

Identificação de antifúngicos azólicos em produtos manipulados por CLAE-UV

Identification of azoles antifungics in compounded pharmaceuticals for HPLC-UV

Blanca Elena Ortega Markman, Maria Regina Walter Koschtschak, Olívia Uessugui, Roberta Fiusa Magnelli, Elizabeth Meihuey Wu

Seção de Antibióticos. Serviço de Medicamentos. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

Recebido em: 27/11/2008 – Aprovado em 26/3/2009

Resumo

Os antifúngicos polienos e os azólicos compreendem os imidazóis representados pelo nitrato de miconazol e cetoconazol, e os triazólicos que têm o itraconazol e o fluconazol como representantes. São largamente prescritos para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os medicamentos manipulados são desenvolvidos para atender o tratamento individualizado, e no Brasil estão regulamentados pela RDC nº 67, que instituiu as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias (BPMF). Nossa instituição recebeu amostra de cápsulas manipuladas, identificadas como sendo de fluconazol, para verificação da identidade do produto. O método empregado foi o da USP-28 do ensaio de quantificação de cetoconazol, e teve as modificações de: coluna, comprimento de onda, fluxo, temperatura a 25°C, da fase móvel sendo ajustada a pH 5,6 com ácido acético glacial. Foram utilizados: HPLC Shimadzu CLASS-VP10, padrões de nitrato de miconazol e as bases de fluconazol, itraconazol, cetoconazol, secnidazol e tioconazol e metronidazol. Esses foram preparados na concentração de 100 µg/mL, assim como as soluções do conteúdo individual das cápsulas. Após o desenvolvimento cromatográfico das amostras e dos padrões, verificou-se que os tempos de retenção não foram semelhantes entre as cápsulas e os padrões, concluindo-se que não era fluconazol o seu conteúdo. O sistema cromatográfico mostrou-se eficiente na identificação dos seis antifúngicos com estruturas químicas semelhantes apresentando tempos de eluição diferentes, assim como o antiparasitário metronidazol com outra estrutura química. Esse método poderá ser de escolha para análise de antifúngicos, quando houver queixas relacionadas com a identidade do fármaco.

Palavras-chaves: cápsulas; manipulados; antifúngicos; fluconazol; azólicos; CLAE-UV.

Abstract

The polyenes and azoles antifungals comprise the imidazoles that are represented by miconazole nitrate and ketoconazole, and the triazolics are represented by fluconazole and itraconazole. They are widely prescribed for the treatment of systemic infections caused by fungi, especially in immunocompromised patients. The compounded pharmaceuticals are developed to attend individualized treatment and in Brazil they are regulated by the RDC No. 67 which established the Good Practices for Manipulated of Magistrates and Official Preparations for human use in Pharmacy (GPMP). The institute received samples of manipulated capsules identified as fluconazole to verify the identity of the product. The method employed was ketoconazole essay from USP-28 which have the following modifications: column, length wavelength, flow, temperature at 25°C; the mobile phase was adjusted to pH 5.6 with glacial acetic acid. used: Shimadzu HPLC CLASS-VP10, standards of miconazole nitrate and the bases of fluconazole, itraconazole, ketoconazole, secnidazole, tioconazole and metronidazole. These standards were prepared at concentration 100µg/mL, as well as the solutions of the individual contents of the capsules. After the chromatographic development of the samples and the standards, retention times were not similar between the capsules and standards. Conclusion was that the content of the capsules was not fluconazole. The chromatographic system proved effective in identification of six antifungals that have similar chemical structures and they showed different times of elution just like the antiparasitic metronidazole which has different chemical structure. This method could be a choice for the analysis of antifungal if there were complaints about the identity of the drug.

Key words: compounded pharmaceuticals; antifungal; azoles; fluconazole; CLAE-UV.

Introdução

Durante muitos anos, têm sido desenvolvidos inúmeros fármacos antifúngicos, entre eles os polienos e os azólicos, que compreendem os imidazóis representados pelo miconazol e cetoconazol, e os triazólicos, que possuem estrutura semelhante, pertencendo a esse grupo o itraconazol e o fluconazol¹. Eles têm as mesmas características de outros azólicos que possuem grande espectro de ação, baixa frequência de resistência primária, bons efeitos *in vivo* e não apresentam resistência secundária^{1,2}.

A seletividade da ação antifúngica dos imidazóis é devida à interferência na biossíntese do ergosterol por meio da inibição da desmetilação do C-14 do esterol e aumento dos C-14 metil intermediários, como o lanosterol,

compostos incapazes de promover o crescimento de leveduras. Com a diminuição do ergosterol, que é o constituinte principal das membranas das leveduras, ocorre a perda do conteúdo intracelular como cátions, proteínas, aminoácidos e nucleotídeos, com alteração do mecanismo da glicose e o não aproveitamento de aminoácidos².

Esses fármacos são largamente prescritos para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos, principalmente em pacientes imunocomprometidos^{3,4}. Desde a sua introdução no mercado, têm sido reportadas evidências de efeitos tóxicos associados ao uso. Assim, a incidência de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade é induzida por cetoconazol e itraconazol, respectivamente⁵.

A importância dos medicamentos manipulados é dada pelas necessidades diferenciadas de cada paciente, sendo o medicamento manipulado desenvolvido exclusivamente para atender à quantidade e à dosagem ideais para o tratamento, evitando desperdícios e diminuindo o custo do tratamento.

No Brasil, a qualidade desses medicamentos vem sendo amplamente discutida e regulamentada por meio da Resolução RDC nº 67⁶, da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Anvisa/MS), que instituiu as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias (BPMF).

As farmácias de manipulação apresentam limitações técnicas para o cumprimento dos regulamentos estabelecidos, no que concerne aos controles de qualidade de matérias-primas, do processo de manipulação e do produto acabado. Isso ocorre devido ao alto custo do investimento em equipamentos de laboratórios de controle e em analistas qualificados.

Objetivo

O objetivo do presente estudo é a identificação do antifúngico fluconazol em cápsulas manipuladas.

Material e métodos

O Laboratório de Antibióticos do Instituto Adolfo Lutz (IAL) Central – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

(CCD/SES-SP) – recebeu uma amostra constituída de seis cápsulas manipuladas e identificadas como sendo o antifúngico fluconazol, para verificação da identidade do produto.

O método empregado para análise das cápsulas foi adaptado da Farmacopéia Americana – Edição 28⁷ (USP-28) –, do ensaio de quantificação de cetoconazol comprimidos, com as seguintes modificações: utilização de uma coluna monolítica (Cromolith) de 10 cm com pré-coluna em fase reversa, com detecção em ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 235 nm, com fluxo de 1,2 mL/min em sistema isocrático, temperatura de 25°C; a fase móvel utilizada foi constituída de uma mistura de (7:3) de dietilamina em metanol (1:500) e uma solução de acetato de amônio (1:200), e ajustado a pH de 5,6 com ácido acético glacial. O diluente utilizado foi à fase móvel. O equipamento utilizado foi cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) – Shimadzu CLASS-VP10.

Padrões: miconazol e cetoconazol procedência da USP; e os padrões certificados: metronidazol (base), da Fundação para o Remédio Popular (Furp/SES-SP), tioconazol, fluconazol, itraconazol e secnidazol dos laboratórios Pfizer, Medley, Jansen Cilag e Sanofi Aventis, respectivamente. Esses foram pesados e diluídos adequadamente com o diluente para uma concentração de 100µg/mL, assim como o conteúdo individual das cápsulas também foi preparado na mesma concentração teórica, e injetado 20µL de cada. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Tempos de retenção dos antifúngicos fluconazol, itraconazol, miconazol, metronidazol (básico), cetoconazol, secnidazol, tioconazol e das cápsulas analisadas no sistema cromatográfico coluna cromolith C18 de 10 cm com pré-coluna, detecção em UV de $\lambda = 235$ nm, 1,2 mL/min, a 25°C, sistema isocrático, fase móvel constituída de uma mistura de (7:3) dietilamina em metanol (1:500) e uma solução de acetato de amônio (1:200).

Padrões de antifúngicos/ antiparasitário	Tempo de retenção dos padrões (min*)	Cápsulas analisadas	Tempo de retenção das cápsulas (min*)
Miconazol	1,34	Cápsula 1	1,86
Fluconazol	1,42	Cápsula 2	1,86
Secnidazol	1,46	Cápsula 3	1,86
Cetoconazol	3,46	Cápsula 4	1,86
Tioconazol	6,32	Cápsula 5	1,86
Itraconazol	9,77	Cápsula 6	1,86
Metronidazol	1,83		

*Min: minutos.

Resultados e discussão

Após o desenvolvimento das amostras e do padrão fluconazol, verificou-se que os tempos de retenção não foram semelhantes entre a amostra e o padrão, sendo esse o parâmetro utilizado na identificação dos princípios ativos em cromatografia líquida de alta eficiência. Foram testados os outros padrões descritos no mesmo sistema cromatográfico. Conforme mostra a Tabela 1, os tempos de retenção obtidos dos cromatogramas dos padrões miconazol, secnidazol, cetoconazol, tioconazol, itraconazol e metronidazol (nitroimidazol) foram diferentes da amostra constituída de cápsulas. O tempo de retenção do metronidazol (base) foi o que apresentou um valor mais próximo do tempo de retenção da amostra.

O sistema cromatográfico adaptado com as alterações mencionadas mostrou ter uma boa performance na diferenciação dos tempos de retenção e na simetria dos picos cromatográficos, possibilitando a identificação dos seis antifúngicos com estruturas químicas semelhantes, assim como o antiparasitário metronidazol com estrutura química diferente. Esse método poderá ser de escolha para análise de antifúngicos, quando houver queixas encaminhadas ao laboratório relacionadas com a identidade do produto. Após a sua validação, também poderá ser utilizado para a quantificação em medicamentos manipulados ou industrializados.

Podemos concluir, com certeza, que o princípio ativo das cápsulas não era o fluconazol. Além disso, devido à pequena quantidade de cápsulas e indisponibilidade de outros padrões de antifúngicos e/ou de nitroimidazóis, não foi possível identificar o conteúdo das cápsulas.

A troca de fármacos durante a manipulação é grave e pode acarretar consequências sérias. O fluconazol é indicado para candidíase orofaríngea e esofaríngea, mas é ineficaz em pacientes infectados pelo HIV com quadro muito avançado de Aids. Ele possui rápida absorção, alta biodisponibilidade por via oral e

meia vida plasmática relativamente longa^{4,8}. Essas propriedades farmacológicas únicas permitem administração por via oral uma vez por semana, o que é clinicamente vantajoso tanto para infecções sistêmicas como superficiais, favorecendo a aderência dos pacientes ao tratamento⁹. No caso da troca ter sido realizada por outros nitroimidazóis, que entre os efeitos adversos inclui a supressão da imunidade celular, pode ocorrer a estomatite, frequentemente associada ao crescimento excessivo de *Candida sp*, potencializando a doença para a qual foi prescrito o antifúngico fluconazol, além de provocar mutagenesis, carcinogenesis, distúrbios gastrointestinais, principalmente náuseas, gosto metálico, vômitos, diarreias ou constipação intestinal e glossite (inflamação da língua)¹⁰.

O laboratório do Serviço de Medicamentos do IAL recebe dos serviços de vigilância sanitária amostras de matérias-primas e produtos manipulados, provenientes de farmácias de manipulação, para avaliar possíveis desvios de qualidades. Os resultados obtidos nessas avaliações, assim como programas e projetos realizados com produtos manipulados¹¹, nos permitem constatar que as farmácias de manipulação, após a legislação específica para a área, ainda estão em processo de adaptação visando a adequação ao seu cumprimento. A implantação das Boas Práticas de Manipulação permite avaliar e rastrear todo o processo de manipulação, desde a qualificação do fornecedor de matérias-primas até a obtenção do produto manipulado.

Dessa maneira, a fiscalização sanitária das farmácias de manipulação quanto ao cumprimento da RDC nº 67 deve ter o mesmo rigor que tem a indústria farmacêutica no cumprimento das Boas Práticas de Fabricação. Isso porque tanto os fármacos manipulados como os industrializados devem apresentar qualidade, eficácia terapêutica e segurança aos usuários, evitando riscos sanitários como intoxicações, reações adversas e até mesmo a falta de atividade farmacológica.

Referências bibliográficas

1. Bennet JE. Antimicrobial agents. In: Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. New York: Pergamon Press; 1996, p.1175-8.
2. Martindale. The complete drug reference. 34 ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2005, p. 398-9.
3. Caillot D, Bassaris HA, McGeer AC, Arthur C, Prentice WS, De Beule K. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies, chronic granulomatous disease, or AIDS. Clin Infect Dis. 2001;33:83-90.
4. Boogaerts MA, Verhoef GE, Zachee P, Demuyneck H, Verbist L, De Beule K. Antifungal prophylaxis with plasma level. Mycoses. 1989;32(1):103.
5. Girois SB, Chapuis F, Decullier E, Revol BG. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24:119-30.
6. Brasil. Resolução RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias. Diário Oficial da União. Poder Executivo. 9 out 2007.
7. United States Pharmacopoeia. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopoeia 1 Convention; 2005. p. 1099.
8. Boucher AB, King RS, Wandschneider WI, Hanes DS, Herring IV, Canad WT, Hess MM. Fluconazole pharmacokinetics in burn patients. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(4):930-3.
9. Zanini AC, Oga S. Farmacologia aplicada. 5 ed. São Paulo: Atheneu; 1994. p. 533.
10. Martindale. The complete drug reference. 34.ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2005, p. 607.
11. Markman BEO, Koschtschak MRW, Auricchio MT. Otimização e validação de método farmacopéico para avaliar possíveis desvios de qualidades de matérias-primas e cápsulas manipuladas contendo hormônios tireoidianos. Rev Inst Adolfo Lutz. 2007;66(3):268-74.

Correspondência/Correspondence to:

Blanca Elena Ortega Markman
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Pacaembu
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: 55 11 3068-2928
E-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br