

**Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de griseofulvina matéria-prima**

**Development and validation of analytical method by high performance liquid chromatography for quantification of griseofulvin raw material**

**Jaqueline Bandeira Rubenick<sup>1</sup>, Marcos Roberto dos Santos<sup>2</sup>, Luciane Varini Laporta<sup>1</sup>, Tatieli Sampaio dos Santos<sup>1</sup> & Alexandre Machado Rubim<sup>1,\*</sup>.**

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Centro Universitário Franciscano, Rua dos Andradas, 1614, Prédio 4, Sala S-011, Santa Maria – RS, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 26, Santa Maria - RS, Brasil.

**RESUMO**

A griseofulvina é utilizada para o tratamento de infecções fúngicas de pele, cabelos e unhas, atuando a partir da inibição da mitose fúngica. O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de griseofulvina matéria-prima por cromatografia líquida de alta eficiência, sem a utilização de tetrahidrofurano na fase móvel e substituição da coluna L10 por coluna C8. Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação. Após os ensaios todos os parâmetros avaliados foram aprovados, sendo assim pode-se concluir que o método desenvolvido é econômico, rápido e de fácil execução, podendo ser utilizado na rotina de análises no controle de qualidade do fármaco em questão.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antifúngico, Controle de qualidade, Fármaco

**ABSTRACT**

The griseofulvin is utilized for treatment of fungal infections of skin, of hairs and nails, acting from the inhibition fungal mitosis. The objective of this work is the development and validation of an analytical method to quantification of griseofulvin in raw material by high performance liquid chromatography, without using tetrahydrifuran mobile phase and L10 column replacement by C8 column. The parameters evaluated were specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, detection and quantification limits. After of assay all of parameters evaluated were approved, thus it can be concluded that the developed method is economical, quick, and easy to perform, can be used in routine analysis in quality control of the drug in question.

**KEYWORDS:** Antifungal, Quality of control, Drug

\***Autor Correspondente:** Alexandre Rubim, Centro Universitário Franciscano, Rua dos Andradas, 1614, prédio 4, sala S011, Santa Maria - RS, Cep: 97010-032, telefone: (55) 3220 1226, e-mail: rubim9@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A griseofulvina, spiro[benzofuran-[2](3H),1'-2cyclohexane]-3,4'-dione, 7-chloro-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-, (1'S-trans)-7-chloro-2',4,6-trimethoxy-6'-methylspiro[benzofuran-2(3H),1'-[2]cyclohexene]-3,4'-dione (Figura 1) (USP 35, 2012), obtida a partir do *Penicilium griseofulvum* em 1939, é um antibiótico fungistático utilizado para o tratamento de dermatofitose, infecção fúngica superficial comum em animais domésticos causadas por fungos dos gêneros *Microsporium spp* e *Trichophyton spp*, sua ação se dá através da ligação à tubulina inibindo assim a mitose destes micro-organismos (Cabañes *et al.*, 1997; Mistri *et al.*, 2007; Oxford, 1939).

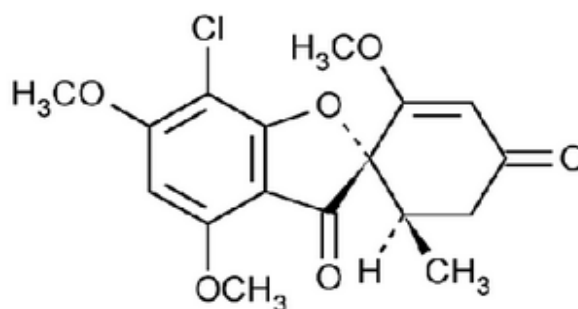


Figura 1. Estrutura química da Griseofulvina

A griseofulvina é comercializada nas formas farmacêuticas de comprimido, cápsula e suspensão oral. Tem como principal local de absorção o duodeno e em menor porção no jejuno e íleo após administração oral, apresenta uma maior absorção quando administrado junto com alimentação gordurosa (Dollery, 1991). Diferentes métodos analíticos têm sido publicados para a determinação de griseofulvina em gel e comprimido por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (Cabañes *et al.*, 1997; Vlachou, 1992), em plasma humano e de ratos como também em nanopartículas de poli-ε-caprolactona por CLAE-EM-EM (Mistri *et al.*, 2007), CLAE (Ahmed *et al.*, 2008; Zili *et al.*, 2005; Kadir *et al.*, 1986) respectivamente.

O método oficial (USP 35, 2012) para determinação de griseofulvina matéria-prima por CLAE utiliza como constituinte da fase móvel tetrahydrofurano (THF), reagente com grande poder tóxico e coluna cromatográfica contendo grupamentos nitrila ligados a partículas de sílica (L10), coluna esta pouco utilizada em métodos, não estando disponível em diversos laboratórios. A partir disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade por CLAE para determinação de griseofulvina matéria-prima sem a utilização do THF e da coluna cromatográfica L10.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e padrões

Foi utilizado como substância química de referência (SQR) griseofulvina lote I1D406 Farmacopéia Americana. Como matéria-prima utilizou-se griseofulvina proveniente de farmácia de manipulação, teor de 100,00%. Os solventes metanol e acetonitrila com grau cromatográfico e água ultrapura obtida a partir de sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore®).

### Equipamentos e condições cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo a líquido de alta eficiência contendo sistema de bombas LC-20AT, detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, autoinjeter SIL-20AHT e sistema controle CBM-20A conectado a computador contendo o software LC Solution (Shimadzu®, Kyoto, Japan).

Utilizou-se coluna cromatográfica C8 de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula, à temperatura de 25 °C. Fase móvel constituída de água e acetonitrila (60:40, v/v), método isocrático, com vazão de 1,6 mL/min. Volume de injeção da amostra de 20 µL. A detecção da amostra foi realizada em comprimento de onda de 254 nm.

### Preparo das soluções padrão e amostra

Pesou-se o equivalente a 25,0 mg de griseofulvina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL adicionando 15 mL de metanol, agitou-se manualmente, e completou-se o volume com o mesmo solvente. Desta solução, transferiu-se volume de 5 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel (solução 1).

Para o preparo da amostra, pesou-se 25,0 mg de griseofulvina matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL adicionando 15 mL de metanol, agitou-se manualmente, e completou-se o volume com o mesmo solvente. Desta solução, transferiu-se volume de 5 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel (200 µg/mL).

### Validação da metodologia

Para o desenvolvimento do método, os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, robustez e especificidade (Brasil, 2003; ICH, 1994; INMETRO, 2007).

#### Linearidade

A partir da (solução 1), preparou-se em triplicata, uma curva padrão contendo as seguintes concentrações: 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; e 60,0 µg/mL. Cada concentração foi injetada duas vezes sendo a linearidade estimada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e avaliada por análise de variância (ANOVA).

#### Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ da griseofulvina foram determinados a partir da curva padrão e calculados como  $3x\sigma/S$  e  $10x\sigma/S$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva padrão.

#### Precisão

A precisão do método foi avaliada em nível de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada a partir da análise em triplicata das concentrações de 20, 40 e 60 µg/mL preparadas pelo mesmo analista, no mesmo dia e com a utilização da mesma instrumentação. A precisão intermediária foi determinada a partir da análise da concentração de trabalho 40 µg/mL, em triplicata, por dois analistas diferentes em três dias consecutivos.

#### Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação de quantidades conhecidas da SQR adicionadas a solução amostra, obtendo assim concentrações finais de 30 a 60 µg/mL. As quantidades recuperadas foram determinadas através da curva padrão.

#### Robustez

Foi avaliada a partir de pequenas e deliberadas variações de alguns parâmetros críticos no método original como proporção entre a fase orgânica e aquosa na fase móvel e temperatura do forno da coluna Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros avaliados no ensaio de robustez do método para determinação de griseofulvina matéria-prima por cromatografia a líquido de alta eficiência.

	Método Original	Variações	
Porção aquosa da fase móvel (%)	60	58	62
Temperatura do forno da coluna (°C)	225	220	30

### Especificidade

A especificidade do método foi determinada de acordo com ICH (1994) através de degradação acelerada. Griseofulvina SQR foi submetida a condições aceleradas de degradação como hidrólises, oxidação e presença de luz UV 254 nm. Inicialmente preparou-se solução de griseofulvina a 1000 µg/mL em metanol. Após, alíquotas de 5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL contendo ácido clorídrico 0,1 M para hidrólise ácida, hidróxido de sódio 0,1 M para hidrólise alcalina, peróxido de hidrogênio a 3% para reação de oxidação. A avaliação da foto-estabilidade da griseofulvina foi realizada com o auxílio de cubeta de quartzo e câmera espelhada específica para este tipo de estudo contendo lâmpada UV-254 nm. Ao final de 24 horas de exposição às condições de degradação, alíquotas foram retiradas e diluídas em fase móvel, realizando neutralizações quando necessário. O teste foi realizado em triplicata.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de desenvolver um método rápido, de menor custo e seguro, diferentes solventes e proporções foram utilizados como fase móvel para otimização do método. Inicialmente, a fase móvel foi constituída de água e metanol (70:30 v/v) e metanol como diluente da amostra, coluna C18 de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula, porém como resultado, o tempo de eluição do fármaco foi muito longo, o pico referente a griseofulvina apresentou baixa simetria e não houve uma estabilidade da linha de base (ruído).

Com objetivo de otimizar o método, alterou-se os constituintes da fase móvel para água e acetonitrila (60:40 v/v) e utilizou-se uma coluna C8 de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula. A partir destas modificações, o pico referente à griseofulvina, apresentou um melhor formato (simetria), a linha de base manteve-se estável e o tempo de eluição diminuiu consideravelmente para 9 min (Figura 2a). Estas condições quando comparadas a metodologia oficial, no qual utiliza (THF) como constituinte da fase móvel e coluna cromatográfica (L10), são condições menos tóxicas e mais acessíveis para outros laboratórios reproduzirem a técnica, visto que um número pequeno de métodos utilizam colunas L10 e conseqüentemente poucos laboratórios a possuem.

A linearidade da curva padrão para griseofulvina foi determinada através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados no intervalo de concentração de 20,0 a 60,0 µg/mL, obtendo uma curva padrão  $y = 33738x + 39928$ , onde  $y$  representa a área do pico e o  $x$  a concentração de griseofulvina, o coeficiente de correlação ( $r$ ) foi de 0,9999, estando aprovado pelos critérios de aceitação (Brasil, 2003). O limite de detecção e quantificação foram de 0,014 µg/mL e 0,05 µg/mL respectivamente, mostrando assim a sensibilidade do método.

Os ensaios obtidos para precisão intermediária e repetibilidade foram satisfatórios, podendo ser observados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. Os valores de DPR encontrados para o ensaio foram inferiores a 2% (USP 35, 2012).

Tabela 2. Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de CLAE para griseofulvina.

	Dia	Teor de griseofulvina <sup>a</sup> (%)	DPR <sup>b</sup> (%)
Analista 1	1	99,07	0,03
	2	99,02	0,01
	3	99,10	0,01
Analista 2	1	100,21	0,003
	2	100,16	0,003
	3	100,26	0,001
DPR médio			0,013

<sup>a</sup> Média de três determinações; <sup>b</sup> desvio padrão relativo

Tabela 3. Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de CLAE para griseofulvina.

Concentração (µg/mL)	Teor de griseofulvina (%)			Média (%)	DPR <sup>a</sup> (%)
	Análise 1	Análise 2	Análise 3		
20	99,94	98,68	97,81	98,81	1,08
40	100,23	99,56	97,76	99,18	1,29
60	100,44	100,42	99,02	99,96	0,81

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

As médias de recuperação para griseofulvina SQR no teste de exatidão foram de 101,68, 101,26, 99,92 e 100,44% para as concentrações de 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL respectivamente, satisfazendo assim os critérios de aprovação para este ensaio.

A partir de pequenas e deliberadas modificações do método original, a reprodutibilidade dos resultados obtidos nos ensaios realizados, mostram uma satisfatória robustez do método proposto, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Condições originais do método por CLAE e suas alterações para avaliação da robustez

Condições cromatográficas	Variações	Teor de griseofulvina <sup>a</sup> (%) ± DPR
Porção aquosa da fase móvel (%)	58	99,93 ± 0,01
	62	100,42 ± 0,02
Temperatura do forno da coluna (°C)	20	99,95 ± 0,01
	30	100,02 ± 0,04

<sup>a</sup>Média de três determinações

A especificidade do método foi confirmada através de estudos de degradações acelerada. Em condições fotolíticas, 87,6% de griseofulvina foram mantidas e um possível produto de degradação foi detectado próximo aos 17 minutos de análise (Figura 2b). Após hidrólise alcalina, o teor mantido de griseofulvina foi de 25,05%, sendo que um possível produto de degradação foi detectado, com baixa resolução, em torno de 3 min (Figura 2c). Após condições ácidas o teor de griseofulvina diminuiu para 11,36%, promovendo a formação de um possível produto de degradação em torno de 11,5 min (Figura 2d). Os resultados do estudo de degradação oxidativa (Figura 2e), mostram que apenas 32,52% da concentração de griseofulvina foram mantidos, e um potencial produto de degradação pode ter originado o pico em torno de 4 min. O pico em 1,5 min é referente ao peróxido de hidrogênio.

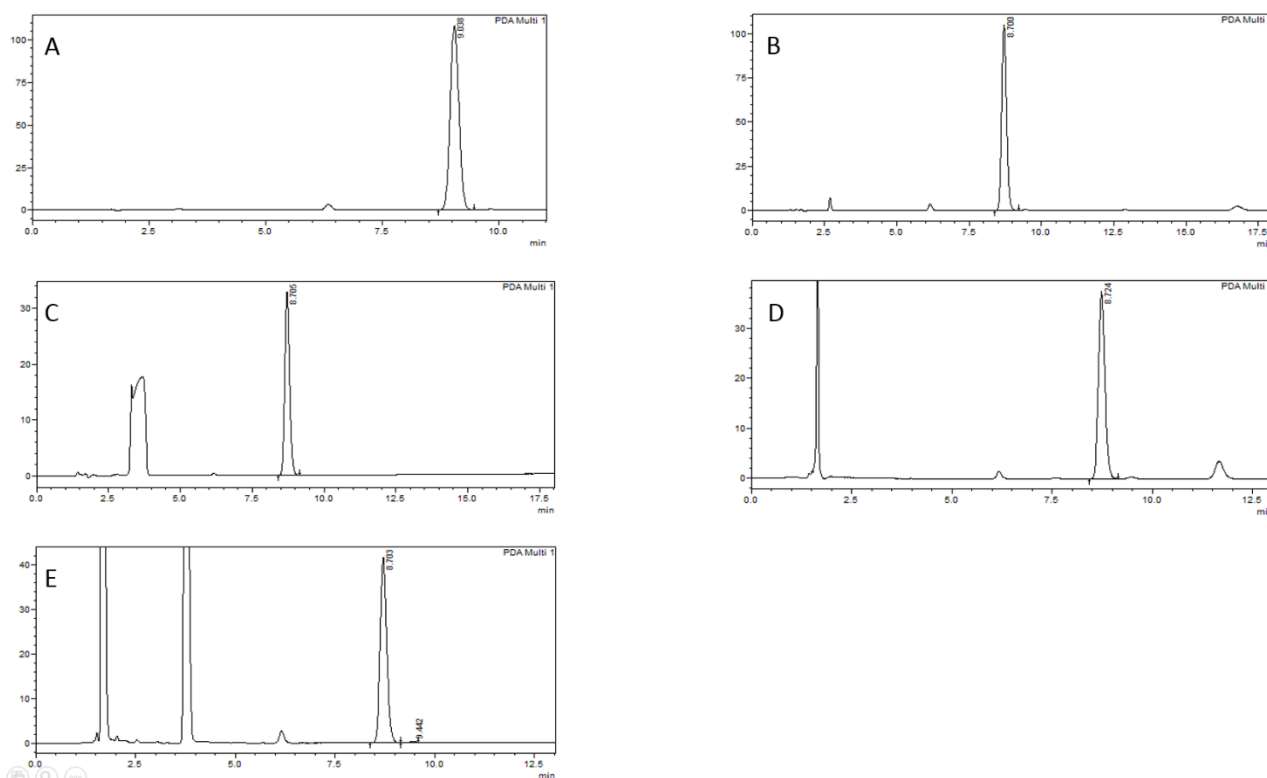


Figura 2. Cromatogramas obtidos após condições de degradação. (A) griseofulvina SQR (40,0 µg/mL); (B) griseofulvina SQR após degradação fotolítica (UV 254 nm); (C) griseofulvina SQR após degradação alcalina (0,1 M NaOH); (D) griseofulvina SQR após degradação ácida (0,1 M HCl) e (E) griseofulvina SQR após degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3,0%).

## CONCLUSÃO

As condições analíticas estabelecidas no método por cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram especificidade, linearidade, precisão, robustez e exatidão adequadas, além de possuir uma boa sensibilidade para determinação do fármaco em estudo. Quando comparado ao método oficial, o método proposto apresentou vantagens econômicas e fácil execução além de não utilizar o solvente tetrahydrofurano, podendo ser útil nas análises de rotina de controle de qualidade da matéria-prima para as indústrias farmacêuticas assim como durante o processo de síntese do fármaco.

## REFERÊNCIAS

- Ahmed IS, Aboul-Einien MH, Mohamed OH, Farid SF. *Eur. J. Pharm. Sci.* 35(3): 219-225, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 899, de 29 de maio de 2003.
- Cabañes FJ, Abarca ML, Bragulat MR. *Mycopathologia.* 137(2): 107-113, 1997.
- Dollery C. *Therapeutics Drugs.* Churchill Livingstone: Edinburgh, 1991.
- ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. Text on Validation of Analytical Procedures Q2B: Methodology, 1994.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2007.
- Kadir S, Murakami T, Higashi Y, Yata N. *Int. J. Pharm.* 33(1-3): 235-242, 1986.
- Mistri HN, Jangid AG, Sanyal M, Shrivastav P. *J. Chromatogr. B.* 850(2): 318-326, 2007.
- Oxford AE, Raistrick H, Simonarat P. *Biochem. J.* 30: 240-248, 1939.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 35. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2012. 5087p.

Vlachou MD, Rekkas DM, Dallas PP, Choulis NH. *Int. J. Pharm.* 82(1): 47-52, 1992.

Zili Z, Sfar S, Fessi H. *Int. J. Pharm.* 294(1-2): 261-267, 2005.