assintomáticas, havendo ainda registros de casos isolados de hepatite tóxica atribuídas ao uso do itraconazol, assim como de aumentos de hipotassemia e hipertensão moderada em tratamentos prolongados (LUMBRERAS, 2003).

2.7 Eficácia terapêutica

O uso de antifúngicos azólicos como agente terapêutico para vários tipos de micoses podem demonstrar resultados de eficácia clínica diferente dos resultados obtidos em ensaios *in vitro* para o mesmo microrganismo (ANDRIOLE, 2000).

Na Tabela 1 encontram-se descritos alguns dos empregos e resultados clínicos obtidos com o uso terapêutico do itraconazol.

Tabela 1 – Resultados da eficácia clínica do uso do itraconazol em diferentes tipos de micoses

Micoses	n° de pacientes tratados com itraconazol	Resultados de eficácia
Dermatofitoses	2.741	93% para <i>Tinea corporis</i> / <i>Tinea cruris</i> . <i>Tinea pedis</i> / <i>Tinea manus</i> e 85% e 86% respectivamente
Criptococose	28	64%
Aspergilose	54	78%
Blastomicose	48	89,5%
Paracoccidioidomicose	51	100%
Pitíriase versicolor	60	93,7%
Candidíase vaginal	229	96,3%
Candidíase oral e esofágica	111	93%
Onicomicoses	182	98% e 96,5% para os pacientes com onicomicoses nos dedos das mãos e dos pés, respectivamente.
Histoplasmose	37	81%
Esporotricose	78	93% esporotricose cutânea 82% esporotricose linfática

Fonte: Bulário eletrônico ANVISA

2.8 Métodos analíticos

O itraconazol está disponível em três diferentes apresentações farmacêuticas: cápsulas contendo esferas individualizadas com revestimento (*pellets*), solução oral com hidroxipropilcelulose- β -ciclodextrina (ciclodextrina) e solução intravenosa (KOKS, *et al.*, 2002), sendo que em nosso país somente é comercializado a apresentação em cápsulas.

A Farmacopéia Britânica (BRITISH Pharmacopoeia, 2007) e a Farmacopéia Européia (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2007) somente descrevem a quantificação do itraconazol matéria-prima, por meio de titulação potenciométrica utilizando o ácido perclórico 0,1 mol l⁻¹ como titulante. Não foram encontradas na USP 30 e na

Farmacopéia Brasileira, 4ª Edição, monografias para o referido fármaco, bem como, para a especialidade farmacêutica cápsulas.

A literatura descreve a CLAE como a principal metodologia analítica para a quantificação do itraconazol em ensaios bioanalíticos e comparações *in vitro*, sendo preconizado o uso de detectores acoplados com determinações por ultravioleta, fluorescência, além de outros tipos como detectores de espectrometria de massa (YAO *et al.*, 2001; CARRIER e PARENT, 2000). As fases móveis mais utilizadas são, geralmente, misturas de solventes orgânicos e tampões, com sistema de separação através de coluna com fase reversa octadecilsilano (C18), conforme pode-se verificar na Tabela 2.

Tabela 2- Análises realizadas para determinação de itraconazol através de CLAE em diferentes condições cromatográficas

Amostra	Deteção	Fase móvel	Coluna	Referência
Fluido biológico	Fluorescência λ emis.= 380 nm λ excit.= 250 nm	Metanol : água (75 : 25 v/v)	Symmetry – C18 (5 μ m, 150 x 3,9 mm)	REDMANN & CHARLES 2006
Cápsulas contendo ITR	UV λ = 254 nm	Acetonitrila : dietilamina 0,05% v/v (pH 8,0) (60 : 40 v/v)	Supelcosil - C18 (5 μ m, 100 x 4,6 mm)	CAZEDEY <i>et al.</i> , 2007
Fluido biológico	Fluorescência λ emis.= 380 nm λ excit.= 264 nm	Acetonitrila : triethylamina 0,01% v/v (pH 2,8) : 2 –propanol, gradiente	Kromasil - C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm)	SRIVATSAN <i>et al.</i> , 2007
Fluido biológico	UV λ = 263 nm	Acetonitrila : Tampão fosfato 0,05 mol l ⁻¹ (pH 6,7) : metanol (47 : 45 : 8 v/v/v)	Alltech Alltima - C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm)	GUBBINS <i>et al.</i> , 1998
Fluido biológico	UV λ = 258 nm	Acetonitrila : água : dietilamina 0,05 % (pH 6,0) (62 : 38 v/v)	Lichrospher - C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm)	COMPAS <i>et al.</i> , 1996
Fluido biológico	Fluorescência λ emis.= 365 nm λ excit.= 260 nm	Acetonitrila : água : dietilamina 0,05 % (pH 2,45) (42 : 58 : 0.05 v/v/v)	Novapack - C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm)	COX <i>et al.</i> , 1997

Não foram encontrados, na literatura consultada, a preconização de métodos microbiológicos para a avaliação da potência do itraconazol. Todavia, conforme pode-se verificar Tabela 3, encontrou-se ensaios para a determinação de sua concentração inibitória mínima (CIM) (RIVAS e SERRANO, 2003), ou comparações

de sua atividade com a de outros antifúngicos e com o seu principal metabólito ativo o hidroxiitraconazol (ODDS e BOSSCHE, 2000).

Tabela 3 - Ensaio microbiológico para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando itraconazol.

Método <i>in vitro</i>	microrganismo	Drogas testadas	Referência
micro e macrodiluição em caldo	<i>Chaetomium</i> spp. <i>Cladosporium</i> [<i>Cladophialophora</i>] spp. <i>Fusarium</i> spp.	anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, 5-fluorocitosina, miconazol, e itraconazol	PUJOL <i>et al.</i> 1996
micro e macrodiluição em caldo	<i>P; anomala</i>	fluconazol, cetoconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina, itraconazol	REYES <i>et al.</i> 2005
microdiluição	<i>Candida</i> spp. <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporium audouinii</i> <i>Microsporium canis</i> Other <i>Microsporium</i> spp. <i>Trichophyton ajelloi</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton verrucosum</i> <i>Trichophyton violaceum</i> Other <i>Trichophyton</i> spp. <i>Malassezia</i> spp.	Itraconazol cetoconazol	ODDS <i>et al.</i> 2004
microdiluição	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida albicans</i>	Os antifúngicos testados foram fluconazol, itraconazol, cetoconazol, nistatina e anfotericina B	WINGETER <i>et al.</i> 2007

2.9 Validação de metodologia analítica

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para se proceder ao controle de qualidade de uma substância ativa, como tal, ou sob uma determinada forma farmacêutica. As disponibilidades

econômicas, de equipamentos e reagentes, também devem ser consideradas (ERMER, 2001; MEHTA, 2003; VALENTINI *et al.*, 2004).

Para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve passar por uma avaliação denominada validação. A validação de um método é considerada um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Este processo sendo bem definido e documentado, fornecerá às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

Em nosso país os dois órgãos que regulamentam o processo de validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO).

Os parâmetros avaliados no processo de validação, também denominados de figuras de mérito, servem como indicadores quantitativos do objetivo e do bom desempenho das técnicas analíticas e são descritos na literatura como: precisão, exatidão, especificidade, robustez, linearidade, limite de detecção e quantificação (RIBEIRO e FERREIRA, 2008), conforme as fontes de referência mais utilizadas no Brasil, a exemplo o ICH (1996b), USP30 (2007) e a Resolução n° 899 (BRASIL, 2003).

A precisão de um procedimento analítico representa o grau de concordância entre o resultado de análises individuais quando aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra em idênticas condições de teste. Pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão é avaliada através do desvio padrão relativo, sendo o limite aceitável de até 5% segundo a legislação vigente (BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

Repetibilidade (precisão intra-dia): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003).

Precisão intermediária (precisão inter-dias): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos,

geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias (BRASIL, 2003).

A exatidão, por sua vez, como sendo o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, podendo ser avaliada através das quantidades (porcentagens) da substância de referência recuperada na substância amostra após adições em concentrações diferentes.

A especificidade de um procedimento analítico representa a capacidade de avaliar uma substância mesmo em presença de possíveis interferentes que possam estar presentes juntamente com a amostra (ICH, 1996).

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, ou seja, apresenta uma indicação da confiabilidade do método durante o uso rotineiro (ICH, 1996).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Podem ser preparadas curvas analíticas, validadas estatisticamente, como, por exemplo, através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, demonstrando o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta, certificando assim, a proporcionalidade entre as leituras obtidas e as concentrações das amostras (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

Limite de detecção corresponde a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições analíticas estabelecidas para o ensaio (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

Limite de quantificação representa a menor concentração da substância analisada em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão nas condições analíticas estabelecidas para o ensaio (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

Podem-se dividir os métodos analíticos em quatro categorias, testes quantitativos para determinação de matéria-prima e produto acabado (categoria I), ensaios limite para a determinação de impurezas e de produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matéria-prima (categoria II), testes de desempenho (categoria III) e testes de identificação (categoria IV) (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

Em cada uma destas categorias é exigida a avaliação dos parâmetros analíticos segundo a sua aplicação. Para os ensaios de determinação quantitativa deve-se considerar linearidade, precisão, exatidão, especificidade e a robustez (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos quantitativos para o controle de qualidade do itraconazol matéria-prima e a forma farmacêutica cápsulas.

3.2 Objetivos específicos

- desenvolver e validar método analítico quantitativo por espectrofotometria com detecção na região do ultravioleta, para determinação do itraconazol matéria-prima e cápsulas.
- desenvolver e validar método analítico quantitativo por CLAE com detecção na região do ultravioleta, para determinação do itraconazol matéria-prima e cápsulas.
- desenvolver e validar método analítico quantitativo empregando ensaio microbiológico de potência, utilizando método por difusão em ágar para determinação do itraconazol matéria-prima e cápsulas
- realizar análise estatística comparativa entre as metodologias analíticas quantitativas desenvolvidas para a determinação do itraconazol matéria-prima e cápsulas .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A substância química de referência, matéria-prima e forma farmacêutica utilizadas no presente estudo estão descritas a seguir:

4.1.1 Substância química de referência (SQR)

Itraconazol SQR – Produzido pela Farmacopéia Européia – Lote: 2, n° comercial: 51197

4.1.2 Matéria-prima

Utilizou-se o itraconazol matéria-prima de procedência Indiana, fabricado em 12/05/2004, lote original 196523, distribuído pela empresa Purifarma, fracionado em 17/01/06 e com validade até 08/2008.

4.1.3 Forma farmacêutica

Itraconazol cápsulas* 100 mg, adquiridas no comércio local. Excipientes: núcleos individualizados, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol. Externamente (cápsulas): dióxido de titânio, dissulfonato sódico de indigotina, eritrosina sódica e gelatina.

*(Sporanox[®] produzido por Janssen-Cilag Farmacêutica, lote: KAL187, com prazo de validade até 01/2010)

4.1.4 Reagentes e solventes

- Acetonitrila grau cromatográfico (Carlo Erba)
- Ácido Clorídrico (HCl) P.A (Merck)
- Água purificada Milli-Q
- Diclorometano grau cromatográfico (Carlo Erba)
- Metanol P.A (Nuclear)
- Metanol grau cromatográfico (Carlo Erba)
- Meio de cultura N° 19 (Difco)

4.1.5 Equipamentos e acessórios

- Autoclave Phenix, modelo 75
- Balança analítica, BOSCH, modelo SAE 200
- Banho ultra-sônico, Unique, USC 1400
- Bomba de vácuo, Primatec, modelo 131
- Cilindros de aço inoxidável, dimensões: 0,8 cm de diâmetro externo, 0,6 cm de diâmetro interno e 1,0 cm de altura, ARTHUR E. FARMER;
- Cilindros de aço inoxidável 8 mm x 6 mm x 10 mm
- Coluna Gemini 150 x 4,60 mm RP 8, porosidade 5 µm e pré-coluna securityguard cartridges Gemini PK/10.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu, equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/Vis modelo SPD-10Avp, controlador SLC-10Avp, integrador automático computadorizado com software Class VP[®] e injetor automático SIL-10-Avp, forno para coluna CTO 10 Asvp Shimadzu.

- Cubetas de quartzo 10 mm, Hellma 100 QS
- Destilador, BIOMATIC
- Espectrofotômetro UV/Vis, SHIMADZU – UV 1650 PC
- Estufa para cultura Bacteriológica, modelo EL-1.5, Odontobrás
- Estufa para esterilização e secagem, modelo ECB 1.3, Odontobrás
- Membrana filtrante acetato de celulose 0,45 µm, 47 mm, Sartorius
- Membrana filtrante de nylon 0,45, 47 mm, Sartorius
- Membrana filtrante RC 0,45 µm, para seringa, Sartorius
- Papel filtro quantitativo faixa preta , Framex.
- Paquímetro digital Starrett
- Pipetador, Tranferpette Brand
- Pinça metálica
- Placas de Petri 20 mm x 100 mm
- Purificador de água Milli-Q A10, Millipore
- Vidraria calibrada Brand (balões volumétricos, pipetas)

4.2 Metodologia

Os métodos analíticos descritos a seguir, podem ser aplicados tanto para o itraconazol matéria-prima quanto para a sua apresentação em cápsulas, uma vez que a cápsula comercialmente disponível contém em seu interior apenas o itraconazol em *pellets*, desta maneira optou-se apenas pela descrição das análises com esta apresentação.

4.2.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Através deste estudo desenvolveu-se e validou-se um método analítico quantitativo para itraconazol matéria-prima e cápsulas através de espectrofotometria na região do ultravioleta com detecção em 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

4.2.1.1 Método espectrofotométrico

A espectrofotometria na região ultravioleta e visível (UV-VIS) é uma técnica analítica amplamente empregada na determinação de diversos parâmetros de avaliação da qualidade de medicamentos e matéria-prima descritos nos principais compêndios de referência como as Farmacopéias Brasileira, Americana (USP), Britânica entre outras. Destacando-se ainda, algumas de suas principais vantagens à simplicidade de execução dos métodos, custo relativamente baixo, robustez e rapidez na obtenção de resultados analíticos confiáveis (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

4.2.1.2 Preparo do HCl 0,1 mol l⁻¹

Transferiu-se 250 ml de água para balão volumétrico de 1000 ml, adicionou-se 8,3 ml de HCl P.A e completou-se o volume com água ultrapurificada.

4.2.1.3 Determinação do comprimento de onda

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano,

completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Transferiu-se 20 ml para balão volumétrico de 200 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹, obtendo-se uma solução na concentração de 100 µg ml⁻¹.

Em seguida, realizou-se a varredura do espectro desta solução na faixa de 400 a 200 nm, para determinar o comprimento de onda mais adequado para as determinações do itraconazol.

4.2.1.4 Obtenção da Curva de Ringbom

Para determinar a faixa ideal da concentração de trabalho do itraconazol SQR, construiu-se a Curva de Ringbom, utilizando diferentes soluções de concentrações variadas abrangendo uma faixa de 0,5 a 50 µg ml⁻¹.

Preparou-se a solução de trabalho com itraconazol SQR, na concentração de 100 µg ml⁻¹, conforme descrito no item 4.2.1.3.

Os volumes indicados na Tabela 4 foram transferidos para balões de 25 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹.

As leituras das absorbâncias dessas soluções foram efetuadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, no comprimento de onda determinado de 256 nm, empregando-se HCl 0,1 mol l⁻¹ para ajuste do zero.

Tabela 4 – Volume (ml) e concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de itraconazol SQR utilizados na construção da Curva de Ringbom, utilizando HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$.

Balão (25 ml)	Volume da solução de itraconazol SQR (ml)	Concentração final ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0,125	0,5
2	0,25	1,0
3	0,5	2,0
4	1,0	4,0
5	1,5	6,0
6	2,0	8,0
7	2,5	10,0
8	3,0	12,0
9	3,5	14,0
10	4,0	16,0
11	4,5	18,0
12	5,0	20,0
13	5,5	22,0
14	6,0	24,0
15	6,5	26,0
16	7,0	28,0
17	7,5	30,0
18	8,0	32,0
19	8,5	34,0
20	9,0	36,0
21	9,5	38,0
22	10,0	40,0
23	10,5	42,0
24	11,0	44,0
25	12,5	50,0

Para construção do gráfico, plotaram-se, no eixo das ordenadas, as transmitâncias expressas em $(100 - T\%)$ e o logaritmo das concentrações, no eixo das abscissas.

4.2.1.5 Validação do método espectrofotométrico para determinação do itraconazol na região do ultravioleta.

4.2.1.5.1 Preparo da curva analítica

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano,

completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Transferiu-se 10 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹. A partir desta solução, preparou-se a curva analítica nas concentrações de 16, 18, 20, 22 e 24 µg ml⁻¹, utilizando-se o mesmo solvente. Na Tabela 5 encontram-se as diluições e as concentrações finais de itraconazol SQR empregadas na curva analítica.

Tabela 5 – Curva analítica do itraconazol, determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹, no comprimento de onda de 256 nm, e suas concentrações finais, expressas em µg ml⁻¹.

Balão	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração
(25 ml)	(ml)	(µg ml ⁻¹)
1	4,0	16
2	4,5	18
3	5,0	20
4	5,5	22
5	6,0	24

As leituras das absorvâncias dessas soluções foram efetuadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, no comprimento de onda de 256 nm. Empregou-se HCl 0,1 mol l⁻¹ para ajuste do zero.

Plotaram-se as absorvâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição da SQR, no eixo das ordenadas e as concentrações (µg ml⁻¹), no eixo das abscissas.

A curva analítica e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os valores experimentais foram tratados estatisticamente, através da análise de variância.

4.2.1.5.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação do itraconazol cápsulas, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade do método, foram realizadas três determinações, nas concentrações de 16, 20 e 24 $\mu\text{g ml}^{-1}$, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi obtida através da determinação do itraconazol, na concentração de 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, em três dias diferentes, por dois analistas diferentes.

Preparo das amostras

Determinou-se o peso médio de 20 cápsulas. Transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para balão volumétrico de 250 ml. Adicionou-se 150 ml de HCl 0,1 mol l^{-1} e deixou-se em ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se, obtendo-se uma solução de concentração final 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Solução 1).

Para a repetibilidade, filtrou-se e transferiu-se respectivamente, 4,0; 5,0 e 6,0 ml da Solução 1 para três balões volumétricos de 25 ml, completou-se o volume com HCl 0,1 mol l^{-1} e homogeneizou-se, obtendo-se assim, soluções com concentrações finais de 16, 20 e 24 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Para a precisão intermediária filtrou-se e transferiu-se 5,0 ml da Solução 1 para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com HCl 0,1 mol l^{-1} e homogeneizou-se, obteve-se uma solução com concentração final de 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

As leituras das absorbâncias dessas soluções foram efetuadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, no comprimento de onda de 256 nm. Empregou-se HCl 0,1 mol l^{-1} para ajuste do zero. A quantidade de itraconazol presente nas amostras, foi determinada através da equação da reta, obtida da curva analítica.

4.2.1.5.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através da recuperação de quantidades conhecidas da solução padrão adicionadas a balões volumétricos contendo volumes iguais da solução amostra com concentração previamente determinada.

Preparo das soluções

Solução SQR – Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Transferiu-se 5 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹, obtendo-se uma solução de concentração final 50 µg ml⁻¹.

Solução amostra – Preparou-se conforme descrito em preparo das amostras no item 4.2.1.5.2 do ensaio de Precisão.

Ensaio

Transferiu-se 2,5 ml da solução amostra para cinco balões volumétricos de 25 ml, denominados A, R1, R2, R3 e R4. Adicionou-se alíquotas da solução SQR de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 ml, aos balões R1, R2, R3 e R4, conforme descrito na Tabela 6. Completou-se os volumes com HCl 0,1 mol l⁻¹ a fim de se obter as concentrações teóricas finais de 10 µg ml⁻¹; 15 µg ml⁻¹; 20 µg ml⁻¹; 25 µg ml⁻¹ e 30 µg ml⁻¹.

Tabela 6 – Preparo das soluções para o teste de recuperação do itraconazol e suas concentrações teóricas finais.

Balões (25 ml)	Volume da amostra	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração teórica final
	(ml)	(ml)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)
A	2,5	-	10
R1	2,5	2,5	15
R2	2,5	5,0	20
R3	2,5	7,5	25
R4	2,5	10,0	30

As leituras das absorvâncias dessas soluções foram efetuadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, no comprimento de onda de 256 nm. Empregou-se HCl 0,1 mol l⁻¹ para ajuste do zero.

Cálculos

As porcentagens de recuperação de itraconazol SQR foram calculadas através da seguinte equação:

$$R\% = [(C_a - C_{na}) / C_p] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde,

C_a= concentração de itraconazol encontrada na amostra adicionada de SQR;

C_{na}= concentração de itraconazol encontrada na amostra não adicionada de SQR;

C_p= concentração de itraconazol ($\mu\text{g ml}^{-1}$) adicionada à amostra.

4.2.1.5.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da análise de sobreposição dos espectros da solução amostra, solução da SQR e da solução simulada do placebo em HCl 0,1 mol l⁻¹.

Preparo da solução amostra

Determinou-se o peso médio de 20 cápsulas. Transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para balão volumétrico de 250 ml. Adicionou-se 150 ml de HCl 0,1 mol l⁻¹ e deixou-se em ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Transferiu-se 5 ml para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹, obtendo concentração final de 10 µg ml⁻¹.

Preparo da solução de SQR

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Transferiu-se 1 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹, obtendo concentração final de 10 µg ml⁻¹.

Preparo da solução simulada do placebo

Preparou-se uma amostra placebo a partir do peso médio do conteúdo das cápsulas de itraconazol utilizando-se as médias percentuais recomendadas para cada excipiente (KIBBE, 2000), em seguida procedeu-se conforme descrito no preparo da solução amostra descrito em especificidade 4.2.1.5.4.

Avaliação dos espectros

Traçou-se os espectros da solução do itraconazol SQR, amostra e placebo, na faixa de 400 nm a 200 nm, verificando-se a similaridade e possíveis interferências entre estes.

4.2.1.5.5 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas modificações no método original, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7- Alterações efetuadas no método original para avaliar a robustez do método espectrofotométrico

Método proposto	Condição alterada
HCl 0,1 mol l ⁻¹	HCl 0,2 mol l ⁻¹ HCl 0,05 mol l ⁻¹
Comprimento de onda: 256 nm	252 nm e 260 nm
HCl marca MERCK	HCl marca Nuclear

Avaliou-se, também, a estabilidade da amostra sob a luz ambiente e a irradiação ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, nas primeiras 4 horas e após 5 e 72 horas.

4.2.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

Através deste estudo desenvolveu-se e validou-se um método analítico quantitativo para itraconazol matéria-prima e cápsulas através de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), utilizando-se as condições cromatográficas descritas na Tabela 8.

4.2.2.1 Método cromatográfico através da CLAE

Nos últimos 25 anos a utilização da CLAE tornou-se um método analítico muito importante para as áreas farmacêutica e biomédica, atualmente é um dos principais métodos descritos nos compêndios oficiais para análises quantitativas e ensaios para determinação de impurezas em medicamentos (GÖRÖG, 2007).

4.2.2.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos e comprimento de onda

Baseando-se na revisão bibliográfica realizada, a exemplo da Tabela 2, testou-se diferentes tipos de fase móvel e proporção entre seus constituintes, colunas de diferentes fases estacionárias e comprimentos, além de outros parâmetros como volume de injeção das soluções, temperatura da coluna e vazão da fase móvel.

Para a determinação do comprimento de onda adequado, realizou-se as detecções na faixa de espectro de maior absorção demonstradas no método espectrofotométrico com o itraconazol SQR, na concentração de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, efetuando-se a primeira diluição com 1 ml de diclorometano e metanol e a solução final em HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$.

Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos utilizados nos ensaios analíticos para o itraconazol.

Características	Descrição
Coluna	Phenomenex® Gemini RP-8 (150 mm x 4,60 mm, 5 μm)
Fase móvel	Acetonitrila : Água (65:35)
Comprimento de onda	254 nm
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	50 μl
Vazão	1,0 ml/minuto

4.2.2.3 Preparo da fase móvel

Realizou-se a mistura dos componentes da fase móvel, acetonitrila : água (65:35), com o auxílio de vácuo filtrou-se através de membrana de nylon 0,45 μm e 47 mm de diâmetro e desgaseficou-se em banho de ultra-som, durante 10 minutos.

4.2.2.4 Preparo do HCl 0,1 mol l⁻¹

Transferiu-se 250 ml de água para balão volumétrico de 1000 ml, adicionou-se 8,3 ml de HCl (HCl) e completou-se o volume com água ultrapurificada.

4.2.2.5 Validação da metodologia através da CLAE

4.2.2.5.1 Preparo da curva analítica

Pesaram-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se, obtendo-se assim uma solução com 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ denominada Solução A. Em seguida transferiu-se 10 ml da Solução A, para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹ obtendo-se assim uma solução de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ denominada Solução B. A partir da Solução B preparou-se a curva analítica nas concentrações de 6, 8, 10, 12, 14 $\mu\text{g ml}^{-1}$, utilizando-se HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente final destas soluções. Na Tabela 9 são demonstradas as diluições e as concentrações finais de itraconazol SQR empregadas na curva analítica.

Tabela 9 - Curva analítica do itraconazol, determinada por cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, no comprimento de onda de 254 nm, e suas concentrações finais, expressas em $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Balão	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração
(10 ml)	(ml)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0,6	6
2	0,8	8
3	1,0	10
4	1,2	12
5	1,4	14

As injeções dessas soluções foram efetuadas em triplicata, nas condições cromatográficas estabelecidas, com sistema de detecção na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 254 nm.

Plotaram-se as absorvâncias médias, correspondentes a três determinações para cada diluição da SQR, no eixo das ordenadas e as concentrações ($\mu\text{g ml}^{-1}$), no eixo das abscissas.

A curva analítica e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Os valores experimentais foram tratados estatisticamente, através da análise de variância.

4.2.2.5.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação do itraconazol cápsulas, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade do método, foram realizadas três determinações, nas concentrações de 6, 10 e $14 \mu\text{g ml}^{-1}$, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi obtida através da determinação do

itraconazol, na concentração de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, em três dias diferentes, por dois analistas diferentes.

Preparo das amostras para os ensaios de precisão através da CLAE

Determinou-se o peso médio de 20 cápsulas. Transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para balão volumétrico de 100 ml. Adicionou-se 80 ml de metanol e 1 ml de diclorometano, em seguida submeteu-se ao ultra-som até completa dissolução dos *pellets* obtendo-se assim uma solução de concentração final de $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ denominada de Solução I.

Em seguida transferiu-se 5 ml da Solução I para balão volumétrico de 25 ml obtendo-se assim uma solução de concentração final de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ denominada Solução II.

Para a repetibilidade, filtrou-se e transferiu-se respectivamente, 3,0; 5,0 e 7,0 ml da Solução II para três balões volumétricos de 25 ml, completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ e homogeneizou-se, obtendo-se assim, soluções com concentrações finais de 6, 10 e $14 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Para a precisão intermediária filtrou-se e transferiu-se 5,0 ml da Solução II, para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ e homogeneizou-se, obteve-se uma solução com concentração final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

As injeções dessas soluções foram efetuadas em triplicata, nas condições cromatográficas estabelecidas, com sistema de detecção na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 254 nm. A quantidade de itraconazol presente nas amostras, foi determinada através da equação da reta, obtida da curva analítica.

4.2.2.5.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através da recuperação de quantidades conhecidas da solução da SQR do itraconazol adicionadas em balões volumétricos contendo a mesma quantidade da solução amostra.

Preparo das soluções

Preparou-se soluções iniciais da SQR do itraconazol e da amostra, ambas na concentração de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, conforme as condições descritas anteriormente em 4.2.2.5.1 para SQR do itraconazol e 4.2.2.5.2 no ensaio de Precisão para o preparo da amostra.

Transferiu-se 2,5 ml da solução amostra para cinco balões volumétricos de 25 ml, denominados A, R1, R2, R3 e R4. Adicionou-se alíquotas de 1,5; 2,5; 3,5 e 5,0 ml, aos balões R1, R2, R3 e R4, conforme descrito na Tabela 10. Completou-se os volumes com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a fim de se obter as concentrações teóricas finais de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$; $8 \mu\text{g ml}^{-1}$; $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; $12 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $15 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Tabela 10 – Preparo das soluções para o teste de recuperação do itraconazol e suas concentrações teóricas finais.

Balões (50 ml)	Volume da amostra	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração teórica final
	(ml)	(ml)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)
A	2,5	-	5
R1	2,5	1,5	8
R2	2,5	2,5	10
R3	2,5	3,5	12
R4	2,5	5,0	15

As soluções foram injetadas em triplicata, nas condições cromatográficas estabelecidas utilizando-se sistema de detecção na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 254 nm.

Cálculos

As porcentagens de recuperação de itraconazol SQR foram calculadas através da seguinte equação:

$$R\% = [(C_a - C_{na}) / C_p] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde,

C_a = concentração de itraconazol encontrada na amostra adicionada de SQR;

C_{na} = concentração de itraconazol encontrada na amostra não adicionada de SQR;

C_p = concentração de itraconazol ($\mu\text{g ml}^{-1}$) adicionada à amostra.

4.2.2.5.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos com a injeção dos solventes utilizados tanto no preparo da solução do itraconazol SQR quanto amostra, e de uma solução placebo contendo os excipientes em concentrações percentuais médias utilizadas no conteúdo das cápsulas de itraconazol (*pellets*).

Além disto, realizou-se estudos de degradação forçada da SQR sob condições hidrolíticas (ácida e alcalina), oxidativas (H_2O_2 10 vol.) e fotolíticas (luz UV 254 nm), a fim de se verificar a sensibilidade do método à possível presença e interferência de algum produto de degradação.

Preparo da solução do itraconazol SQR nas condições normais (tempo zero)

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se (Solução α , $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$). Transferiu-se 1 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, obtendo-se solução com concentração final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Solução β).

Hidrólise ácida e alcalina

A partir da Solução α da SQR ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$), transferiu-se alíquotas de 2,5 ml para balões volumétricos de 25 ml e completou-se o volume com HCl 1 mol l^{-1} e NaOH 1 mol l^{-1} , respectivamente, obtendo-se soluções com concentrações finais de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Estas soluções foram mantidas, sob temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 4 horas. Após este período, transferiu-se alíquotas de 1,0 ml da solução para balões volumétricos de 10 ml e efetuou-se as neutralizações das amostras com 1,0 ml de NaOH 1 mol l^{-1} e HCl 1 mol l^{-1} , respectivamente, para hidrólise ácida e alcalina. Completou-se os volumes com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, para obtenção de soluções com concentrações finais de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Degradação oxidativa

A partir da Solução α da SQR ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$) transferiu-se alíquota de 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio 10 volumes. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente e protegida da luz. Após 4 horas, transferiu-se alíquota de 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, obtendo-se concentração final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Degradação fotolítica

A partir da Solução α da SQR ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$) transferiu-se alíquota de 1,0 ml para balão volumétrico de 10 ml, em seguida transferiu-se esta solução para um tubo de quartzo que ficou em exposição de luz ultravioleta (254 nm) durante um período de 4 horas. Após o período de exposição transferiu-se 1 ml desta solução para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, obtendo-se assim, uma solução de concentração final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Avaliação dos cromatogramas

Realizou-se a sobreposição dos cromatogramas obtidos nas condições de degradação forçada descritas acima, com a Solução β da SQR para verificar se

houve alguma degradação detectável do produto formado nas condições estabelecidas do ensaio.

4.2.2.5.5 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas modificações no método original, conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11- Alterações efetuadas no método proposto para avaliar a robustez método espectrofotométrico

Método proposto	Condição alterada
Comprimento de onda: 254 nm	253 nm e 256 nm
Temperatura de análise 25 °C	Temperatura de análise 23 e 27 °C
Fluxo 1,0 ml/minuto	0,8 e 1,2 ml/minuto
Coluna Phenomenex® Gemini, RP-18 150 mm x 4,60 mm, 5 µm	Coluna Phenomenex® Luna, RP-18 150 mm x 4,60 mm, 5 µm
Proporção da fase móvel Acetonitrila: água (65:35)	Proporção da fase móvel Acetonitrila: água (63:37)
	Proporção da fase móvel Acetonitrila: água (67:33)

4.2.3 Ensaio microbiológico por difusão em ágar

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e validação de um ensaio microbiológico por difusão em Agar, cilindros em placas, com o emprego de

planejamento 3x3, para a determinação quantitativa do itraconazol cápsulas e matéria-prima.

4.2.3.1 Método de difusão em ágar – cilindros em placas

4.2.3.1.1 Preparo do HCl 0,1 mol l⁻¹

Transferiu-se 250 ml de água para balão volumétrico de 1000 ml, adicionou-se 8,3 ml de HCl concentrado e completou-se o volume com água ultrapurificada.

4.2.3.1.2 Preparo dos Materiais

Antes da execução de cada ensaio, realizou-se previamente a esterilização das placas de Petri, cilindros de aço inoxidável e pinça metálica a 200 – 220 °C, em estufa, por um período de 2 horas (CODE of Federal Regulation, 1996; Farmacopéia Brasileira, 1988).

4.2.3.1.3 Preparo dos meios de cultura e diluentes

Para a realização dos ensaios microbiológicos, utilizou-se o meio antibiótico n°19 para o repique, manutenção e ensaio de potência com o microrganismo *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collections) 10231. Preparou-se o meio conforme a indicação do fabricante, e autoclavou-se em seguida a 121 °C por 15 minutos.

Como solução diluente, utilizou-se o HCl 0,1 mol l⁻¹, preparada conforme descrito anteriormente.

Meio antibiótico n°19

Peptona	9,4 g
Extrato de carne	2,4 g
Extrato de levedura	4,7 g
Dextrose	10,0 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Agar	23,5 g
Água	q.s.p 1000 ml

pH após esterilização: $6,1 \pm 0,1$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2.3.1.4 Padronização do método

Os parâmetros utilizados na realização do ensaio microbiológico empregado, estão descritos abaixo na Tabela 12.

Tabela 12 – Parâmetros utilizados na avaliação da potência do itraconazol cápsulas

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Cândida albicans</i> ATCC 10231
Meio de cultura	Meio de cultura para antibiótico n° 19
Volume do meio de cultura em cada placa	8 ml
Concentração de padrão e amostra	0,6, 0,9 e $1,35\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Temperatura de incubação	$25^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
Tempo de incubação	48 horas
Solução diluente	HCl $0,1\ \text{mol l}^{-1}$
Concentração do inóculo	1%

4.2.3.1.5 Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça estéril, repicou-se o microrganismo para um tubo de vidro contendo 10 ml de meio de cultura antibiótico n° 19, inclinado e incubou-se a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de 48 horas. Após a verificação do crescimento microbiano, adicionou-se 3 ml de solução fisiológica estéril neste tubo e transferiu-se em seguida o volume da suspensão formada, para um frasco de Roux contendo 250 ml de meio de cultura n° 19, inclinado. Incubou-se conforme as condições anteriormente citadas. O crescimento ocorrido na superfície foi lavado com 50 ml de solução fisiológica estéril.

A suspensão fúngica formada foi padronizada com auxílio de espectrofotômetro, no comprimento de onda de 580 nm, através de diluições sucessivas com solução fisiológica estéril até a obtenção de uma suspensão com transmitância na faixa de $25\% \pm 2\%$. A partir desta suspensão, preparou-se o meio de cultura n° 19, inoculado a 1%.

4.2.3.1.6 Preparo da solução de itraconazol SQR

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 25 mg de itraconazol SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Transferiu-se 1 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl $0,1\text{ mol l}^{-1}$. A partir desta solução, preparou-se as soluções de trabalho nas concentrações de 0,4, 0,6, 0,9, 1,35 e $2,025\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$, utilizando-se o mesmo solvente. Na Tabela 13 encontram-se as diluições e as concentrações finais de itraconazol SQR empregadas na curva analítica.

Tabela 13 - Curva analítica do itraconazol SQR, determinada através do ensaio microbiológico de difusão em ágar - cilindros em placas, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente, e as concentrações finais, expressas em µg ml⁻¹.

Soluções	Solução de itraconazol SQR	Volume do diluente	Volume final do balão	Concentração final
n°	(ml)	(ml)	(ml)	(µg ml⁻¹)
1	0,4	9,6	10	0,4
2	0,6	9,4	10	0,6
3	0,9	9,1	10	0,9
4	1,35	8,65	10	1,35
5	2,025	7,975	10	2,025

4.2.3.1.7 Preparo da solução amostra de itraconazol cápsulas

Determinou-se o peso médio de 20 cápsulas. Transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para balão volumétrico de 250 ml. Adicionou-se 150 ml de HCl 0,1 mol l⁻¹ e deixou-se em ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 0,6; 0,9 e 1,35 µg ml⁻¹, utilizando-se como diluente o HCl 0,1 mol l⁻¹.

4.2.3.1.8 Ensaio

Após prévia esterilização, utilizaram-se seis placas de Petri para cada ensaio, transferindo-se para cada uma delas 8 ml de meio para antibiótico n° 19, inoculada a 1% com a suspensão padronizada do microrganismo teste. Após a solidificação da camada semeada, adicionaram-se seis cilindros em cada placa, com intervalo aproximado de 60° e raio de 2,8 cm. Com o auxílio de pipetador automático, transferiu-se o volume de 150 µl para cada um dos cilindros correspondentes às soluções amostra e padrão nas concentrações de 0,6; 0,9 e 1,35 µg ml⁻¹. As placas foram incubadas durante 48 horas a 25 °C ± 2 °C. Os halos formados a partir da

inibição do crescimento da *Candida albicans* foram medidos com o auxílio de paquímetro digital. Foram realizados dez ensaios de potência microbiológica.

4.2.3.1.9 Determinação do teor e análise estatística dos ensaios microbiológicos

Utilizando as médias das leituras dos halos de inibição, correspondentes a cada concentração das soluções amostra e padrão, determinou-se a potência (teor) do itraconazol cápsulas através do ensaio estatístico de retas paralelas para planejamento experimental 3x3. Através da análise de variância – ANOVA, verificaram-se os principais parâmetros da validação estatística dos bioensaios realizados, como a regressão linear significativa, desvios de linearidade e paralelismo não significativos. Os limites de confiança ($p=0,05$) dos ensaios microbiológicos também foram considerados para fins de validade estatística (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; HEWITT, 2003; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007).

4.2.3.2 Validação da metodologia do ensaio microbiológico

Seguindo as especificações da RE nº 899 (ANVISA), AOAC, ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) e a Farmacopéia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007), validou-se a metodologia através da avaliação dos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.

4.2.3.2 .1 Intervalo de trabalho

Determinou-se experimentalmente através de ensaios, avaliando-se diferentes concentrações das soluções de trabalho para a elaboração da curva analítica atendendo aos parâmetros de linearidade, exatidão e precisão.

4.2.3.2.2 Linearidade

A partir de três níveis de concentração das soluções de trabalho em progressão geométrica com razão 1,5 (0,6; 0,9 e 1,35 $\mu\text{g ml}^{-1}$), em dez ensaios independentes, determinou-se a linearidade do método através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se assim a equação da reta. Determinou-se a curva analítica a partir das médias dos halos de inibição de crescimento versus o logaritmo das concentrações das diferentes soluções de trabalho. A validade de cada ensaio foi determinada através da análise de variância (ANOVA).

4.2.3.2.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação do itraconazol cápsulas, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade do método, realizou-se seis determinações do itraconazol cápsulas, na concentração teórica de 0,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi obtida através da determinação do itraconazol, na concentração de 0,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$, em dois dias diferentes, por analistas diferentes.

4.2.3.2.4 Exatidão

A exatidão do método microbiológico, empregando planejamento 3x3, foi determinada através da comparação dos resultados obtidos a partir de diferentes concentrações das soluções amostra das cápsulas de itraconazol abrangendo as faixas de 80% (0,48; 0,72; 1,08 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 100% (0,6; 0,9; 1,35 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e 120% (0,72; 1,08; 1,62 $\mu\text{g ml}^{-1}$), em relação a cada uma das três concentrações de trabalho utilizadas no ensaio (0,6; 0,9 e 1,35 $\mu\text{g ml}^{-1}$) preparadas a partir da SQR do

itraconazol. Foram realizados quatro ensaios independentes para cada concentração.

Preparo do ensaio a 80% da concentração de trabalho.

Para o preparo das soluções da SQR do itraconazol nas concentrações de trabalho (0,6; 0,9; 1,35 $\mu\text{g ml}^{-1}$), pesou-se a quantidade equivalente a 25 mg da SQR de itraconazol, e transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano e completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução estoque com concentração final de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Transferiu-se volumetricamente 1 ml desta solução estoque para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l^{-1} , para obter uma solução de trabalho de concentração final de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A partir desta solução de trabalho transferiram-se alíquotas de 3,0; 4,5; e 6,75 ml para balões volumétricos de 50 ml denominados respectivamente como R1, R2, R3, conforme descrito na Tabela 14. Completaram-se os volumes com HCl 0,1 mol l^{-1} a fim de se obter as concentrações teóricas finais de 0,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 0,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 1,35 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Para o preparo das soluções amostra do itraconazol cápsulas nas concentrações de trabalho a 80% (0,48; 0,72; 1,08 $\mu\text{g ml}^{-1}$), determinou-se o peso médio de 20 cápsulas e transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para balão volumétrico de 250 ml. Adicionou-se 150 ml de HCl 0,1 mol l^{-1} e deixou-se em ultra-som por 10 minutos obtendo-se assim uma solução estoque com concentração final de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Transferiu-se volumetricamente 10 ml desta solução estoque para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l^{-1} , para obter uma solução de trabalho de concentração final de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A partir desta solução de trabalho transferiram-se alíquotas de 2,4; 3,6; e 5,4 ml para balões volumétricos de 50 ml denominados respectivamente como A1, A2, A3, conforme descrito na Tabela 14. Completaram-se os volumes com HCl 0,1 mol l^{-1} a fim de se obter as concentrações teóricas finais de 0,48 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 0,72 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 1,08 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Tabela 14 – Preparo das soluções para o teste de exatidão do itraconazol nas concentrações teóricas a 80%.

Balões (50 ml)	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração teórica final	Balões (50 ml)	Volume da solução de itraconazol amostra	Concentração teórica final
	(ml)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)		(ml)	($\mu\text{g ml}^{-1}$)
R1	3,0	0,6	A1	2,4	0,48
R2	4,5	0,9	A2	3,6	0,72
R3	6,75	1,35	A3	5,4	1,08

Preparo do ensaio a 100% da concentração de trabalho

Para o preparo das soluções da SQR do itraconazol nas concentrações de trabalho ($0,6$; $0,9$; $1,35 \mu\text{g ml}^{-1}$), pesou-se a quantidade equivalente a 25 mg da SQR de itraconazol, e transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano e completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução estoque com concentração final de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Transferiu-se volumetricamente 1 ml desta solução estoque para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, para obter uma solução de trabalho de concentração final de $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$. A partir desta solução de trabalho transferiram-se alíquotas de 3,0; 4,5; e 6,75 ml para balões volumétricos de 50 ml denominados respectivamente como S1, S2, S3, conforme descrito na Tabela 15. Completou-se os volumes com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a fim de se obter as concentrações teóricas finais de $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$; $0,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $1,35 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Para o preparo das soluções amostra do itraconazol cápsulas nas concentrações de trabalho a 100% ($0,6$; $0,9$; $1,35 \mu\text{g ml}^{-1}$), determinou-se o peso médio de 20 cápsulas e transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para balão volumétrico de 250 ml. Adicionou-se 150 ml de HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ e deixou-se em ultra-som por 10 minutos obtendo-se assim uma solução estoque com concentração final de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Transferiu-se volumetricamente 10 ml desta solução estoque para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, para obter uma solução de trabalho de concentração final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. A partir desta solução de trabalho transferiram-se alíquotas de 3,0; 4,5; e 6,75 ml para

balões volumétricos de 50 ml denominados respectivamente como B1, B2, B3, conforme descrito na Tabela 15. Completou-se os volumes com HCl 0,1 mol l⁻¹ a fim de se obter as concentrações teóricas finais de 0,6 µg ml⁻¹; 0,9 µg ml⁻¹ e 1,35 µg ml⁻¹.

Tabela 15 – Preparo das soluções para o teste de exatidão do itraconazol nas concentrações teóricas a 100%.

Balões (50 ml)	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração teórica final	Balões (50 ml)	Volume da solução de itraconazol amostra	Concentração teórica final
	(ml)	(µg ml ⁻¹)		(ml)	(µg ml ⁻¹)
S1	3,0	0,6	B1	3,0	0,6
S2	4,5	0,9	B2	4,5	0,9
S3	6,75	1,35	B3	6,75	1,35

Preparo do ensaio a 120% da concentração de trabalho

Para o preparo das soluções da SQR do itraconazol nas concentrações de trabalho (0,6; 0,9; 1,35 µg ml⁻¹), pesou-se a quantidade equivalente a 25 mg da SQR de itraconazol, e transferiu-se para balão volumétrico de 25 ml, adicionou-se 1 ml de diclorometano e completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução estoque com concentração final de 1000 µg ml⁻¹. Transferiu-se volumetricamente 1 ml desta solução estoque para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹, para obter uma solução de trabalho de concentração final de 10 µg ml⁻¹. A partir desta solução de trabalho transferiu-se alíquotas de 3,0; 4,5; e 6,75 ml para balões volumétricos de 50 ml denominados respectivamente como T1, T2, T3, conforme descrito na Tabela 16. Completaram-se os volumes com HCl 0,1 mol l⁻¹ a fim de se obter as concentrações teóricas finais de 0,6 µg ml⁻¹; 0,9 µg ml⁻¹ e 1,35 µg ml⁻¹.

Para o preparo das soluções amostra do itraconazol cápsulas nas concentrações de trabalho a 120% (0,72; 1,08; 1,62 µg ml⁻¹), determinou-se o peso médio de 20 cápsulas e transferiu-se o equivalente a 25 mg de itraconazol para

balão volumétrico de 250 ml. Adicionou-se 150 ml de HCl 0,1 mol l⁻¹ e deixou-se em ultra-som por 10 minutos obtendo-se assim uma solução estoque com concentração final de 100 µg ml⁻¹. Transferiu-se volumetricamente 10 ml desta solução estoque para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 mol l⁻¹, para obter uma solução de trabalho de concentração final de 10 µg ml⁻¹. A partir desta solução de trabalho transferiram-se alíquotas de 3,6; 5,4; e 8,1 ml para balões volumétricos de 50 ml denominados respectivamente como C1, C2, C3, conforme descrito na Tabela 16. Completaram-se os volumes com HCl 0,1 mol l⁻¹ a fim de se obter as concentrações teóricas finais de 0,6 µg ml⁻¹; 0,9 µg ml⁻¹ e 1,35 µg ml⁻¹.

Tabela 16 – Preparo das soluções para o teste de exatidão do itraconazol nas concentrações teóricas a 120%.

Balões (50 ml)	Volume da solução de itraconazol SQR	Concentração teórica final	Balões (50 ml)	Volume da solução de itraconazol amostra	Concentração teórica final
	(ml)	(µg ml ⁻¹)		(ml)	(µg ml ⁻¹)
T1	3,0	0,6	C1	3,6	0,72
T2	4,5	0,9	C2	5,4	1,08
T3	6,75	1,35	C3	8,1	1,62

Cálculos :

Utilizou-se o ensaio microbiológico com, planejamento 3x3, para a determinação dos teores referente a cada concentração das amostras e a análise de variância ANOVA para verificar a validade de cada ensaio.

4.2.3.2.5 Especificidade

Para avaliar a atividade antifúngica exclusiva do itraconazol no método proposto realizou-se ensaios distintos utilizando somente o diluente (HCl 0,1 mol l⁻¹), e ensaios utilizando somente solução da SQR do itraconazol submetidas à

temperatura de 50 °C durante 72 horas. Comparativamente realizou-se em paralelo a análise desta mesma solução da SQR do itraconazol, através do método desenvolvido por CLAE para detectar alguma alteração no cromatograma desta solução antes e após a exposição à condição de calor. Estes ensaios visaram determinar uma possível atividade antifúngica do HCl 0,1 mol l⁻¹ e também capacidade de resposta do método microbiológico apresentar alguma alteração nas respostas dos halos de inibição caso fosse degradada a solução do itraconazol SQR.

4.2.3.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas modificações no método original, conforme descrito na Tabela 17.

Tabela 17 - Alterações efetuadas no método original para avaliar a robustez ensaio microbiológico por difusão em ágar.

Método original	Condição alterada
Concentração do inóculo: 1%	Concentrações: 0,8 e 1,2 %
Volume do meio: 8 ml	Volume do meio: 10 ml e 6 ml
Temperatura de incubação: 25 °C	Temperatura de incubação: 23 e 27 °C
HCl marca: MERCK	HCl marca: NUCLEAR

4.2.4 Análise comparativa dos métodos propostos

Os resultados obtidos nos ensaios quantitativos para o itraconazol cápsulas através dos diferentes métodos empregados, foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), a fim de determinar a possível existência de diferenças significativas entre os métodos utilizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação da metodologia através da espectrofotometria na região do ultravioleta

5.1.1 Método espectrofotométrico

Os métodos analíticos empregados na quantificação dos fármacos podem ser divididos em clássicos e instrumentais. Os últimos baseiam-se em princípios ópticos, eletrônicos ou térmicos, apresentando algumas vantagens sobre os clássicos tais como: tempo de análise e melhor sensibilidade.

A espectrofotometria na região do ultravioleta (200 a 400 nm), representa um dos métodos instrumentais mais empregados, em razão da maioria das substâncias apresentarem absorção nessa região. Os grupamentos responsáveis pela absorção no ultravioleta são chamados cromóforos e são caracterizados principalmente por insaturações e grupamentos carbonílicos (KOROLKOVAS, 2006).

Muitos solventes estão disponíveis para auxiliar as análises na região do ultravioleta e as escolhas dos mesmos devem ser baseadas na toxicidade, custo e solubilidade adequada da substância a ser analisada (SENA *et al.*, 2007).

O itraconazol é substância praticamente insolúvel em água, porém apresenta fácil solubilidade em diclorometano, metanol e soluções aquosas ácidas (EUROPEAN Pharmacopoeia, 2007; KOKS *et al.*, 2002). Baseando-se nestas informações testaram-se diferentes tipos de solventes para conseguir solubilizar principalmente a SQR do itraconazol e as amostras, permitindo assim o desenvolvimento de um método de análise através da espectrofotometria na região do ultravioleta e demais métodos quantitativos descritos no trabalho.

5.1.2 Escolha do comprimento de onda

Após análise do espectro do itraconazol SQR, em HCl 0,1 mol l⁻¹, observou-se a absorção do itraconazol SQR em 256 nm, conforme demonstrado na Figura 3.

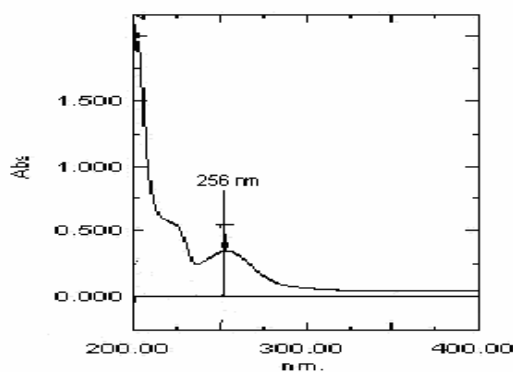


Figura 3 – Espectro de absorção do itraconazol SQR, para determinação do comprimento de onda ideal, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

5.1.3 Curva de Ringbom

Na Tabela 18, estão descritos os valores das absorbâncias obtidas na determinação da Curva de Ringbom, para as concentrações de 0,5 a 50 µg ml⁻¹ de itraconazol SQR, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

Tabela 18 – Resultados obtidos na determinação da Curva de Ringbom do itraconazol, pelo método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

Balão	Concentração (µg ml ⁻¹)	Logaritmo da Concentração	Absorbância	(100 – T%)
1	0,5	-0,30	0,014	3,17
2	1	0,00	0,024	5,38
3	2	0,30	0,052	11,28
4	4	0,60	0,114	23,09
5	6	0,78	0,172	32,70
6	8	0,90	0,226	40,57
7	10	1,00	0,285	48,12
8	12	1,08	0,334	53,66
9	14	1,15	0,376	57,93
10	16	1,20	0,44	63,69
11	18	1,26	0,493	67,86
12	20	1,30	0,543	71,36
13	22	1,34	0,602	75,00
14	24	1,38	0,662	78,22
15	26	1,41	0,711	80,55
16	28	1,45	0,764	82,78
17	30	1,48	0,823	84,97
18	32	1,51	0,877	86,73
19	34	1,53	0,919	87,95
20	36	1,56	0,976	89,43
21	38	1,58	1,031	90,69
22	40	1,60	1,104	92,13
23	42	1,62	1,143	92,81
24	44	1,64	1,235	94,18
25	46	1,66	1,263	94,54

A curva de Ringbom, obtida pela plotagem dos valores das absorbâncias, expressas em (100-T%), no eixo das ordenadas, e o logaritmo da concentração, no eixo das abscissas, encontra-se representada na Figura 4.

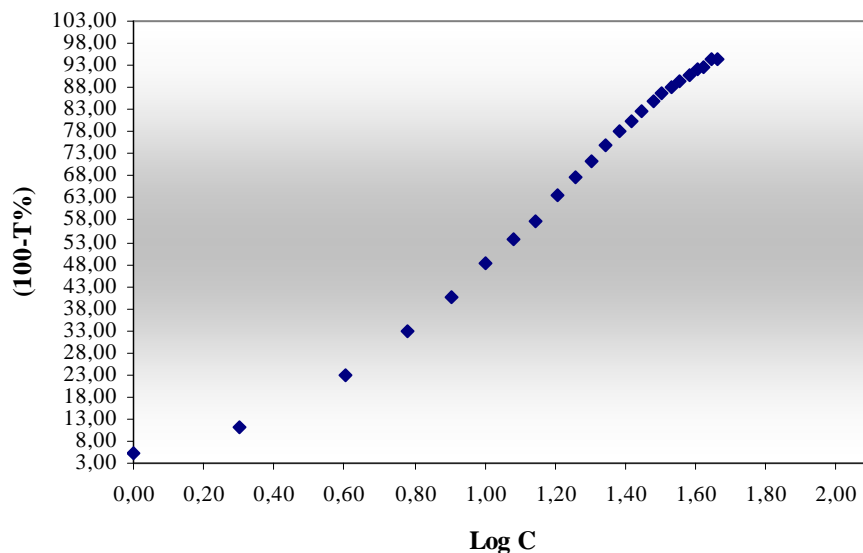


Figura 4 – Representação gráfica da Curva de Ringbom do itraconazol, por método espectrofotométrico, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹.

Verificou-se que a melhor linearidade e dose-resposta do itraconazol, em HCl 0,1 mol l⁻¹, estão entre as concentrações de 12 a 28 µg ml⁻¹, conforme demonstrado na Figura 4. Baseado nesses dados, optou-se por trabalhar na faixa de concentração de 16 a 24 µg ml⁻¹.

5.1.4 Curvas analíticas do método espectrofotométrico na região do ultravioleta

Para a realização das curvas analíticas foram utilizadas cinco concentrações, que variaram de 80 a 120% da concentração do teste. A análise de variância dos valores de absorbância absoluta, cujos elementos estão determinados na Tabela 19, demonstrou que o método foi capaz de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito.

Tabela 19 – Valores das absorvâncias obtidas na determinação da curva analítica do itraconazol SQR, pelo método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹.

Concentração $\mu\text{g ml}^{-1}$	Absorbância	Média \pm e.p.m	Desvio Padrão	DPR (%)
16	0,468	0,465 \pm 0,0018	0,0031	0,66
	0,464			
	0,462			
18	0,528	0,529 \pm 0,0010	0,0017	0,33
	0,528			
	0,531			
20	0,595	0,592 \pm 0,0015	0,0025	0,42
	0,590			
	0,592			
22	0,650	0,654 \pm 0,0023	0,0040	0,61
	0,658			
	0,654			
24	0,718	0,720 \pm 0,0008	0,0014	0,20
	0,720			
	0,721			

Os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica média, através da análise de variância (ANOVA), encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas na determinação da curva analítica média do itraconazol, por método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado*}
Entre doses	4	0,1209769	0,0302442	2452,23	4,53
Regressão linear	1	0,1209675	0,1209675	9808,17	5,99
Desvio de linearidade	3	0,0000094	0,0000031	0,2595	4,76
Resíduo	6	0,0000740	0,0000123		
Total	14	0,1210509			

* p = 0,05

A curva analítica média, cuja representação gráfica está indicada na Figura 5, apresenta regressão linear significativa para p = 0,05, sendo que não foi observado desvio significativo de linearidade, para p = 0,05. A curva apresenta coeficiente de correlação de 0,9999, com desvio padrão relativo médio de 0,44%. Esses dados demonstram que a curva pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa da substância.

A representação gráfica da curva analítica média e a equação da reta determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, estão representadas na Figura 5.

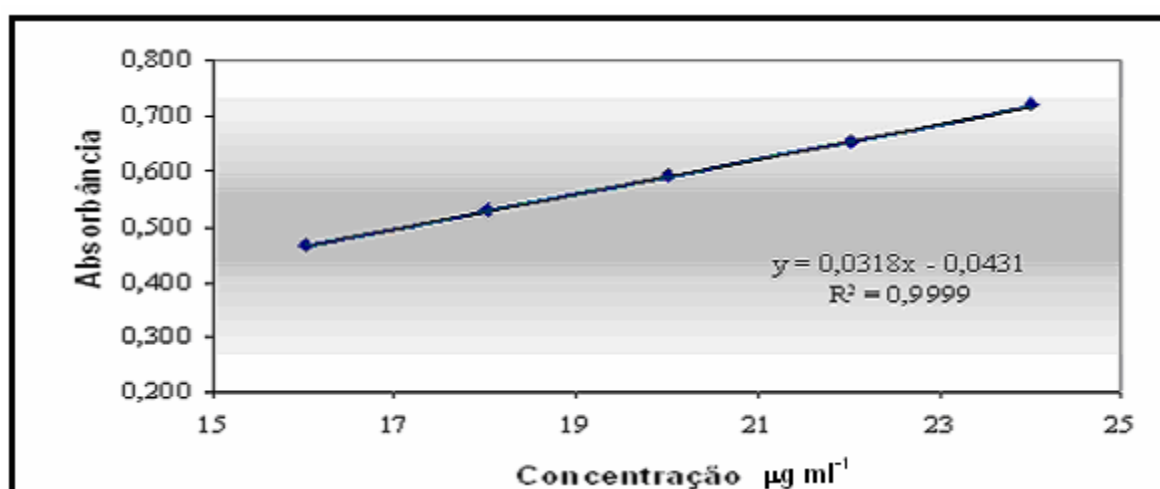


Figura 5 – Representação gráfica da curva analítica média do itraconazol, por método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

5.1.5 Precisão

A precisão do método analítico determina o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuada várias vezes em uma amostra homogênea. O valor de DPR (%), preconizado para este estudo é de 2%, segundo a THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2007), e de 5%, segundo a resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003).

A repetibilidade dos métodos espectrofotométricos em estudo foi avaliada através do doseamento de itraconazol cápsulas, em três concentrações diferentes, em um único dia (n=3), conforme descrito em 4.2.1.5.2.

Conforme descrito na Tabela 21, o valor médio foi de 100,08% e desvio padrão relativo de 0,79 %.

Tabela 21 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade de itraconazol cápsulas, por método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

Concentração da amostra	Absorbâncias	Teor (%)	Média ± desvio padrão	DPR (%)
16	0,460	99,03	99,88 ± 1,49	1,48
	0,473	101,59		
	0,460	99,03		
20	0,598	100,96	100,54 ± 0,48	0,48
	0,592	100,01		
	0,596	100,64		
24	0,715	99,48	99,83 ± 0,40	0,40
	0,717	99,75		
	0,721	100,27		
Média			100,08	0,79
ANOVA		<i>F</i> calculado		<i>F</i> tabelado*
Entre concentrações		0,5373		5,1432

*p = 0,05

Os resultados obtidos na determinação da repetibilidade foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), a fim de determinar se existe diferença significativa entre as respostas encontradas nas diferentes concentrações analisadas. Conforme demonstrado na Tabela 21, o $F_{calculado}$ foi menor do que o $F_{tabelado}$, indicando que não há diferença significativa entre os resultados encontrados ($p = 0,05$), esta avaliação foi realizada no sentido de complementar a avaliação do ensaio, porém cabe ressaltar que os critérios que estabelecem o aceite da precisão do método estão preconizados na Resolução RE nº 899 anteriormente citada, aonde estabelece como critério de aceite o limite máximo de 5% para a variação entre os valores do ensaio.

A precisão intermediária foi determinada em três dias diferentes por dois analistas. Os valores experimentais obtidos para as determinações da precisão intermediária de itraconazol cápsulas encontram-se descritos na Tabela 22. O desvio padrão relativo médio, para este ensaio foi de 0,49%.

Tabela 22 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de itraconazol cápsulas, por método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl $0,1 \text{ mol}^{-1}$ como diluente.

Dia	n	Analista 1		Analista 2		Média \pm desvio padrão do dia	DPR do dia (%)
		Teor da amostra ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(%)	Teor da amostra ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(%)		
1	1	20,13	100,64	20,19	100,96	100,54 \pm 0,6462	0,47
	2	20,07	100,33	20,19	100,96		
	3	19,94	99,70	20,13	100,64		
2	1	19,81	99,07	19,94	99,70	99,93 \pm 0,6588	0,66
	2	19,91	99,54	20,19	100,96		
	3	20,07	100,33	20,00	100,01		
3	1	19,91	99,54	20,03	100,17	100,01 \pm 0,3150	0,31
	2	20,00	100,01	20,00	100,01		
	3	20,10	100,48	19,97	99,85		
Média do analista		99,96		100,36			
D.P do analista		0,5282		0,5150			
DPR do analista		0,5304		0,3307			
DPR médio dos ensaios							0,48
ANOVA				$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}^*		
Inter-dias				2,6157	3,6823		
Entre analistas				1,6941	4,4940		
Inter-dias analista 1				0,8940	5,1432		
Inter-dias analista 2				3,5260	5,1432		

* $p = 0,05$

Os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), a fim de determinar se houve diferença significativa entre as respostas encontradas nos diferentes dias, analistas e entre o mesmo analista em dias diferentes. Conforme demonstrado na Tabela 22, os valores encontrados para os $F_{\text{calculado}}$ foram menores do que os valores F_{tabelado} , indicando que não há diferença significativa entre os resultados encontrados para $p = 0,05$.

5.1.6 Exatidão

A exatidão do método analítico representa o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito. Os resultados experimentais médios, obtidos para os testes de exatidão, por recuperação, estão descritos na Tabela 23 e representados graficamente na Figura 6. Os limites preconizados para este teste são de 98% a 102% (BRASIL, 2003; USP, 2007; AOAC, 1990).

Tabela 23 – Valores experimentais médios obtidos para o teste de exatidão do itraconazol, por método espectrofotométrico no comprimento de onda de 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

Balão (50 ml)	Quantidade de solução padrão adicionada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Média da quantidade de padrão recuperado*	
		($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(%)
R1	15	14,98	99,89
R2	20	20,13	100,67
R3	25	25,15	100,60
R4	30	30,17	100,56

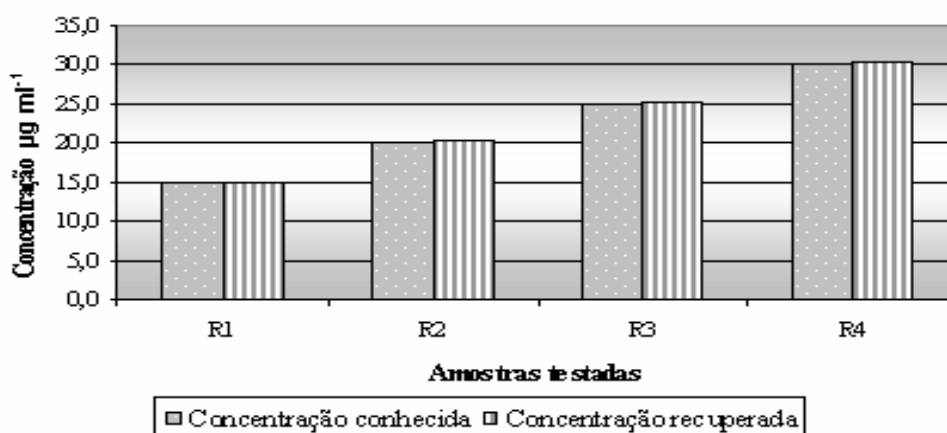


Figura 6 - Representação gráfica do teste de exatidão de itraconazol cápsulas, por método espectrofotométrico a 256 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que para todas as concentrações experimentais utilizadas os teores percentuais de recuperação encontram-se dentro dos limites especificados, o que permite concluir a adequada exatidão do método.

5.1.7 Especificidade

O teste de especificidade visa assegurar que o procedimento analítico não é afetado pela presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na amostra sob análise.

O espectro obtido na análise da solução placebo apresentou através do método espectrofotométrico, no comprimento de onda de 256 nm uma absorvância de 0,006, conforme exibido na Figura 7. Os espectros do itraconazol SQR, itraconazol cápsulas e amostra simulada dos excipientes (placebo), nas mesmas condições analíticas, estão demonstrados nas figuras a seguir :

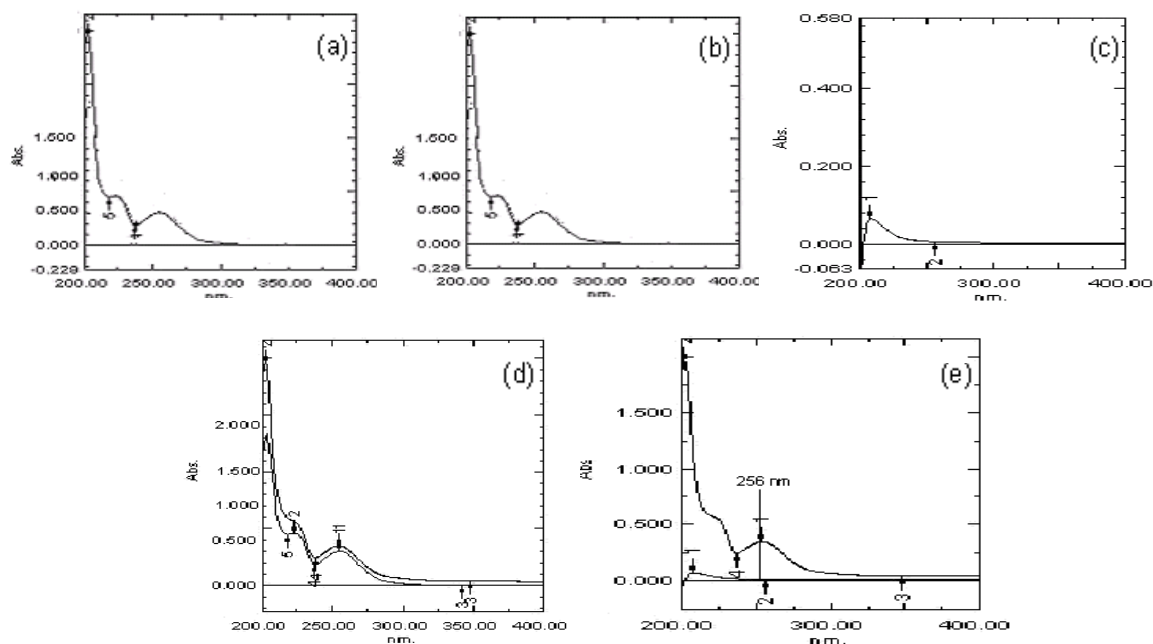


Figura 7– Espectros de absorção (a) Itraconazol SQR; (b) Itraconazol cápsulas; (c) Amostra simulada de excipientes (Placebo); (d) Itraconazol SQR e Itraconazol cápsulas; (e) Itraconazol SQR e amostra simulada de excipientes (Placebo).

De acordo com os espectros obtidos é possível verificar que os excipientes não possuem absorvância significativa no comprimento de onda de 256 nm.

5.1.8 Robustez

Os resultados obtidos no ensaio de robustez alterando os parâmetros de comprimento de onda, concentração e diferentes fabricantes de HCl concentrado apresentaram variações inferiores a 1% entre os teores obtidos.

Para o parâmetro de avaliação de estabilidade frente à luz ambiente e ultravioleta observou-se que as soluções sob análise não apresentaram variações significativas (<1%) em seus teores nas primeiras 4 horas, porém após nova determinação após 5 e 72 horas, observou-se redução em seus teores acima de 2 e 4% respectivamente.

Sendo assim, o método apresentou robustez adequada para pequenas alterações em sua execução. A partir dos resultados obtidos nos testes de estabilidade através da exposição à luz, é recomendável a análise destas soluções em um prazo não superior a 4 horas após o seu preparo, estando estas soluções expostas a alguma fonte de luz.

5.2 Validação da metodologia através da CLAE

5.2.1 Método cromatográfico

A cromatografia a líquido é uma das técnicas mais eminentes de instrumentação analítica na atualidade, devido às características que ela apresenta como: boa capacidade de analisar estruturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, compostos iônicos e ionizáveis, substâncias de baixa e alta massa molar sem apresentar problemas de decomposição térmica ou química, além da possibilidade de automatização (WANG, 2007).

O processo cromatográfico baseia-se na distribuição das espécies químicas a serem analisadas entre duas fases, sendo que uma permanece estacionária, sendo esta chamada de fase estacionária e a outra move-se através dela e, por isso, é chamada de fase móvel. A separação dos componentes da amostra ocorre pela diferença do coeficiente de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária (WANG, 2007).

5.2.2 Escolha do comprimento de onda

Determinou-se o comprimento de onda em 254 nm para a detecção das cápsulas de itraconazol.

5.2.3 Curva analítica

Para a realização das curvas analíticas foram utilizadas cinco concentrações, que variaram de 60 a 140% da concentração do teste. A análise de variância (ANOVA) e os valores das áreas médias obtidas, exibidas na Tabela 24, demonstram que o método foi estatisticamente significativo e capaz de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito.

Tabela 24 – Valores das áreas obtidas na determinação da curva analítica do itraconazol SQR, através da CLAE.

Concentração $\mu\text{g ml}^{-1}$	Área	Média \pm e.p.m	Desvio Padrão	DPR (%)	
6	683026	683086 \pm 2250	3897	0,57	
	679219				
	687012				
8	924499	916966 \pm 4874	8442	0,92	
	918559				
	907842				
10	1140458	1144525 \pm 10427	18060	1,58	
	1128856				
	1164272				
12	1401946	1372655 \pm 15448	26756	1,95	
	1349499				
	1366520				
14	1603390	1613311 \pm 5668	9817	0,61	
	1613524				
	1623020				
Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	<i>F</i> calculado	<i>F</i> tabelado*
Entre doses	4	158647165108	396617912774	1964,90	4,53
Regressão linear	1	158514781400	1585147814070	7853,03	5,99
Desvio de linearidade	3	1323837028	1585147814070	2,19	4,76
Resíduo	6	1211110747	201851791		
Total	14	1,58768E+12			

*p = 0,05

A curva analítica, cuja representação gráfica está indicada na Figura 8, apresenta diferença entre concentrações e regressão linear significativas, e desvio

de linearidade não significativo, para $p = 0,05$. O coeficiente de correlação da curva analítica média foi de 0,9999, com desvio padrão relativo médio de 1,13%. Esses dados demonstram que esta curva analítica média pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa da substância.

A representação gráfica da curva analítica e a equação da reta, determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, está representada na Figura 8.

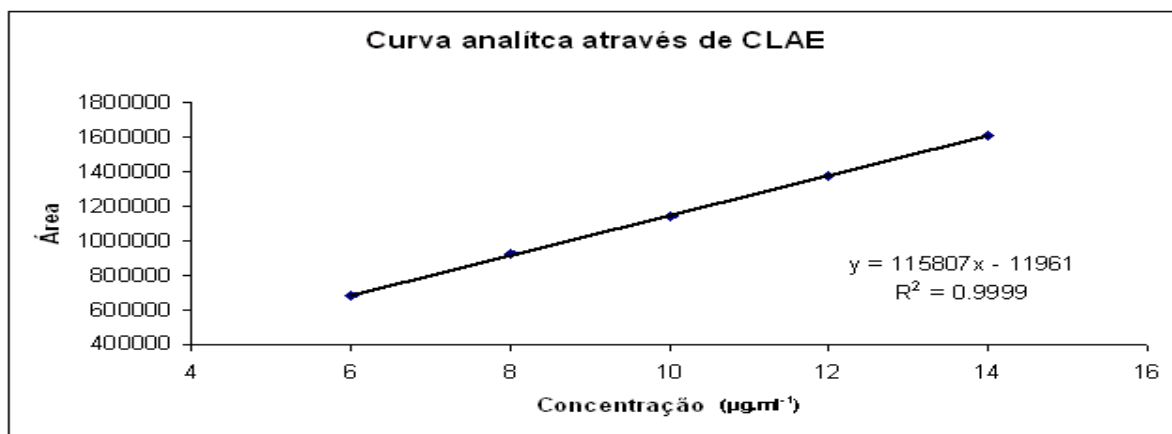


Figura 8 – Representação gráfica da curva analítica do itraconazol, através da CLAE com detecção em 254 nm, utilizando HCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ como diluente.

O método apresentou ainda, linearidade para concentrações superiores entre 60 e $120 \mu\text{g ml}^{-1}$, com coeficiente de correlação adequado.

5.2.4 Precisão

A repetibilidade do método cromatográfico (CLAE) em estudo, foi avaliada através do doseamento de itraconazol cápsulas, em três concentrações diferentes, em um único dia ($n=3$), conforme descrito em 4.2.2.5.2.

Conforme a Tabela 25, o valor médio foi de 100,87% e desvio padrão relativo de 0,74%.

Tabela 25 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade de itraconazol cápsulas, através da CLAE com detecção na região do ultravioleta em 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente final.

Concentração da amostra	Área	Teor (%)	Média ± DP	DPR (%)
6	691141	101,19	100,07 ± 0,9751	0,97
	680196	99,61		
	678787	99,41		
10	1165061	101,64	101,58 ± 0,2205	0,22
	1166617	101,77		
	1161655	101,34		
14	1606928	99,85	100,96 ± 1,0355	1,02
	1640073	101,90		
	1627669	101,13		
Média			100,87	0,74
ANOVA		<i>F</i> calculado		<i>F</i> tabelado*
Entre concentrações		2,5130		5,1432

* p = 0,05

Os resultados obtidos na determinação da repetibilidade foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), a fim de determinar se existe diferença significativa entre as respostas encontradas nas diferentes concentrações analisadas. Conforme demonstrado na Tabela 25, o *F* calculado foi menor do que o *F* tabelado, indicando que não há diferença significativa entre os resultados encontrados para p = 0,05.

A precisão intermediária foi determinada em três dias diferentes por dois analistas. Os valores experimentais obtidos para as determinações da precisão intermediária de itraconazol cápsulas encontram-se descritos na Tabela 26. O desvio padrão relativo médio dos teores, para este ensaio foi de 0,41%.

Tabela 26 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de itraconazol cápsulas, através da CLAE.

Dia	n	Analista 1		Analista 2		Média \pm e.p.m	DPR do dia (%)
		Teor da amostra ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(%)	Teor da amostra ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	(%)		
1	1	10,17	101,70	10,11	101,06	101,10 \pm 0,3123	0,11
	2	10,09	100,91	10,12	101,17		
	3	10,09	100,87	10,09	100,93		
2	1	10,05	100,52	10,03	100,25	100,60 \pm 0,7671	0,76
	2	10,04	100,42	10,21	102,05		
	3	10,06	100,60	9,98	99,78		
3	1	10,17	101,70	10,08	100,85	101,53 \pm 0,3794	0,37
	2	10,18	101,78	10,19	101,91		
	3	10,16	101,57	10,14	101,41		
Média dos Teores e DPR						101,18	0,41
Média do analista			101,12	101,04			
D.P do analista			0,5633	0,7250			
DPR do analista			0,5571	0,7175			
ANOVA				F calculado		F tabelado*	
Entre analistas				0,5001		4,4940	

*p = 0,05

Os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), a fim de determinar se existe diferença significativa entre as respostas encontradas entre os analistas em dias diferentes. Conforme demonstrado na Tabela 26, o valor encontrado para o $F_{\text{calculado}}$ foram menores do que os valores F_{tabelado} , indicando que não há diferença significativa entre os resultados encontrados para $p = 0,05$.

5.2.5 Exatidão

A exatidão do método analítico proposto foi determinada através do teste de recuperação do itraconazol SQR. Neste teste a porcentagem de recuperação ficou

dentro dos limites considerados aceitáveis para a recuperação. Os resultados experimentais obtidos, estão descritos na Tabela 27 e representados graficamente na Figura 9. Os limites preconizados para este teste são de 98% a 102% (BRASIL, 2003; USP, 2007).

Tabela 27 – Valores experimentais obtidos para o teste de exatidão do itraconazol, através da CLAE no comprimento de onda de 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como solução final.

Balão (50 ml)	Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média da quantidade de padrão recuperado*	
		($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(%)
R1	1,5	4,96	99,36
R2	2,5	10,18	101,80
R3	3,5	11,95	99,59
R4	5,0	15,23	101,55

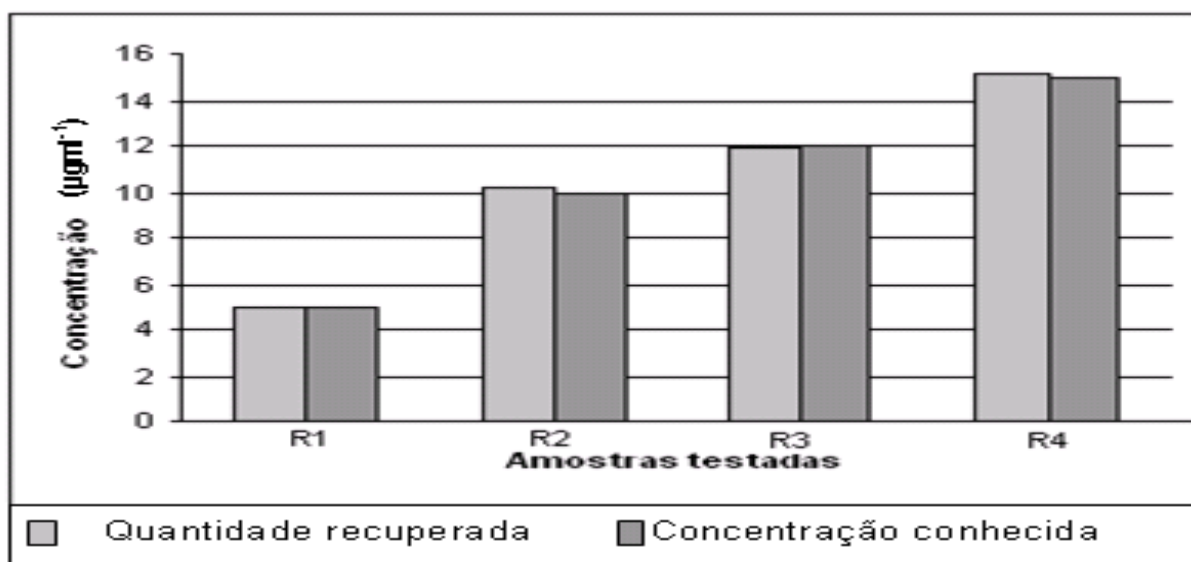


Figura 9 – Representação gráfica do teste de exatidão de itraconazol cápsulas, através de CLAE com detecção em 254 nm, utilizando HCl 0,1 mol l⁻¹ como diluente.

5.2.6 Especificidade

Os cromatogramas obtidos através dos ensaios para determinação da especificidade do método encontram-se exibidos na Figura 10. A partir da injeção dos solventes e amostra simulada do placebo, verifica-se que estes não demonstraram interferências significativas no tempo de retenção do pico referente ao itraconazol.

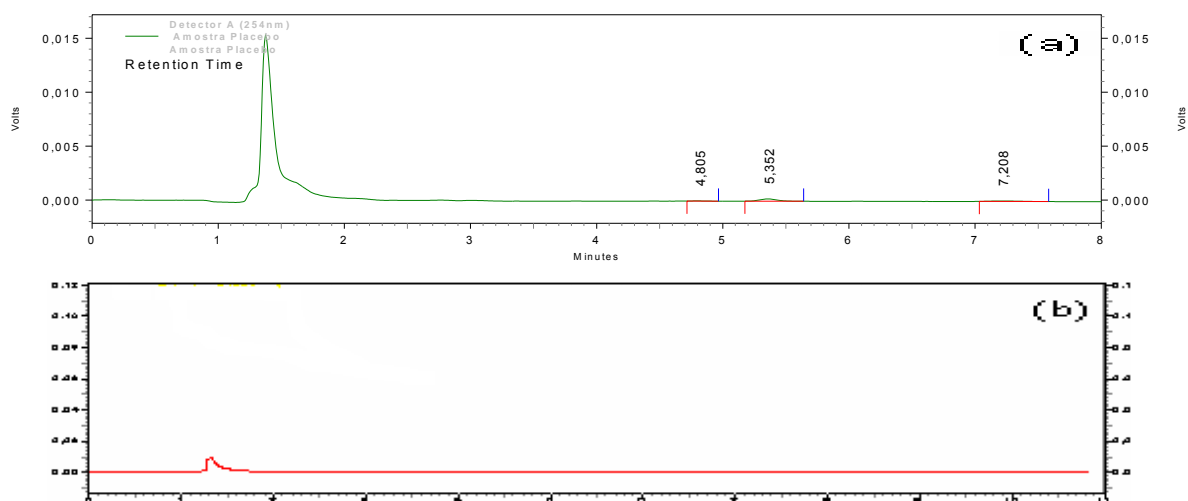


Figura 10 – Representação gráfica dos cromatogramas obtidos no ensaio de especificidade. (a) Solução da amostra simulada do placebo, (b) Cromatograma obtido através da injeção utilizando somente o HCl 0,1 mol l⁻¹.

Ainda, através dos estudos de degradação forçada do itraconazol SQR na concentração final de 10 µg ml⁻¹ em HCl 0,1 mol l⁻¹, pode-se verificar algumas alterações nos cromatogramas obtidos em hidrólise ácida por 4 horas em temperatura elevada, em relação ao cromatograma obtido com a injeção da amostra no tempo zero, apresentando redução da área do pico referente ao itraconazol SQR e o aparecimento de um outro pico que pode tratar-se de algum produto de degradação.

Na hidrólise alcalina, verificou-se a precipitação irreversível do itraconazol devido as suas características físico-químicas de solubilidade em meio ácido, o que impossibilitou o preparo da solução da SQR nesta condição.

Após 4 horas sob a luz ultravioleta, não houve redução significativa da área do pico referente a SQR do itraconazol ($< 0,5\%$), porém apresentou uma pequena alteração no tempo de retenção com a sua detecção após alguns segundos de diferença em relação injeção inicial (tempo zero).

Na oxidação química com H_2O_2 10 Vol., por 4 horas, observou-se que o pico referente ao itraconazol SQR praticamente desapareceu e, ainda, apresentou algumas alterações no cromatograma, com picos adicionais próximos aos tempos de retenção aonde ocorria a detecção dos solventes da fase móvel.

Baseando-se nos resultados obtidos permite-se avaliar que o método utilizado apresenta especificidade adequada, devido a sua capacidade de detectar o itraconazol na presença dos excipientes da formulação e possíveis alterações nos cromatogramas do itraconazol SQR em condições forçadas de degradação.

De acordo com os resultados, recomenda-se utilizar as soluções logo após o preparo ou armazenar sob refrigeração em frascos hermeticamente fechados.

Os cromatogramas obtidos através dos ensaios de degradação forçada do método encontram-se exibidos na Figura 11.

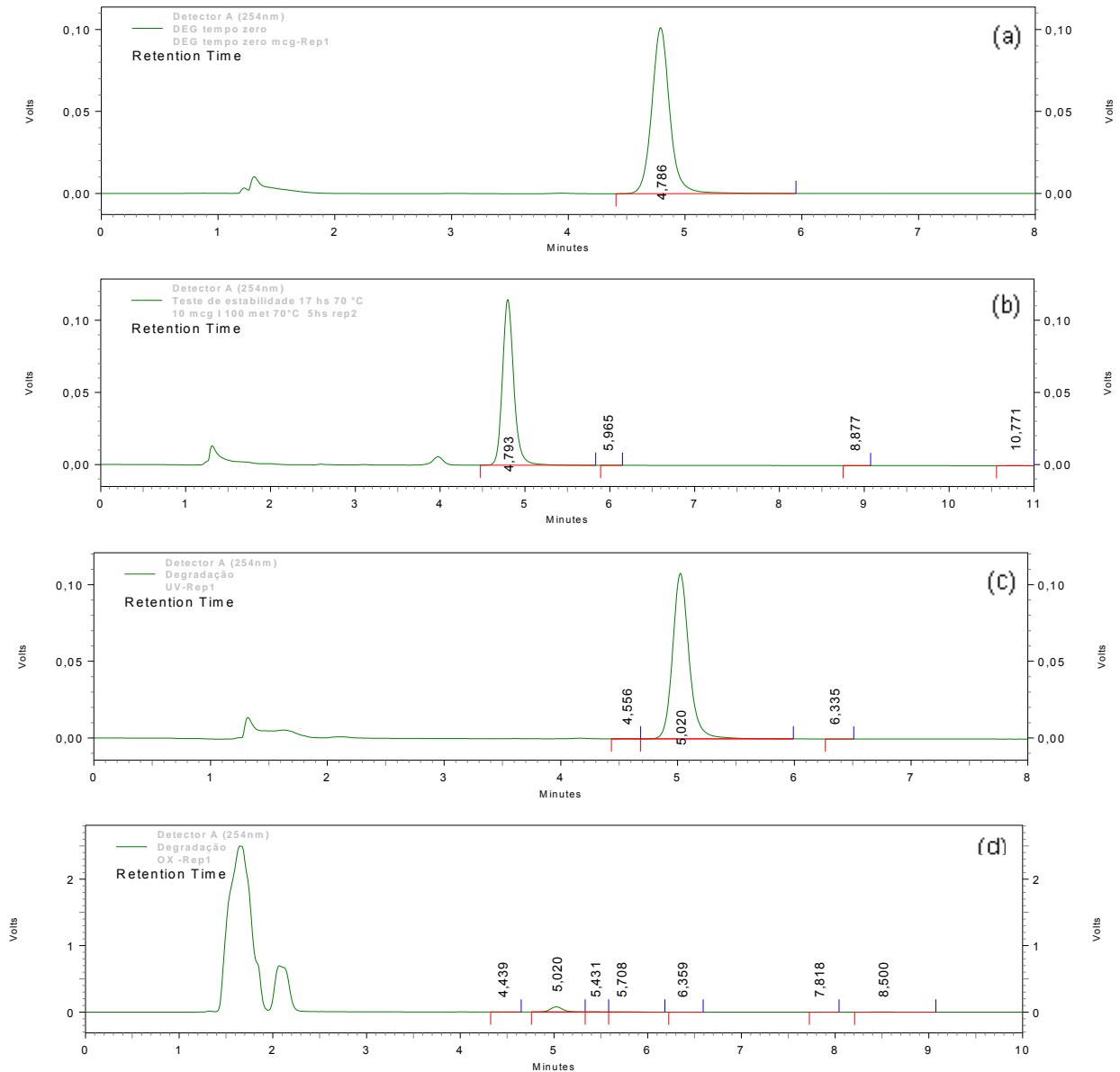


Figura 11 – Cromatogramas da degradação forçada, (a) Cromatograma referente à injeção da amostra no tempo inicial (tempo zero), (b) Degradação em hidrólise ácida, (c) Degradação fotolítica, (d) Degradação oxidativa.

5.2.7 Robustez

Após as alterações realizadas nas condições originais do método verificou-se que a variação no comprimento de onda e temperatura do forno, não demonstraram influências significativas nos resultados das áreas do pico do itraconazol.

A alteração na vazão e proporção na fase móvel resultaram apenas em pequenas alterações nos valores das áreas do pico do itraconazol e no seu tempo de retenção, devido ao fato da variação da interação amostra e fase estacionária em função das diferentes polaridades da fase.

5.3 Validação da metodologia através do Ensaio Microbiológico

O uso de ensaios biológicos em condições devidamente caracterizadas utilizando cepas de microrganismos de referência permite a avaliação da potência de fármacos antibióticos, através da comparação de diferentes concentrações de uma amostra e sua substância química de referência, capazes de inibir o crescimento de um microrganismo sensível aos mesmos (USP, 2007)

A variabilidade dos reativos biológicos tornam imprescindíveis o uso de padrões de referência adequados e o emprego de métodos estatísticos para os delineamentos experimentais e análise de resultados,

Os ensaios de potência por difusão em ágar encontram-se descritos em diferentes compêndios oficiais como as Farmacopéias Brasileira e Britânica.

A determinação da potência dos antimicrobianos é importante no controle e na garantia da qualidade das preparações farmacêuticas e faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos práticos e econômicos que possam ser validados e aplicados no doseamento desses fármacos (ESMERINO et. al., 2004).

5.3.1 Intervalo de trabalho

A escolha do intervalo de trabalho foi estabelecida em função do tamanho dos halos de inibição do crescimento do microrganismo, assim como a linearidade das respostas obtidas a partir de diferentes concentrações com a SQR itraconazol. Testou-se a faixa entre 0,4 e 2,02 $\mu\text{g ml}^{-1}$, estabelecendo-se os pontos 0,6; 0,9 e 1,35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para a curva analítica, devido aos halos obtidos nestas concentrações apresentarem limitada inibição de crescimento na placa de Petri, fácil determinação

do diâmetro e adequada correlação linear entre o tamanho médio destes halos e o logaritmo das doses correspondentes.

5.3.2 Linearidade

Os ensaios foram realizados em três dias diferentes com novos inóculos e soluções de trabalho totalizando 10 ensaios, os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 28.

Tabela 28 –Diâmetros médios dos halos de inibição, obtidos para determinação da curva analítica do itraconazol SQR, através do ensaio microbiológico.

Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Diâmetros médios dos halos de inibição*			Média \pm desvio padrão	DPR%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
0,6	18,51			18,68 \pm 0,252	1,35
	18,50	19,10	18,55		
	18,58	18,79	18,53		
	19,17	18,58	18,53		
0,9	20,14			20,32 \pm 0,167	0,82
	20,18	20,47	20,41		
	20,02	20,34	20,32		
	20,57	20,37	20,43		
1,35	21,35			22,01 \pm 0,394	1,79
	21,80	22,14	22,34		
	21,31	22,19	22,27		
	22,17	22,17	22,41		

* Cada valor corresponde à média de seis placas

A curva analítica e a equação da reta calculada através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se graficamente representadas na Figura12.

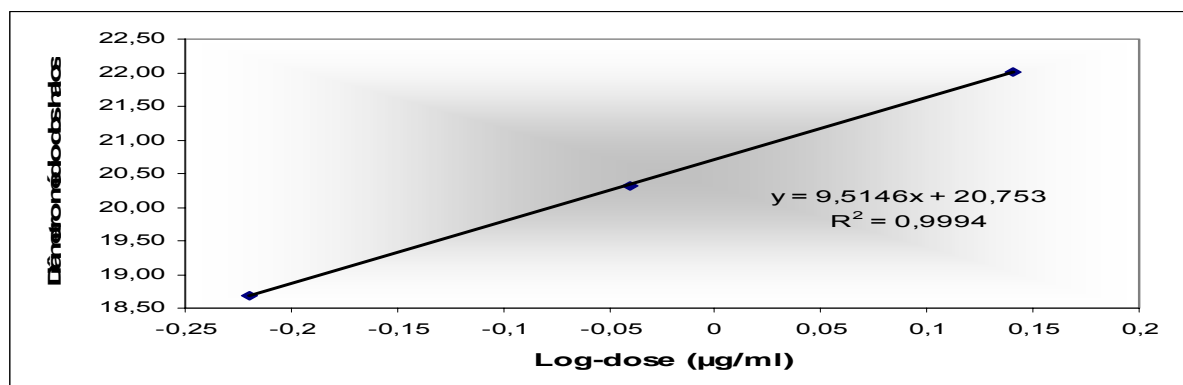


Figura 12 – Representação gráfica da curva analítica do itraconazol SQR, obtida através de Ensaio Microbiológico.

A curva analítica determinada a partir do logaritmo das concentrações das doses ($\mu\text{g ml}^{-1}$) versus o diâmetro médio dos halos de inibição de crescimento (mm) demonstrou linearidade satisfatória na faixa de $0,6 - 1,35 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 12) com um coeficiente de correlação ($r = 0,9994$), superior a especificação mínima para o coeficiente de correlação segundo a RE n° 899 ($r = 0,99$).

5.3.3 Precisão

A determinação da precisão do método com relação a repetibilidade foi avaliada através de seis determinações das amostras das cápsulas contendo itraconazol na concentração de $0,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ nas mesmas condições de ensaio em um único dia. Os valores obtidos no ensaio de repetibilidade encontram-se descritos na tabela 29.

Tabela 29 - Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade do ensaio microbiológico com itraconazol.

Teor declarado (mg)	Teor encontrado (mg)	Pureza (%)	Limite de confiança ($P=0,05$)	DPR (%)
100 mg	100.44	100.44	97,75-103,20	0.18
	100.25	100.25	96,75-103,88	
	100.20	100.20	96,58-103,95	
	99.99	99.99	98,30-101,71	
	100.01	100.01	99,19-100,84	
	100.00	100.00	97,35-102,73	

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a atividade biológica (potência) encontrada para o itraconazol variou 99,99 a 100,44%, com um desvio padrão relativo (DPR) de 0,18%, estando dentro do limite variação máximo de 5% preconizado para validação de métodos analíticos quantitativos, segundo a RE n° 899 (Brasil, 2003).

Precisão intermediária

Para a avaliação da precisão intermediária, determinou-se a solução amostra inter-dias (Tabela 30) e inter-analistas (Tabela 31), obtendo-se valores de DPR de 0,31% e 0,23% respectivamente.

Tabela 30- Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão inter-dias do ensaio microbiológico do itraconazol.

Amostra	Dia	Pureza (%)	Limite de confiança ($P=0,05$)	Média (%)	DP	DPR (%)
A	1	99.99	98,30-101,71	100.00	0.0100	0.01
		100.01	99,19-100,84			
		100.00	97,35-102,73			
A	2	100.76	96,36-105,36	100.41	0.3318	0.33
		100.10	95,02-105,45			
		100.37	95,73-105,24			
Média do ensaio		100.21				
DP do ensaio		0.31				
DPR do ensaio		0.31				

Tabela 31- Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão inter-analistas do ensaio microbiológico do itraconazol cápsulas

Amostra	Analista	Pureza (%)	Limite de confiança ($P=0,05$)	Média (%)	DP	DPR (%)
A	1	100.44	97,75-103,20	100.30	0.12	0.13
		100.25	96,75-103,88			
		100.20	96,58-103,95			
A	2	100.03	94,70-105,65	99.93	0.14	0.14
		99.77	95,65-104,06			
		100.00	96,13-104,03			
Média do ensaio		100.12				
DP do ensaio		0.23				
DPR do ensaio		0.23				

Através dos valores obtidos nos ensaios de precisão do método proposto, determinou-se a sua reprodutibilidade e baixa variação entre os resultados, cumprindo assim com as especificações da legislação vigente, que determina que as variações devem ser inferiores a 5% para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003).

Na figura 13 encontra-se descritos os resumos dos resultados encontrados para potência média e seus respectivos desvios padrão no ensaio de precisão.

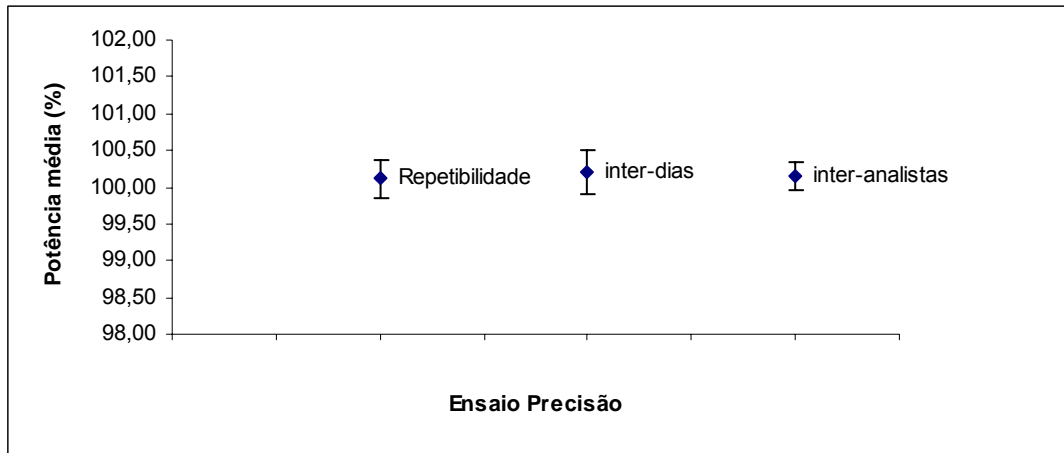


Figura 13 – Potência média e respectivos desvios padrão para precisão do ensaio microbiológico.

5.3.4 Exatidão

Os valores obtidos no ensaio de exatidão do ensaio microbiológico, encontram-se descritos na Tabela 33

Tabela 32 – Resultados obtidos no estudo da exatidão do ensaio microbiológico do itraconazol

Potência Teórica (%)	Ensaio	Potência Estimada (%)	Média	Exatidão Média (%)	DPR
80	1	80,46	80,72	100,9	0,24
	2	80,78			
	3	80,92			
	4	80,73			
100	1	100,92	100,84	100,84	0,33
	2	101,28			
	3	100,54			
	4	100,65			
120	1	120,28	120,22	100,18	0,71
	2	119,12			
	3	121,21			
	4	120,27			
Média				100,64	0,42

A partir dos resultados obtidos nos três níveis de potência 80; 100 e 120% em relação às três concentrações de trabalho, obtiveram-se um valor médio de exatidão de 100,64%, com desvio padrão relativo de 0,42% (Tabela 33), demonstrando assim que os resultados encontrados no bioensaio estão próximos aos reais valores de potência estimados com estas soluções de trabalho, confirmando assim a exatidão do método utilizado.

5.3.5 Especificidade

De acordo com a Figura 14 verificou-se que o ensaio utilizando apenas o diluente (HCl 0,1 mol l⁻¹) não apresentou nenhuma atividade antifúngica aparente para o microrganismo utilizado no ensaio.

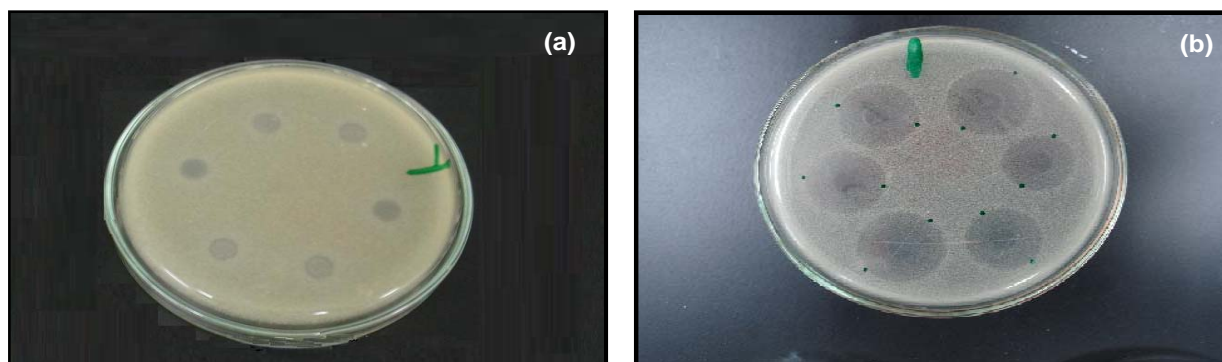


Figura 14 – Representação gráfica dos ensaios de especificidade somente com o diluente HCl 0,1 M mol l⁻¹ (a), representação gráfica dos halos de inibição obtidos nos Ensaio microbiológicos de difusão em ágar cilindro em placas (b).

A partir dos resultados comparativos obtidos a partir dos ensaios quantitativos de potência microbiológica e CLAE com a utilização da solução da SQR do itraconazol, submetida à condição de degradação forçada em hidrólise ácida conforme as condições descritas no ensaio de especificidade 4.2.2.5.4, possibilitaram a verificação da especificidade do método, através visualização de uma redução significativa nos tamanhos dos halos de inibição e alterações no cromatograma do solução inicialmente utilizada, apresentando detecção de um novo pico no cromatograma e a redução da área do pico referente ao itraconazol.

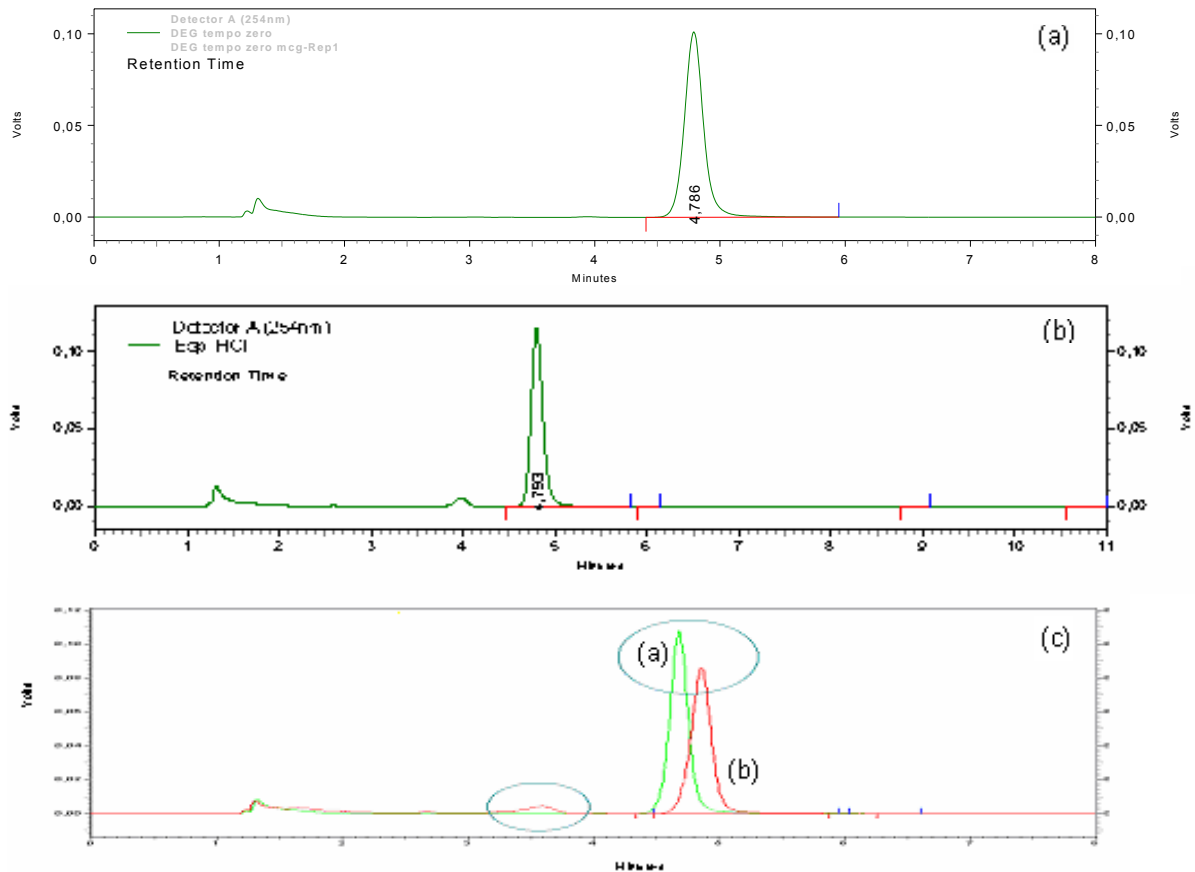


Figura 15 – Representação gráfica dos cromatogramas obtidos com a solução utilizada no ensaio de especificidade do método microbiológico, comparando com o método através da CLAE, (A) Cromatograma referente à solução injetada antes da realização da condição de degradação em hidrólise ácida, (B) Cromatograma obtida com a solução após as condições de degradação em hidrólise ácida, (C) Sobreposição dos cromatogramas obtidos antes e depois da condição de degradação anteriormente citadas.

5.3.6 Robustez

Alguns dos resultados obtidos experimentalmente através de deliberadas modificações nos parâmetros do método conforme descrito na tabela 17, estão representados na Tabela 33.

Tabela 33- Condições avaliadas no teste de robustez do método microbiológico

Condição	Parâmetros	Potência encontrada	Limites de confiança	Média	DP	DPR
Concentração do inóculo	0,8 %	100,36	92,52-108,85	100,29	0,0702	0,07
		100,22	96,20-104,40			
		100,30	93,08-108,10			
Concentração do inóculo	1,2%	100,01	97,37-102,73	100,18	0,1504	0,15
		100,26	97,77-102,82			
		100,28	97,09-103,58			
Camada	10 ml	99,88	96,03-103,88	100,10	0,1986	0,20
		100,26	97,77-102,82			
		100,77	96,28-104,21			
Temperatura de incubação	27 °C	100,44	96,22-104,45	100,40	0,0850	0,08
		100,31	96,18-103,52			
		100,47	96,32-104,10			

A partir das médias de potência obtidas nas condições testadas, comprovou-se que o método utilizado apresenta robustez adequada, pois não houve alterações significativas nas determinações médias de potência do itraconazol cápsulas.

O uso de reativos físico-químicos definidos e devidamente padronizados permite a obtenção de resultados reprodutíveis e confiáveis entre laboratórios, em contrapartida, à variabilidade inerente aos ensaios biológicos devido à utilização de reagentes biológicos como microrganismos, animais, fluidos e órgãos isolados de animais não podem ser definidos totalmente apesar dos esforços de instituições internacionais neste sentido (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Sendo assim, é importante ressaltar, há possível necessidade de pequenos ajustes e modificações deste método validado, para que se possa reproduzi-lo em diferentes laboratórios.

5.4 Comparação dos métodos propostos

No presente trabalho desenvolveram-se e validaram-se três métodos analíticos quantitativos para quantificação tanto do itraconazol cápsulas como para matéria-prima, através de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), e ensaio microbiológico de potência-difusão em ágar - cilindros em placa, conforme descrito na Tabela 34.

Tabela 34- Métodos analíticos desenvolvidos e validados para análises quantitativas do itraconazol matéria-prima e cápsulas

Métodos	
A	Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta
B	Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)
C	Ensaio microbiológico de potência - difusão em ágar - cilindros em placa

Os resultados experimentais obtidos para a determinação quantitativa do itraconazol capsulas, nos testes de precisão nos três métodos validados, foram comparados estatisticamente por ANOVA e estão representados na Tabela 35.

Tabela 35 – Análise de variância entre os resultados obtidos nos testes de precisão para os ensaios de espectrofotometria na região do ultra violeta, CLAE e ensaio microbiológico de potência

	A	B	C
	99,03	101,19	100,44
	101,59	99,61	100,25
	99,53	99,41	100,2
	100,96	101,64	99,99
	100,01	101,77	100,01
	100,64	101,34	100,00
	99,48	99,85	
	99,75	101,9	
	100,27	101,13	
Média	100,14	100,87	100,14
S	0,81	0,97	0,18
DPR	0,81	0,97	0,18
ANOVA		Fcalculado	Ftabelado
		2,4012	3,4668

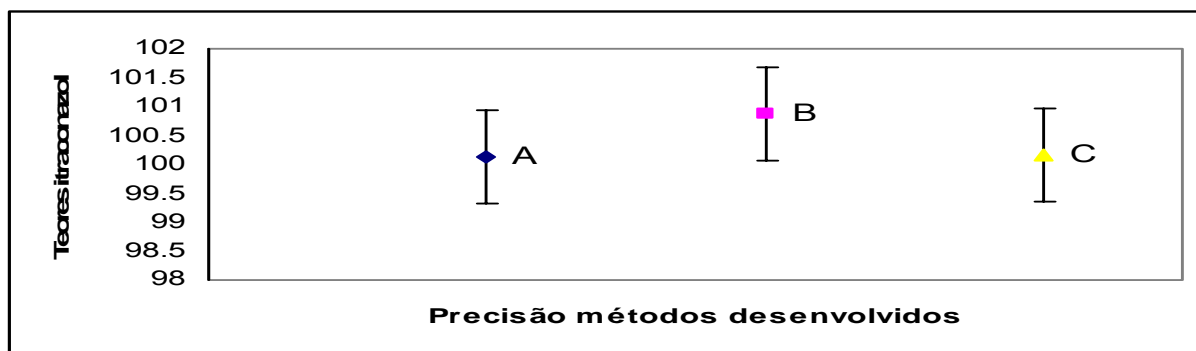


Figura 16 - Resultados dos ensaios de precisão obtidos nos métodos validados. (A) Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta; (B) Cromatografia a Líquido de alta eficiência (CLAE); (C) Ensaio microbiológico de potência - difusão em ágar - cilindros em placa.

Os resultados da análise comparativa (Tabela 35), através da análise de variância (ANOVA) demonstrou que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com os diferentes métodos ($p=0,05$) para a forma farmacêutica em estudo, sendo assim, os métodos analíticos desenvolvidos podem ser intercambiáveis em análises quantitativas do itraconazol cápsulas e também matéria-prima.

CONCLUSÕES

- As condições analíticas estabelecidas no método por espectrofotometria na região do UV demonstraram linearidade, precisão, especificidade, robustez e exatidão, adequados para a determinação quantitativa tanto para o itraconazol matéria-prima como na sua apresentação em cápsulas.
- O método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) cumpriu com as especificações de linearidade, exatidão, precisão, robustez e especificidade, para a realização de ensaios analíticos quantitativos do itraconazol matéria-prima e cápsulas.
- O Ensaio microbiológico de difusão em ágar cilindros em placas, com planejamento 3x3 utilizando o microrganismo de referência *candida albicans* ATCC 10231 e meio antibiótico n° 19 demonstrou linearidade, exatidão, precisão, robustez e especificidade adequadas para determinação quantitativa do itraconazol matéria-prima e cápsulas.
- Os métodos propostos no presente trabalho (Espectrofotometria - UV, CLAE-UV e Ensaios microbiológicos de difusão em ágar) cumpriram com as especificações estabelecidas para a validação de métodos analíticos quantitativos, e não demonstraram entre si diferenças estatisticamente significativas, o que permite a utilização de qualquer um destes métodos analíticos para as análises quantitativas do itraconazol matéria-prima e sua apresentação em cápsulas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, através de revogação da RE – Nº 475 publicada no D.O.U 19 mar. 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ANDRIOLE, V. T. Current end future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.1, n. 16, p. 317-321, 2000.

AOAC – ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington. v. 1, p.27, 1990.

ARAÚJO, M. G.; SILVEIRA, M. A. B. Gênese de antifúngicos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 1996.

AQUINO, F. S. Paracoccidioidomycosis: tratamiento con itraconazol, **Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 4, n. 2, p. 7-11, 2006.

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

BRITISH PHARMACOPOEIA. 2007: Her Majesty Stationery Office, London, 2007

Bulário Eletrônico da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Itraconazol. Disponível em <<http://bulario.bvs.br/index.php>> Acesso em: 8 fev. 2008

CARAZO, J. L. S.; LOSADA, L. O.; SANJUAN, V. P. Tratamiento actual de las micosis superficiales. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 16, n. 699 p. 26-30, 1999.

CARRIER, A.; PARENT, J. Liquid chromatographic – mass spectrometric determination of itraconazol and its major metabolite hydroxyitraconazole, in dog plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 1, n. 745, p. 413–420, 2000.

CAZEDEY, E. C. L.; AZEVEDO, R. C. P.; SILVA, É. F.; ARAÚJO, M. B. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de

itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.

COMPAS, D.; TOUW, D. J.; GOEDE, P. N. F. C. Rapid method for the analysis of itraconazole and hicroxyitraconazole in serum by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 2, n. 687, p. 453-456, 1996.

COX, S. K.; BURNETTE, O. J.; FRAZIER, D. Microassay for determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma and tissue biopsies, **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 702, n. 1-2, p. 80, 1997.

DELGADO, N. J.; REMERS, W. A. **Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry Tenth edition**, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An Integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 755-767, 2001.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; SCHELESKY, M. E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciências e Biologia da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2004.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5ª ed. Concil of Europe, Strasbourg, 2007.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4ª ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FICA, A.C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista Chilena de infectología**. v.21, n. 1, p.26-38, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION Code of Federal Regulation. Washington: Office of the Federal Register, 1991. parte 436.100 a 436.105.

GHANNOUM. M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 1, p.12-16, 2007.

GUBBINS, P. O.; GURLEY, B. J.; BOWMAN, J. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of itraconazole and its hydroxyl-metabolite in human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 1005-1012, 1998.

HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. London: Interpharm/CRC, 2003.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures Q2B: Methodology**, 1996.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JAIN, S.; SHEGAL V. N. Itraconazole: an effective oral antifungal for onychomycosis. **International Journal of Dermatology**, v.1, n. 40, p. 1-5, 2001.

KIBBE, A. H. (Ed) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KOKS, C.H.W.; MEENHORST, P.L.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Itraconazole solution: summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of Fluconazole-resistant oral candidosis in hiv-infected persons, **Pharmacological Research**, v. 46, n. 2, p.195-201, 2002.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 2006/2007. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, cap. 18, p. 18.18-18.19.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 3ª edição, São Paulo: Editora Átomo, 1998.

LORTHOLARY, O.; DUPONT, B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. **Clinical Microbiology Reviews**, julho, p. 477-504, 1997

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistémico. **Enfermedades Infecciosas Microbiologica Clinica**, v. 21, n. 7, p. 366-380, 2003.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal de Pneumologia**. v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 12, p. 83R-88R, 1997.

MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; NASCENTE, P. S. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n.1, p.105-109, 2007.

MOYA, L. T. Nuevas alternativas em el armamento anti infeccioso que el clínico debe conocer. **Revista Chilena de Infectología**, v.19, n.1, p.1-6, 2002.

MUNDEL, A.H. Nuevos agentes terapéuticos en dermatología veterinária. Clínicas Veterinárias de Norteamérica. Avances en dermatología clínica. Buenos Aires, Prensa Veterinária Argentina. v. 20, n. 6, p. 143-148, 1996.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

ODDS, F. C.; BOSSCHE, H. V. Antifungal activity of itraconazole compared with hydroxy-itraconazole in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v 45, n.6 p. 371-373, 2000.

ODDS, F.; AUSMA, J.; GERVEN, F. V.; WOESTENBORGHS, F.; MEERPOEL, L. In vitro and In vivo activities of the novel azole antifungal agent R126638, **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 388-391, 2004.

PUJOL, I.; GUARRO, J.; LLOP, C.; SOLER, L.; BALLART, F. N. Comparison Study of Broth Macrodilution and Microdilution Antifungal Susceptibility Tests for the Filamentous Fungi, **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2106–2110 , 1996

REDMANN, S.; CHARLES, B. G. A rapid HPLC method with fluorometric detection for determination of plasma itraconazole and hydroxy-itraconazole concentrations in cystic fibrosis children with allergic bronchopulmonary. **Biomedical Chromatography**. Setembro, v. 20, n. 4, p. 343-348, 2005.

REYES, E.; GODOY, P.; SILVA, I. R.; BREVIS, P.; NIETO, E.; FISCHMAN, O., Actividad in Vitro de 5 Antifúngicos Contra Aislados Clínicos y Ambientales de *Pichia anomala*, **Ciencia & Trabajo**, v.7, n. 15, p. 17-20 , 2005.

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

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p. 164-171, 2008.

RIVAS, P.; SERRANO, Q. R. Utilidad clínica de las pruebas de susceptibilidad antimicótica. **Revista Colombiana de Cancerología**, Junho, v. 7, n. 2, p. 34-42, 2003.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para o aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SENA, M. M.; FREITAS C. B.; SILVA, L. C.; PÉREZ, C. N., PAULA, Y. O. **Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada**. Química Nova, v. 30, n. 1, p.75-79, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SRIVATSAN, V.; DASGUPTA A. K.; DATLA R. R.; SONI, D.; PATEL, M.; MAVADHIYA, C. Simultaneous determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in Human plasma by high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 1031 n. 4, p. 307-313 , 2004.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 13. ed. New Jersey: Merk & Co., 2001. CD-ROM.

USP 30. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007. CD-ROM

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril – comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 26, n. 2, p. 357-364, 2004.

VARGAS B. V.; PARCHA C.; ARENAS E.R. Antifúngicos de Uso clínico. Análisis de un Laboratorio de Micología. **Revista Ciencia & Trabajo**, janeiro/março, v. 7, n. 15, p. 9-16, 2005.

VERA, J. R. M.; CERVERA, L. A. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, Setembro, v. 14, n. 3, 2001.

YAO, M.; CHEN, L.; SRINIVAS, N. R. Quantitation of itraconazole in rat heparinized plasma by liquid chromatography–mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, n. 3, v. 752, p. 9-16, 2001.

WANG, T. Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC-ICP-MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Taylor& Francis Group, LLC, New Jersey, USA, v.30, p. 807-831, 2007.

WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C. S. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007

ZAOUTIS, T. E.; BENJAMIM, D. K.; STEINBACH, W. J. Antifungal treatment in pediatric patients, **Drug Resistance Updates**, v.8 n.4, p.235-245, 2005.

APÊNDICE A – Parâmetros analíticos utilizados nos métodos empregados.

Espectrofotometria na região do ultravioleta

Parâmetros	Descrição
Branco e diluente	HCl 0,1 mol l ⁻¹
Comprimento de onda	256 nm
Cubetas de quartzo	1 cm de caminho óptico

Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

Parâmetros	Descrição
Coluna	Phenomenex® Gemini RP-8 (150 mm x 4,60 mm, 5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila : Água (65:35)
Comprimento de onda	254 nm
Temperatura	25 °C
Volume de injeção	50 µl
Vazão	1,0 ml/minuto

Ensaio microbiológico de potência - difusão em ágar – cilindros em placas

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Cândida albicans</i> ATCC 10231
Meio de cultura	Meio de cultura para antibiótico n° 19
Volume do meio de cultura em cada placa	8 ml
Concentração de padrão e amostra	0,6, 0,9 e 1,35 µg.ml ⁻¹
Temperatura de incubação	25°C ± 2 °C
Tempo de incubação	48 horas
Solução diluente	HCl 0,1 mol l ⁻¹
Concentração do inóculo	1%

APÊNDICE B – Fluxograma do preparo da SQR e amostra das cápsulas contendo itraconazol nos métodos empregados.

