

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE AMOROLFINA EM FORMULAÇÕES TÓPICAS E  
AVALIAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**RAFAELA ZIMMERMANN**

**PORTO ALEGRE, 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE AMOROLFINA EM FORMULAÇÕES TÓPICAS E  
AVALIAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO**

Dissertação apresentada por **RAFAELA ZIMMERMANN**  
para a obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elfrides Eva Scherman Schapoval**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 10 de julho de 2019, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Sara Elis Bianchi  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Zimmermann, Rafaela  
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
PARA DETERMINAÇÃO DE AMOROLFINA EM FORMULAÇÕES TÓPICAS  
E AVALIAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO / Rafaela  
Zimmermann. -- 2019.  
127 f.  
Orientador: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. amorolfina. 2. validação. 3. estabilidade. 4.  
produto de degradação. I. Schapoval, Elfrides Eva  
Scherman, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus, primeiramente, por todo o Seu amor e amparo nos momentos difíceis e por sempre iluminar o meu caminho.*

*À Professora Dra. Elfrídes Schapoval pela orientação, confiança, apoio, amizade, empatia e carinho. Por me incentivar e acreditar em mim. Pelo exemplo pessoal e profissional de ética e profissionalismo. Muito obrigada!*

*Ao Professor Dr. Diogo Miron pela coorientação e pela incansável dedicação. Pelos conhecimentos compartilhados, amizade e principalmente pela paciência e compreensão com minhas dificuldades e limitações. Pelo apoio e colaboração decisivos para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo!*

*À Fernanda Batistti pela colaboração e parceria no desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Professor Dr. Saulo Fernandes pela valorosa colaboração na realização e elucidação do ensaio de RMN.*

*Aos Professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.*

*À CAPES pelo apoio financeiro.*

*Aos colegas do LCQFar: Fábio, Livia, Juliana, Jéssica Bauer Joanna, Caren, Nathalíe, Letícia, Júlia, Elisa, Lidiane, Rafaela, Amanda, Camila, Jéssica Pires, Gabriele, Leonardo, Ilana, Eduarda e Lionel pelo convívio, amizade e conhecimentos transmitidos.*

*À Mariana pela amizade, apoio, incentivo e por compartilhar experiências, amenizando as incertezas e anseios da maternidade.*

*À Carol pela amizade, apoio, parceria e incentivo constantes.*

*À Manoelly pela amizade, incentivo e carinho. Por estar sempre presente, disponível e por sua alegria e otimismo contagiante.*

*À Inelía, Pâmela, Andrea, Vitória e Gabriela do LAPS pela amizade, receptividade e auxílios prestados.*

*À minha mãe Madalena e meus irmãos Ariana e Ricardo pelo apoio e carinho.*

*Aos amigos Shaiane e Ismael que sempre me incentivaram e estiveram presentes tornando minha vida mais feliz. Obrigada pelo carinho e dedicação!*

*Aos amigos Carla e Rodrigo por todas as boas vibrações e palavras de incentivo.*

*À amiga Paula pela amizade e carinho e pelas mensagens diárias de otimismo.*

*À minha sogra Deani por cuidar, ensinar e amar minha filha. Sua dedicação foi extremamente importante nessa jornada. Muito obrigada!*

*Ao meu amor, Tiago, pelo incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada por me apoiar sempre. Te amo!*

*À minha filha Isabella por tornar minha vida mais feliz. Por me permitir sentir o maior amor do mundo. Por iluminar meus dias e ressignificar minha existência. Te amo imensamente!*



## **RESUMO**

A amorolfina é um derivado da morfolina que possui um amplo espectro antifúngico frente a dermatófitos, *Candida* e não dermatófitos que ocasionalmente podem causar onicomicose. No Brasil, encontra-se disponível na forma de esmalte e creme, sob nome comercial de Loceryl®. Sabe-se que o controle de qualidade é necessário em todas as fases do desenvolvimento farmacêutico e o objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar resultados que permitam garantir a segurança e eficácia de produtos farmacêuticos. A avaliação dos aspectos de degradação dos fármacos, de forma a indicar as melhores condições de manipulação e armazenamento dos mesmos, é de extrema importância. Dessa forma, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de método por CLAE para análise da amorolfina em formulação líquida desenvolvida e nas formas farmacêuticas comerciais, bem como a avaliação da estabilidade do fármaco em condições de degradação forçada, contemplando a determinação da cinética de degradação, o isolamento e identificação do produto de degradação. Os estudos de degradação demonstraram a estabilidade da amorolfina frente às condições ácida e básica. A degradação oxidativa gerou um N-óxido, o qual foi isolado e purificado. As análises por espectrometria de massas (LC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) permitiram identificar e confirmar o N-óxido como produto de degradação oxidativa da amorolfina. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância dos estudos nesta área para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos.

**Palavras-chave:** amorolfina, validação, estabilidade, produto de degradação.



## **ABSTRACT**

Amorolfine is a morpholine derivative that has a broad antifungal spectrum against dermatophytes, *Candida* and non-dermatophytes that occasionally can cause onychomycosis. In Brazil, it is available in the form of enamel and cream, under the trade name Loceryl®. It is known that quality control is required at all stages of pharmaceutical development and the purpose of validating an analytical procedure is to demonstrate results that ensure the safety and efficacy of pharmaceuticals. The evaluation of the degradation aspects of the drugs, in order to indicate the best conditions of manipulation and storage of the same, are of extreme importance. Thus, the present work aimed at the development and validation of a method by HPLC for analysis of amorolfine in the developed liquid formulation and in the commercial pharmaceutical forms, as well as the evaluation of the stability of the drug under conditions of forced degradation, contemplating the determination of degradation kinetics, the isolation and identification of the degradation product. The degradation studies demonstrated the stability of amorolfine against acid and basic conditions. Oxidative degradation generated an N-oxide, which was isolated and purified. Mass spectrometry (LC-MS) and nuclear magnetic resonance analysis ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) allowed the identification and confirmation of N-oxide as an oxidative degradation product of amorolfine. The results obtained in this work demonstrate the importance of the studies in this area to guarantee the therapeutic safety and efficacy of the pharmaceutical products.

**Key words:** amorolfine, validation, stability, degradation product.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** a) onicomicose das unhas dos pés; b) onicomicose distrófica total; c) onicomicose da unha da mão. Adaptado de: HASCHE e PODDA, 2018. .... 24
- Figura 2.** Estrutura química da amorolfina (ChemACX)..... 26
- Figura 3.** Fotografias representativas do paciente com onicomicose no início e após o tratamento, que alcançou a cura clínica com o uso do esmalte contendo 5% de AMF por 5 meses. Adaptado de: BUNYARATAVEJ et al., 2016. .... 27
- Figura 4.** Formação de N-óxido terciário em função do pH da fase aquosa do sistema cossolvente metanol-tampão fosfato. Quadrados cinzentos são curvas de pH calculadas, e diamantes negros são dados experimentais (BAERTSCHI et al., 2016). .... 36
- Figura 5.** Cromatogramas da AMF sobrepostos com as seguintes condições: a) fase móvel constituída de ACN:ácido fosfórico 0,5% (60:40), vazão 1,2 mL/min, temperatura 35 °C, coluna fenila; b) fase móvel constituída de ACN: trietilamina (TEA) 0,2% + ácido fosfórico 0,2% pH 3,0 (50:50), vazão 1,2 mL/min, temperatura 35 °C, coluna C18; c) fase móvel constituída de ACN:ácido clorídrico 0,05 M pH 3,0 (50:50), vazão 1,2 mL/min, temperatura 35 °C, coluna C18. Ampliação dos picos para melhor visualização da assimetria. .... 43
- Figura 6.** Resultados da análise fatorial. Gráficos de Pareto dos fatores e interações para: a) fator cauda, c) fator capacidade, e) número de pratos (eficiência). As linhas vermelhas e azul representam os valores limite de t e Bonferroni acima dos quais os efeitos são considerados estatisticamente significativos. Gráficos dos fatores com maior efeito versus respostas, sendo: b) fator cauda, d) fator capacidade, f) número de pratos (eficiência). .... 46
- Figura 7.** Gráfico da otimização do método cromatográfico com a Desirability Function. .... 48
- Figura 8.** Cromatogramas da degradação oxidativa da AMF: a) metanol:tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (64:36 v/v), temperatura 30 °C; b) metanol:tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), temperatura 45 °C. .... 49
- Figura 9.** Cromatogramas sobrepostos: a) padrão AMF 250 µg/mL; b) formulação IHM; c) padrão AMF 50 µg/mL; d) LOE; e) LOC. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), vazão 0,9 mL/min, temperatura de análise de 45 °C, coluna fenila (150 mm x 4,6 mm x 3 µm). .... 51
- Figura 10.** Gráfico de pureza dos picos referentes à: a) padrão AMF, b) formulação IHM, c) LOE, d) LOC. .... 52
- Figura 11.** Cromatogramas sobrepostos da análise da AMF submetida às condições de estresse oxidativo em diferentes pH: a) padrão AMF; b) pH 3,0; c) pH 5,0; d) pH 6,5; e) pH 8,0; f) pH 10,0. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), vazão 0,9 mL/min, temperatura de análise de 45 °C, coluna fenila (150 mm x 4,6 mm x 3 µm). .... 53
- Figura 12.** Cromatogramas sobrepostos da análise da AMF submetida às condições de estresse: a) padrão AMF; b) estresse ácido; c) estresse básico (tempo final – dia 4). Condições cromatográficas:

fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), vazão 0,9 mL/min, temperatura de análise de 45 °C, coluna fenila (150 mm x 4,6 mm x 3 µm).....	53
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica das curvas padrão ((a) e (c)) e gráfico dos resíduos ((b) e (d)) para diferentes concentrações da AMF). .....	57
<b>Figura 14.</b> Representação gráfica das curvas padrão 1 e 2 da AMF, utilizadas na comparação das regressões lineares. ....	59
<b>Figura 15.</b> Análise da estabilidade do padrão de AMF (200 µg/mL). a) cromatogramas sobrepostos da solução padrão de AMF nos tempos: 0, 1, 2, 3 e 4 dias com ampliação dos picos; b) ampliação do cromatograma para melhor visualização da linha de base e ausência de picos secundários. ....	72
<b>Figura 16.</b> Estabilidade da AMF a 200 µg/mL em função do tempo para diferentes condições de degradação. Ácido – pH 1,0; Alcalino – pH 12,0; Oxidação – pH 4,0 e Peróxido de hidrogênio 1%. Marcadores – média, n=2.....	74
<b>Figura 17.</b> Análise da estabilidade da AMF (200 µg/mL) em condições oxidativas (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1% e pH 4,0). a) cromatogramas sobrepostos da solução de AMF em condições oxidativas nos tempos: 1, 2, 3 e 4 dias com ampliação dos picos; b) ampliação do cromatograma para melhor visualização da linha de base e presença de pico secundário. ....	75
<b>Figura 18.</b> Representação gráfica da cinética de degradação oxidativa da AMF (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%) em diferentes pH. ....	77
<b>Figura 19.</b> Resultado representativo da análise da estabilidade da AMF em meio oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%) em pH 10,8. a) cromatogramas em 218 nm dos resultados de 24 h para o branco, padrão e degradado; b) espectros dos ápices dos picos da AMF e do N-óxido da AMF (NOx). ....	78
<b>Figura 20.</b> Comparação de espectros UV e UV-d1 do pico do NOx (estabilidade 24 h em pH 10,8) com a biblioteca do software Agilent Chemstation contendo os espectros de referência do AMF e NOx (purificado). a) espectros de UV e fatores de similaridade (“Match” no quadro) do NOx; b) espectros UV-d1 e fatores de similaridade e ampliação do UV-d1 para melhor visualização da diferença de formas entre espectros UV-d1. ....	80
<b>Figura 21.</b> Resultados representativos da análise do NOx-p por CLAE-DAD. a) cromatograma em 218 nm do NOx-p com AMF como controle (ambos a 200 µg/mL); b) pureza de pico do NOx-p; c)espectro UV do NOx-p. ....	82
<b>Figura 22.</b> Resultados do LC-ESI-MS de baixa resolução para amostras de 1 µg/mL da AMF e do NOx-p. a) cromatogramas da AMF padrão e NOx-p; b) espectro de massas e abundâncias da AMF; c) espectro de massas e abundâncias do NOx-p. ....	83
<b>Figura 23.</b> Espectros de massas de alta resolução do NOx-p. a) resultado experimental do NOx-p e predição; b) perfil isotópico teórico; c) dímero do N-óxido e predição. Predição realizada no software Elemental Composition Calculator (by Frank Antolasic). ....	85
<b>Figura 24.</b> <sup>1</sup> H-RMN da AMF e do NOx-p com deslocamentos químicos e atribuições. ....	87
<b>Figura 25.</b> <sup>13</sup> C-RMN da AMF e do NOx-p com deslocamentos químicos e atribuições. ....	88
<b>Figura 26.</b> Reação de oxidação da AMF em peróxido de hidrogênio. ....	90
<b>Figura 27.</b> Nome químico e informações químicas básicas do N-óxido da AMF. ....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros a serem considerados na validação analítica. ....	29
<b>Tabela 2.</b> Condições de estresse para a realização do estudo de degradação forçada. ....	34
<b>Tabela 3.</b> Composição da formulação in house made .....	40
<b>Tabela 4.</b> Fatores e níveis de experimento fatorial completo ( $2^4$ com duas réplicas e ponto central com três réplicas). ....	44
<b>Tabela 5.</b> Condições cromatográficas definidas para a validação do método por CLAE. ....	49
<b>Tabela 6:</b> Variações experimentais para a avaliação da robustez. ....	54
<b>Tabela 7.</b> Resultados do ensaio de robustez para a formulação IHM, LOE e LOC.....	55
<b>Tabela 8.</b> Resumo dos resultados da análise estatística das curvas padrão de AMF. Resultados Detalhados no Anexo II. ....	57
<b>Tabela 9.</b> Resumo dos resultados referentes à avaliação da precisão para as diferentes formulações contendo amorolfina (AMF). Resultados Detalhados no Anexo IV.....	62
<b>Tabela 10.</b> Preparo das amostras utilizadas na exatidão da formulação in house made - IHM.....	63
<b>Tabela 11.</b> Preparo das amostras utilizadas na exatidão do Loceryl® creme .....	64
<b>Tabela 12.</b> Preparo das amostras utilizadas na exatidão do Loceryl® esmalte.....	65
<b>Tabela 13.</b> Resultados referentes à avaliação da exatidão.....	65
<b>Tabela 14.</b> Preparo das soluções e condições da degradação forçada. ....	71
<b>Tabela 15.</b> Resumo dos resultados da estabilidade da solução padrão de AMF a 40 e 200 $\mu\text{g/mL}$ . ..	73
<b>Tabela 16.</b> Preparo das amostras utilizadas na degradação da AMF.....	76
<b>Tabela 17.</b> Valores da constante de reação ( $k$ para relação $\text{Log [AMF]}$ vs tempo) e de $t_{90\%}$ para degradação da AMF em meio oxidativo em diferentes pH. ....	77
<b>Tabela 18.</b> Condições cromatográficas e do detector de massa para análise da AMF e NOx-p. ....	82
<b>Tabela 19.</b> Condições da infusão direta para análise do NOx-p. ....	84





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	21
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	21
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
3.1 <i>Onicomicose</i> .....	23
3.2 <i>Amorolfina</i> .....	25
3.3 <i>Validação de métodos analíticos</i> .....	28
3.3.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i> .....	29
3.3.2 <i>Espectrometria de Massas</i> .....	30
3.3.3 <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	31
3.4 <i>Otimização de métodos analíticos</i> .....	32
3.5 <i>Estudo de estabilidade</i> .....	33
3.6 <i>Oxidação de aminas</i> .....	34
<b>4. CAPÍTULO I – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)</b> .....	<b>37</b>
4.1 <i>Introdução</i> .....	39
4.2 <i>Parte experimental</i> .....	39
4.3 <i>Desenvolvimento da formulação contendo amorolfina - IHM (in house made)</i> .....	40
4.4 <i>Desenvolvimento e otimização do método por CLAE para quantificação de amorolfina</i> .....	41
4.4.1 <i>Resultados e discussão</i> .....	42
4.5 <i>Condições cromatográficas</i> .....	49
4.6 <i>Especificidade</i> .....	50
4.6.1 <i>Resultados e discussão</i> .....	50
4.7 <i>Robustez</i> .....	54
4.7.1 <i>Resultados e discussão</i> .....	54
4.8 <i>Linearidade</i> .....	55
4.8.1 <i>Linearidade AMF 1 e AMF 2</i> .....	56
4.8.2 <i>Resultados e discussão</i> .....	56
4.9 <i>Avaliação da precisão</i> .....	59
4.9.1 <i>Avaliação da precisão da formulação IHM</i> .....	60
4.9.2 <i>Avaliação da precisão do Loceryl® creme (LOC)</i> .....	60
4.9.3 <i>Avaliação da precisão do Loceryl® esmalte (LOE)</i> .....	61
4.9.4 <i>Resultados e discussão</i> .....	61
4.10 <i>Avaliação da exatidão</i> .....	62
4.10.1 <i>Avaliação da exatidão da formulação IHM</i> .....	63
4.10.2 <i>Avaliação da exatidão do Loceryl® creme (LOC)</i> .....	63
4.10.3 <i>Avaliação da exatidão do Loceryl® esmalte (LOE)</i> .....	64
4.10.4 <i>Resultados e discussão</i> .....	65

4.11 Conclusões.....	66
<b>5. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA AMOROLFINA E IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO .....</b>	<b>67</b>
5.1 Introdução.....	69
5.2 Estabilidade da solução padrão e degradação forçada da amorolfina.....	70
5.2.1 Resultados e discussão .....	71
5.2.1.1 Estabilidade da solução padrão .....	71
5.2.1.2 Degradação forçada da amorolfina .....	73
5.3 Avaliação da degradação oxidativa da amorolfina .....	75
5.3.1 Resultados e discussão .....	76
5.4 Purificação do produto de degradação .....	80
5.5 Caracterização do produto de degradação purificado .....	81
5.5.1 CLAE-DAD .....	81
5.5.2 LC-MS .....	82
5.5.3 RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C .....	85
5.6 Identificação do produto da degradação oxidativa da amorolfina.....	89
5.7 Conclusões.....	91
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A onicomicose é uma infecção da unha causada por dermatófito, que acomete principalmente adultos, responsável por cerca de 50% dos distúrbios ungueais e afeta mais frequentemente as unhas dos pés (MACAULEY *et al.*, 2016). A prevalência de onicomicose foi estimada em cerca de 5% a 10% da população mundial (TURNER *et al.*, 2016).

Essa desordem é causada pelo dermatófito *Trichophyton rubrum* em 70% a 85% dos casos e seus principais fatores de predisposição são umidade, maceração, oclusão, trauma, diabetes e imunossupressão (GARCÍA-ROMERO *et al.*, 2012).

Esta infecção muitas vezes provoca dor, desconforto e pode levar a desfiguração permanente da unha como hiperqueratose, descoloração da placa ungueal e unhas quebradiças, reduzindo a qualidade de vida do paciente. Portanto, é importante a realização de exame micológico para confirmar o diagnóstico suspeito e identificar o agente causador, podendo dessa forma selecionar o tratamento ideal (GHIBAL *et al.*, 2008; DHIB *et al.*, 2013; BEN YOUSSEF *et al.*, 2018; BOUKSIR *et al.*, 2018).

Atualmente, são utilizados antifúngicos orais e tópicos para a terapêutica da onicomicose, mas devido à difícil permeação e entrega ungueal e ao longo prazo de intervenção o paciente acaba por reduzir consideravelmente a adesão ao tratamento, levando à recorrência da infecção. Dessa forma, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de formas farmacêuticas promissoras para o tratamento da onicomicose, visando melhorar e manter a adesão dos pacientes (LAFFLEUR e ATALL, 2017).

Neste contexto, tem-se a amorolfina (AMF), um derivado da morfolina que possui um amplo espectro antifúngico, incluindo dermatófitos, *Candida* e não dermatófitos que ocasionalmente podem causar onicomicose (por exemplo, *Scopulariopsis* e *Aspergillus*). Seu efeito fungicida baseia-se na alteração da membrana da célula fúngica, modificando principalmente a biossíntese do ergosterol. A Concentração Inibitória Mínima de amorolfina contra a maioria dos

fungos clínicos variam de 0,001 a 0,5 µg/ mL (ZAUG, 1995; GHANNOUM *et al.*, 2015).

Existem, disponíveis no mercado as apresentações Loceryl® esmalte, que contém 5% de amorolfina e Loceryl® creme, contendo 0,25% de amorolfina.

Sabe-se que o controle de qualidade de medicamentos evolui cada vez mais, renovando tecnologias e aprimorando técnicas já existentes para a pesquisa e solução de problemas que acompanham os produtos farmacêuticos. Técnicas analíticas tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa (CG), a espectrometria de massas (EM), entre outras, são amplamente empregadas no controle de qualidade em busca de metodologias analíticas que forneçam resultados confiáveis e reprodutíveis.

Dessa forma, o objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado para seu propósito pretendido, determinado por meio de estudos experimentais bem documentados. A precisão e confiabilidade dos resultados analíticos é crucial para garantir a qualidade, segurança e eficácia de produtos farmacêuticos (ERMER e MILLER, 2005).

A degradação de um produto farmacêutico pode produzir diversas alterações, portanto é necessário avaliar a estabilidade do mesmo, garantindo que o produto atenda suas especificações durante todo o período de armazenamento. Por esta razão, o estudo da degradação forçada é uma ferramenta utilizada para se obter um perfil de degradação para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (BRASIL, 2015).

Tendo em vista a importância de avaliar os aspectos de degradação dos fármacos, de forma a indicar as melhores condições de manipulação e armazenamento dos mesmos, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE e a avaliação da estabilidade química da amorolfina sob diferentes condições de estresse, com a obtenção de dados cinéticos, e a identificação dos produtos de degradação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, para amorolfina formulação líquida desenvolvida e apresentações comerciais, bem como avaliar a estabilidade química da amorolfina sob diferentes condições de estresse, com a obtenção de dados cinéticos, e a identificação do(s) produto(s) de degradação.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência para amorolfina;
- ✓ Submeter a amorolfina à degradação forçada nos meios ácido, básico e oxidação;
- ✓ Purificar produto de degradação;
- ✓ Utilizar técnicas acessórias para identificação de produtos de degradação: LC-MS (massas), RMN (ressonância magnética).



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Onicomicose

As unhas humanas têm a função de recobrir e proteger a parte dorsal terminal dos dedos das mãos e pés. Possuem, aproximadamente, 0,5-1,0 mm de espessura, são naturalmente convexas, translúcidas, duras e pouco elásticas. Além do conteúdo mineral, as unhas apresentam uma estrutura proteica de três camadas que inclui alfa-queratina, microfibrilas de queratina na matriz globular e proteínas associadas à queratina. A quantidade de enxofre presente é por volta de 10%, principalmente na forma de ligações dissulfeto que interligam as fibras da queratina e concedem resistência à unha, sendo essenciais para a integridade estrutural da proteína. A quantidade total de lipídeos na unha é de, aproximadamente, 0,1-1,0%. O principal plastificante é a água e corresponde, geralmente, a 18% da massa da unha (MURDAN, 2002; NOGUEIRAS-NIETO *et al.*, 2011; WALTERS *et al.*, 2012; SAEEDI *et al.*, 2018).

As unhas podem ser acometidas por diferentes distúrbios como, por exemplo, descoloração por uso de certos fármacos sistêmicos, podem se tornar quebradiças, encravadas, infectadas, apresentar distrofia, hipertrofia, etc. As doenças infecciosas mais comuns que afetam as unhas são a onicomicose e psoríase ungueal (MURDAN, 2002; SHIVAKUMAR *et al.*, 2012; SANER *et al.*, 2014).

A onicomicose é uma infecção fúngica da unha, que afeta parte ou toda a unidade ungueal, podendo causar manchas, descoloração, deformidade ou distrofia, como pode ser observado na Figura 1. O tecido sob e ao redor da unha também pode se tornar mais espesso. Essa desordem muitas vezes provoca dor, desconforto, constrangimento ou até mesmo limitação de atividades, implicando numa redução na qualidade de vida do paciente (FERRARI, 2014; CHEN *et al.*, 2018).

Estudos revelam que as micoses superficiais estão entre as lesões cutâneas mais frequentes do mundo, e a onicomicose corresponde à cerca de 50% desses distúrbios atingindo aproximadamente 5-10% da população mundial. Essa doença é mais prevalente em idosos diabéticos e imunossuprimidos, como no caso de

pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), câncer e distúrbios atópicos (EVANS, 2001; SIGURGEIRSSON e STEINGRÍMSSON, 2004; KAUR *et al.*, 2008; AVANCINI e ZUCCHI, 2018).

A maioria das infecções (90-95%) são causadas por fungos dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophyte* e *Epidermophyton floccosum*), enquanto as demais são provocadas por moldes não dermatófitos (*Scopulariopsis brevicaulis* e *Scytalidium dimidiatum*), e leveduras (*Candida albicans*). A confirmação diagnóstica em casos suspeitos de onicomicose ou outras micoses superficiais pode ser realizada por exame micológico e cultura do material coletado (DE BERKER, 2009; WELSH *et al.*, 2010; SIGURGEIRSSON e BARAN, 2014).



**Figura 1.** a) onicomicose das unhas dos pés; b) onicomicose distrófica total; c) onicomicose da unha da mão. Adaptado de: HASCHE e PODDA, 2018.



Embora a resposta imune do hospedeiro contra infecções por dermatófitos seja pouco conhecida, acredita-se que as células epidérmicas de Langerhans processam os metabólitos produzidos pelo fungo e os apresenta aos neutrófilos e linfócitos. Surgem, contudo, evidências que os pacientes com onicomicose podem demonstrar resposta imune insuficiente para eliminar o agente responsável pela infecção, podendo desencadear uma dermatofitose crônica (ZAITZ *et al.*, 1996; SIGURGEIRSSON e STEINGRÍMSSON, 2004; FAERGEMANN *et al.*, 2005).

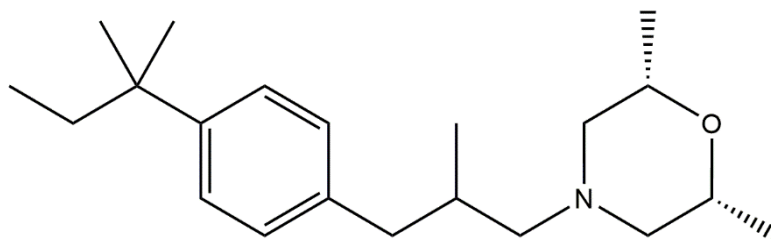
Formulações tópicas e orais continuam sendo a terapia de escolha para o tratamento de onicomicoses. Porém, os antifúngicos orais apresentam importantes efeitos adversos como toxicidade hepática, queixas gastrointestinais, erupção cutânea e distúrbios respiratórios. Dessa forma a terapia antifúngica tópica apresenta vantagens sobre antifúngicos orais que incluem: a falta de efeitos colaterais sistêmicos e complicações devido à absorção sistêmica limitada, baixa incidência de interações medicamentosas, facilidade de uso, custo comparativamente baixo de terapia e benefício adicional da atividade anti-inflamatória de vários antifúngicos tópicos, porém sua eficácia é limitada por má absorção no aparelho ungueal (BROWN *et al.*, 2009; KREIJKAMP-KASPERS *et al.*, 2017; POOJARY, 2017).

Métodos mecânicos, físicos e químicos podem ser empregados para melhorar a administração tópica de fármacos como as técnicas de microporação, terapia fotodinâmica e iontoforese. O uso de potenciadores de penetração nas formulações e ainda veículos tópicos inovadores como microemulsões, lipossomas e nanopartículas vem sendo utilizados no intuito de potencializar o tratamento (GUPTA e PAQUET, 2013; POOJARY, 2017).

### **3.2 Amorolfina**

A amorolfina (AMF) (Figura 2) é uma amina terciária derivada da morfolina, um fármaco antifúngico sintético que exibe atividade fungistática e fungicida de amplo espectro, incluindo dermatófitos, vários filamentosos e demáceos, leveduras e fungos dimorfos. Bloqueia a 14- $\alpha$  redutase e a 7,8- $\delta$  isomerase, resultando na depleção de ergosterol e o acúmulo de ignosterol na membrana citoplasmática do

fungo. A parede celular torna-se mais espessa e depósitos de quitina são formados dentro e fora da parede da célula fúngica. Dessa forma a AMF é considerada eficaz para o tratamento da onicomicose, bem como da dermatomicose (WELSH *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2012; AMEEN *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Estrutura química da amorolfina (ChemACX).

O esmalte de unha contendo 5% de AMF tem sido considerado um tratamento eficaz para infecções ungueais. Bunyaratavej e colaboradores (2016) testaram a eficácia do esmalte de AMF comparada com tratamento tópico com ureia. Os resultados demonstraram melhora clínica significativa com redução de 50% na espessura da hiperqueratose ungueal, e cura micológica definida pelo resultado negativo de KOH e cultura fúngica. Além disso, as unhas infectadas retornaram à sua condição normal (Figura 3), o que significa a cura completa.



**Figura 3.** Fotografias representativas do paciente com onicomicose no início e após o tratamento, que alcançou a cura clínica com o uso do esmalte contendo 5% de AMF por 5 meses. Adaptado de: BUNYARATAVEJ *et al.*, 2016.

Um estudo experimental recente comparou a penetração da AMF em diferentes camadas das unhas, com a terbinafina, ciclopirox e naftina onde apenas a AMF penetrou nas unhas em concentrações suficientes para inibir o crescimento de *T. rubrum* (GHANNOUM *et al.*, 2019).

Contudo, os resultados positivos de cura micológica podem ser explicados pelas propriedades antifúngicas da AMF e, além disso, o filme produzido pela forma farmacêutica esmalte ajuda a promover o fármaco e permanecer em contato com a unha doente por um longo período, inibindo a adesão de esporos fúngicos, evitando a reinfecção. Também promove a hidratação da lâmina ungueal contribuindo para uma maior difusão do fármaco, melhorando assim a sua conformidade, para que possa ser aplicado somente uma ou duas vezes por semana, sendo dessa forma, bastante promissor para o tratamento (FLAGOTHIER *et al.*, 2005; SIGURGEIRSSON *et al.*, 2010; CARNEY *et al.*, 2011).

A AMF também é efetiva, segura e bem tolerada no tratamento da dermatofitose superficial da pele, apresentada geralmente, na forma de *Tinea corporis*, uma infecção bastante comum no clima quente e úmido de países tropicais (BANERJEE *et al.*, 2011).

### **3.3 Validação de métodos analíticos**

Validação é o processo usado para garantir que um novo método analítico atenda às exigências desejadas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. E para que se tenha sucesso no desenvolvimento de novos medicamentos, bem como no monitoramento do produto lote a lote, levando em consideração o controle de qualidade durante esse processo, se faz necessário o uso de técnicas analíticas adequadas, sendo primordial recorrer a documentos e guias regulatórios, tornando-se indispensável ter definições claras dos diferentes critérios de validação utilizados. Nesse contexto, a validação do método é um processo que consiste em pelo menos cinco etapas distintas: qualificação do sistema, amostragem, preparação da amostra, análise e avaliação dos dados (ERMER, 2001; ROZET *et al.*, 2007; ARAUJO, 2009).

Os critérios a serem avaliados estão relacionados com o tipo e finalidade pretendida da metodologia analítica, não havendo a necessidade de todos serem analisados, como indica a Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	não	sim	não	Sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	Sim
Precisão Intermediária	não	sim <sup>(1)</sup>	não	sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não <sup>(3)</sup>	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não <sup>(3)</sup>
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

<sup>(1)</sup> Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

<sup>(2)</sup> Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

<sup>(3)</sup> Pode ser necessário em alguns casos (BRASIL, 2017).

Os métodos analíticos são determinantes para assegurar a qualidade, eficácia e segurança de produtos farmacêuticos, estando as técnicas cromatográficas entre as mais empregadas. Além disso, existe uma estratégia que permite o conhecimento preliminar das características de desempenho do método antes de começar o estágio de validação. Rápida e simples, a metodologia de pré-validação é baseada na avaliação matemática /estatística de um número mínimo de experimentos necessários para obter todas as informações essenciais para avaliar e demonstrar a confiabilidade de seu processo (GRDINIĆ e VUKOVIĆ, 2004).

### **3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais empregada entre as técnicas analíticas de separação de fármacos, devido à sua detectabilidade, a sua pronta adaptabilidade às determinações quantitativas com exatidão, a sua adequação para a separação de compostos não-voláteis ou termicamente instáveis e, acima de tudo, a sua ampla aplicação a substâncias de grande interesse por parte da indústria e muitos campos da ciência (HOLLER *et al.*, 2009).

Em razão de sua alta resolução, sensibilidade e especificidade, o método por CLAE é o mais utilizado em estudos de estabilidade. Aproximadamente 90% dos métodos indicativos de estabilidade descritos na literatura, utilizam a técnica por CLAE, pois permitem a separação e a visualização do fármaco e de seus produtos de degradação (BAKSHI e SHING, 2002).

Sua técnica de separação é baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel líquida, e uma fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são obtidas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária empregada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; GUPTA *et al.*, 2012).

Diferentes fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Essa técnica apresenta também, avanços contínuos frente às inovações em materiais, *softwares* e inclusão de técnicas analíticas vinculadas.

### **3.3.2 Espectrometria de Massas**

A espectrometria de massas é uma ferramenta versátil e amplamente utilizada para identificar os elementos presentes em amostras de interesse e para determinar suas concentrações. Sua técnica se baseia na introdução da substância de interesse em uma fonte de ionização para adquirir cargas positivas ou negativas. Logo após, os íons formados percorrem o instrumento e são separados conforme sua proporção de massa/carga ( $m/z$ ). Em seguida, esses íons chegam até o detector do equipamento e este gera um sinal gráfico relacionando a proporção  $m/z$  com sua intensidade. Com base no espectro de massas gerado para a amostra em análise é possível confirmar a sua identidade através do sinal com  $m/z$  correspondente ao seu peso molecular (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Essa técnica vem sendo bastante utilizada nas áreas biológica e alimentícia, devido a sua alta capacidade em detectar e analisar substâncias em concentrações

muito baixas, usando pequenas quantidades de amostra. Apresenta, ainda, a possibilidade de associação com outras técnicas de separação. A utilização de misturas água/solvente na ionização faz com que ela seja ideal para o acoplamento de sistemas de separação como CLAE. O acoplamento de um cromatógrafo a líquido com o espectrômetro de massas (LC-MS) combina as vantagens da cromatografia como alta seletividade e eficiência de separação com as vantagens da espectrometria de massas, as quais são obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (VÉKEY,2001; ZAIKIN, 2011).

### **3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica bastante eficaz para a identificação de compostos orgânicos, sendo bem estabelecida em muitas áreas, como fármacos, excipientes, vacinas, produtos naturais, peptídeos e outros. Através da análise de uma substância por RMN, é possível confirmar sua identidade pela concordância entre sua estrutura química e os sinais gráficos gerados pela presença dos átomos de carbono e hidrogênio na molécula (SILVERSTAIN e WEBSTER, 2000; HOLZGRABE, 2010).

A espectrometria de RMN possibilita também, a identificação e quantificação de impurezas resultantes da via de síntese e degradação, ou solventes residuais, bem como a determinação do conteúdo no ensaio, sendo usada rotineiramente para a elucidação de estruturas de compostos recém-sintetizados, produtos naturais e compostos semissintetizados, permitindo elucidar a constituição, configuração e conformação de pequenas moléculas, polímeros, proteínas, açúcares ou nucleotídeos (HOLZGRABE et al., 2005; HOLZGRABE, 2010).

Neste contexto, a espectroscopia de RMN pode ajudar a rastrear, identificar e frequentemente quantificar novas impurezas, bem como participar da avaliação da qualidade de fármacos e excipientes.

### 3.4 Otimização de métodos analíticos

Uma única condição cromatográfica não consegue abordar informações suficientes sobre todos os fatores envolvidos no processo por CLAE. Inúmeras variáveis precisam ser cautelosamente identificadas, investigadas e controladas para vencer essa dificuldade. Um planejamento quimiométrico experimental pode superar esse problema organizando os experimentos de forma a identificar e otimizar os fatores significativos visando obter resultados eficientes através de ensaios experimentais limitados (SAHU *et al.*, 2018).

O método de otimização Quality by Design (QbD) tem sido amplamente utilizado pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos para promover o processo e a qualidade dos produtos, sendo definido pelo Conselho Internacional sobre Harmonização (ICH, 2009), como uma abordagem sistemática ao desenvolvimento que inicia com objetivos predefinidos e realça a compreensão do produto e processo, fundamentada no conhecimento científico e gestão de risco de qualidade (PASQUINI *et al.*, 2016; TOL *et al.*, 2016).

E ainda, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e Food and Drug Administration (FDA), afirmaram que a aplicação de elementos do QbD no desenvolvimento de métodos analíticos é vista como um qualificador do desempenho esperado do método. Sua sistemática aplicada ao desenvolvimento de métodos analíticos baseia-se em alguns passos chave que começam com o perfil alvo analítico e resultam na definição de uma região operável do método. A abordagem inclui o uso de avaliação de risco e estatísticas multivariadas, o que leva a uma compreensão abrangente do método e garante a qualidade dos dados. Dessa forma, a introdução do QbD na análise parece ser uma estratégia promissora para garantir a qualidade dos resultados analíticos e da harmonização de métodos. (BORMAN *et al.*, 2007; VOGT e KORD, 2011; EMA, 2013; SILVA *et al.*, 2017).



### 3.5 Estudo de estabilidade

A estabilidade na área farmacêutica pode ser definida como a capacidade de uma formulação, em manter suas características químicas, físicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas por um tempo determinado (O'DONNELL e BOKSER, 2013).

A estabilidade de um produto farmacêutico está sujeita a diversos fatores, que podem ser considerados intrínsecos, como incompatibilidades físicas e químicas (pH, reações de oxirredução e hidrólise) ou por fatores extrínsecos (tempo, temperatura, exposição à luz e oxigênio, umidade e o material de acondicionamento). A velocidade e a ordem dessas reações são definidas e para identificá-las são necessários estudos de cinética química, que podem ser classificados, principalmente, como ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (LOFTSSON, 2014; BRASIL, 2015).

As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade de reação não depende das concentrações dos reagentes. Nas reações de primeira ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes, enquanto nas reações de segunda ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração dos dois reagentes ou à segunda potência da concentração de um dos reagentes (LOFTSSON, 2014).

A degradação de medicamentos pode alterar os seus efeitos farmacológicos, levando à alteração da eficácia terapêutica, bem como a geração de produtos tóxicos. Uma vez que os ativos farmacêuticos são utilizados com base na sua eficácia e segurança, eles devem ser estáveis e manter a sua qualidade até o momento da utilização ou até a sua data de validade (HUYNH-BA, 2009).

Estudos de degradação forçada ou testes de estresse são realizados para demonstrar especificidade ao desenvolver métodos indicadores de estabilidade, principalmente quando há pouca informação disponível sobre possíveis produtos de degradação que podem ser formados durante o armazenamento. Essas análises também facilitam o desenvolvimento de formulações, auxiliando no processo de fabricação e embalagem, onde o conhecimento do comportamento químico pode ser usado para melhorar um medicamento (REYNOLDS *et al.*, 2002).

Esse estudo inclui a realização de testes sob condições de estresse especificadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Recomenda-se que o estudo seja realizado investigando-se, quando aplicável e possível, cada uma das condições listadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições de estresse para a realização do estudo de degradação forçada.

Aquecimento	60°C
Umidade	75% UR ou >
Solução Ácida	0,1 M HCl
Solução Básica	0,1 M NaOH
Solução Oxidativa	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fotolítica	UV-B fluorescente
Íons Metálicos (opcional)	0,05M Fe <sub>2</sub> ou Cu <sub>2+</sub>

Fonte: Silva *et al.*, 2009.

O objetivo das análises realizadas através deste procedimento, não é degradar totalmente o composto, mas promover uma redução na área do pico principal de pelo menos 10%, preferencialmente sem ocorrer geração de produtos de degradação secundários. Sendo observada a ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco deve ser considerado estável. Se esta for inferior a 10%, devem-se aumentar as condições de estresse (REYNOLDS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2009; BRASIL, 2015).

### 3.6 Oxidação de aminas

Aminas são substâncias moderadamente polares e bases relativamente fracas, podem ser primárias, secundárias ou terciárias, arila ou alquila. As aminas são grupos funcionais bastante presentes em produtos farmacêuticos e estão predispostas a diferentes reações de degradação (SOLOMONS e FRYHLE, 2006).

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular, sendo referido como uma auto-oxidação (SILVA *et al.*, 2009).

As aminas primárias e secundárias são nucleofílicas e reagirão prontamente com eletrófilos, como os aldeídos. Aminas terciárias apresentam uma forte tendência a oxidar ao óxido de amina (N-óxido) durante o armazenamento a longo prazo. Na realização de testes de estresse usando peróxido de hidrogênio, se houver aminas presentes na molécula, especialmente aminas terciárias, a oxidação é geralmente rápida se a amina não for carregada. Uma amina catiônica protonada é protegida e a taxa de oxidação será vigorosamente reduzida (BAERTSCHI *et al.*, 2016).

Considera-se que os óxidos de amina terciária sejam produtos finais de degradação relativamente estáveis, mas alguns óxidos de amina podem degradar-se facilmente a outros compostos. Acredita-se que os óxidos de amina terciária se degradam via reação de eliminação, denominada reação de eliminação de Cope, e ainda que essa reação geralmente exija exposição a altas temperaturas (100-150°C), porém, pode acontecer a temperaturas mais baixas. Na reação de Cope, o óxido de amina se cliva para formar um alceno e uma hidroxilamina. Outra forma de degradação dos óxidos de amina terciária ocorre via protonação do oxigênio para formar a hidroxila (pKas de óxidos de aminas terciárias tendem a cair na faixa de 5-7) (MARCH, 1985; BAERTSCHI *et al.*, 2016).

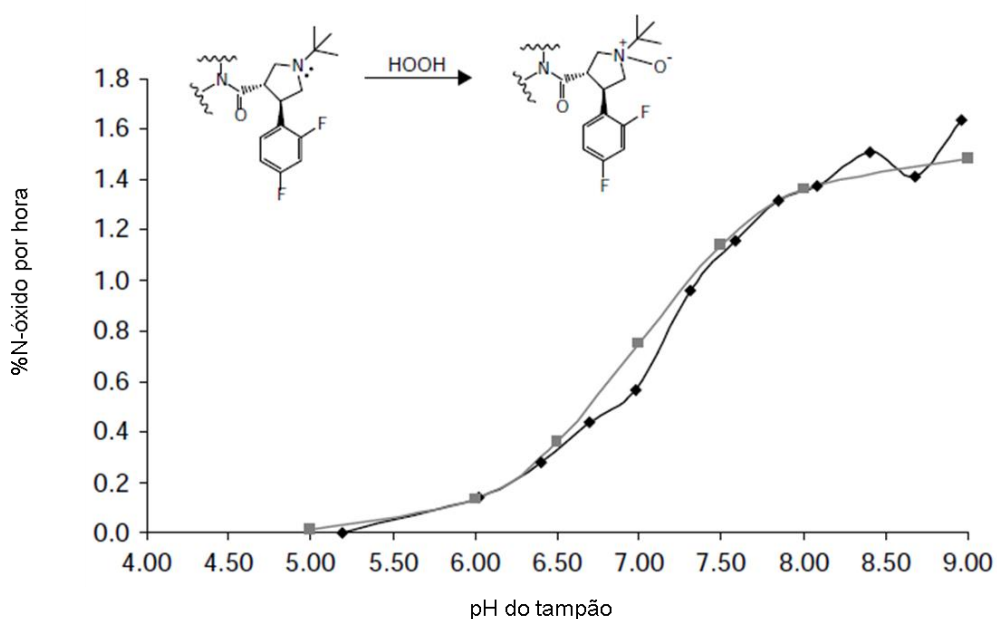
Zhao e colaboradores (2004) realizaram um estudo com um antagonista da substância P da acetal morfina, demonstrando que óxidos de amina terciária protonados podem desidratar para íon imínio, e possivelmente, reagir com a água formando um aldeído e uma amina secundária.

Em contrapartida, Freed e colaboradores (2008) fizeram um estudo de formulação para investigar o efeito do pH sobre o controle de degradantes N-oxidativos, mostrando que a oxidação de aminas alquílicas terciárias por hidroperóxidos pode ser inibida pela redução do pH das soluções de estresse ou pela acidificação das formulações com ácido cítrico, concluindo que, para suprimir de forma eficaz a N-oxidação, o pH da solução precisa ser controlado bem abaixo do pKa das aminas terciárias.

As reações de aminas com peróxido de hidrogênio diminuem drasticamente quando o par de elétrons isolado de nitrogênio é protonado. Dessa forma, é importante levar em consideração o pH aparente do sistema cossolvente durante o

ensaio. É sugerido realizar o teste de peróxido de hidrogênio com o pH controlado próximo do pKa da amina no sistema (BAERTSCHI *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Nelson e colaboradores (2006) foi utilizado o sistema de cossolvente metanol:tampão fosfato (50:50) com valores de pH ajustados (5,0-9,0), onde foi observada uma alta taxa de formação de N-óxido terciário em função do pH da fase aquosa do sistema, o que sugere que o estado de protonação do nitrogênio da amina foi responsável pelo controle da taxa de reação, como pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4.** Formação de N-óxido terciário em função do pH da fase aquosa do sistema cossolvente metanol-tampão fosfato. Quadrados cinzentos são curvas de pH calculadas, e diamantes negros são dados experimentais (BAERTSCHI *et al.*, 2016).

## **4. CAPÍTULO I – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**



## 4.1 Introdução

A validação é o processo onde comprova-se que o método analítico é aceitável para a finalidade pretendida. Deste modo, cabe ao analista referir-se a documentos e guias regulatórios, tornando-se essencial ter definições claras dos diferentes critérios de validação utilizados (ROZET *et al.*, 2007).

Para a validação da metodologia analítica por CLAE, de acordo com os critérios preconizados pelo Conselho Internacional sobre Harmonização (ICH, 2005), pela RDC 166 (BRASIL, 2017) e pela Farmacopeia Americana (USP 42, 2019), os seguintes parâmetros foram avaliados: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

O objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar um método por CLAE-DAD para determinação da amorolfina em formulação líquida e apresentações comerciais.

## 4.2 Parte experimental

Abaixo estão descritos os equipamentos e reagentes utilizados para o desenvolvimento dos estudos descritos nos capítulos a seguir. Quando necessárias, outras especificações serão descritas se pertinentes.

Os equipamentos e utensílios rotineiramente utilizados foram: balança analítica AND®, modelo HM – 202, Japão; banho de ultrassom Unique®, modelo USC 280, Brasil; pHmetro Digimed®, modelo DM-20, Brasil.

O equipamento utilizado para o desenvolvimento do método foi o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent® modelo LC 1200 series, equipado com uma bomba quaternária, um autoinjeter, compartimento para coluna com termostato e detector de arranjo de diodos. O sistema utilizado para aquisição de dados e análises de resultados foi o software ChemStation (Versão B03.02).

Os reagentes empregados foram: acetonitrila e metanol grau cromatográfico; água ultrapura produzida pelo sistema de filtros Milipore® Mili-Q. Os reagentes grau analítico foram: acetato de sódio; ácido acético; ácido fórmico; ácido fosfórico 85%;

fosfato de sódio monobásico; etanol absoluto; hidróxido de potássio; ácido clorídrico 37%; peróxido de hidrogênio 30%.

Substância química de referência - SQR - Padrão: cloridrato de amorolfina com teor declarado de 100,4%, identificada pelo lote 02512240027 adquirida através da empresa Pharmasynthese (França).

Produto farmacêutico: foram adquiridas no mercado as apresentações esmalte, contendo 50 mg/mL (5%) de amorolfina (equivalente a 55,74 mg/mL de cloridrato de amorolfina) e creme contendo 2,5 mg/g (0,25%) de amorolfina (equivalente a 2,788 mg/g de cloridrato de amorolfina) sob o nome comercial de Loceryl® produzidas pela empresa Galderma (França).

A apresentação esmalte (LOE) possui veículo constituído por copolímero do ácido metacrílico, triacetina, acetato de butila, acetato de etila e álcool etílico, enquanto os excipientes da apresentação creme (LOC) são o éster de macrogol 2.000, álcool estearílico, petrolato líquido, petrolato branco, carbômer 934P, hidróxido de sódio, edetato dissódico, fenoxietanol e água purificada.

#### 4.3 Desenvolvimento da formulação contendo amorolfina - IHM (in house made)

Nosso laboratório tem testado o efeito de agentes de permeação na penetração de fármacos em modelos ungueais, porém com limitada avaliação da estabilidade das formulações (MIRON *et al.*, 2014).

Para o desenvolvimento da formulação hidrofílica foram testadas diferentes concentrações de acetilcisteína, ácido ascórbico, etanol e água. Como promotores de viscosidade foram considerados polímeros derivados da celulose HPMC e PVA (álcool polivinílico), resultando na formulação apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição da formulação in house made

Ativo	%
Acetilcisteína	2,5
Ácido Ascórbico	0,2
Eudragit E100	1,5
Amorolfina	3,0
Diluyente 2	qsp 50mL



Preparo: Dispersa-se o polímero (0,75 g) em 30 mL de Diluente 2 (etanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (2:1 v/v)), agita-se e, se necessário, aquece-se (Fase A); misturam-se os demais componentes da formulação em 15 mL de Diluente 2 (Fase B); misturam-se as fases e completa-se o volume a 50 mL Diluente 2.

#### 4.4 Desenvolvimento e otimização do método por CLAE para quantificação de amorolfina

Diferentes estratégias podem ser empregadas para o desenvolvimento de novos métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e um não necessariamente é melhor do que outro desde que o método atenda às necessidades e objetivos do analista. Parâmetros cromatográficos como fator capacidade ( $k$ ), número de pratos ( $N$ ) e seletividade ( $\alpha$ ) definem a resolução ( $R_s$ ) entre os picos (Eq. 1 - 3) e devem ser considerados desde o início dos estudos. Valores de número de pratos e fator capacidade entre 5.000 – 20.000 e 2,0 – 10,0, respectivamente, são geralmente aceitos como ideais e com potencial para obter-se resolução entre os picos. O número de pratos aumenta com colunas mais longas, menores partículas e vazões menores - sendo que a vazão possui pouca influência no número de pratos e resolução. Número de pratos elevados requerem longos tempos de corrida e, por isso, alteração na seletividade é geralmente preferida. Por sua vez, baixos fatores de retenção ( $k < 1$ ) podem afetar muito a resolução e a interferência por picos de substâncias não retidas sendo, facilmente, um problema. Quando os valores de  $k$  são muito baixos (menores que 1) ou muito altos (maiores que 20) costuma-se empregar a eluição por gradiente (DOLAN e SNYDER, 2017).

$$R_s = \frac{1}{4} N^{0,5} \left[ \frac{k_1}{1 + k_1} \right] (\alpha - 1) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde  $k_1$  é o fator capacidade do primeiro pico.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde  $t_R$  é o tempo de retenção do analito;  $t_0$  é o tempo de eluição de substâncias não retidas na coluna.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde  $k_2$  é o fator capacidade do segundo pico.

A Equação 1 define que a resolução pode ser melhorada pela variação de  $N$ ,  $k$  e  $\alpha$ , mas aumentar a seletividade é de longe a opção mais poderosa. Em geral, os fatores e o grau de sua influência na seletividade podem ser resumidos em: concentração do tampão (menos efetivo); % da fase orgânica; tempo do gradiente; temperatura da coluna; tipo de solvente; tipo de coluna; pH (mais efetivo) (ANDRIĆ e HÉBERGER, 2017; DOLAN e SNYDER, 2017).

Apesar da resolução entre os picos ser o alvo para uma análise precisa e exata também é fundamental que o fator cauda ( $T$  – *tailing factor*) seja menor que 2,0 (Eq. 4). Valores altos tendem a piorar a resolução entre os picos, afetando principalmente, a precisão e a exatidão. Fator cauda elevado dificulta a integração, pois a determinação do final do pico torna-se difícil e, conseqüentemente, perde-se acurácia na determinação das áreas dos picos (FDA- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1994; SNYDER *et al.*, 2010).

$$T = \frac{W_{5\%}}{2F} \quad (\text{Eq. 4})$$

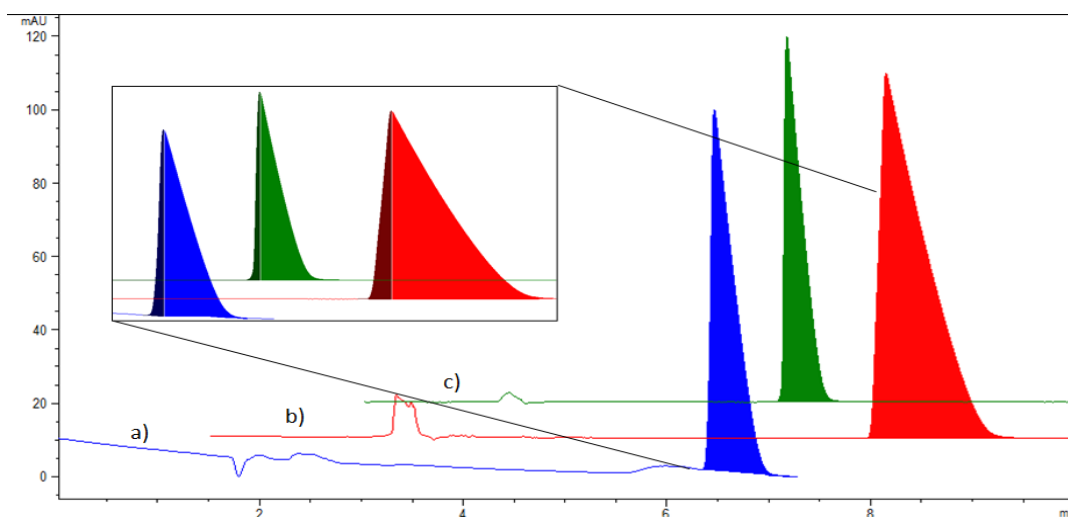
Onde:  $W_{5\%}$  é a largura do pico a 5% da altura do pico;  $F$  é o tempo a 5% da altura do pico a partir do ponto de início do pico até o tempo de retenção.

#### **4.4.1 Resultados e discussão**

Artigos científicos sobre liberação e permeação de formulações contendo AMF geralmente empregam a técnica de cromatografia líquida para análise, porém o foco destes trabalhos não é o método analítico e, por isso, praticamente não possuem informações que descrevam satisfatoriamente os resultados

cromatográficos. Gao e colaboradores (2012) descrevem método quantitativo para determinação de formulação tópica por CLAE empregando coluna C-18 e acetonitrila, metanol e tampão citrato como fase móvel. O fator cauda da AMF neste trabalho foi 2,95, valor bem maior que o recomendado em validações de métodos cromatográficos para análise de fármacos (FDA- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1994).

Nossos estudos de desenvolvimento se depararam com o mesmo problema de Gao e colaboradores (2012), elevados valores de fator cauda que dificilmente eram menores que 3 (Figura 5). Algumas estratégias conhecidas para tentar resolver o problema da cauda foram tentadas sem sucesso, como: a) diferentes colunas com diferentes tipos de fase reversa (C-18, C-8, fenila), tamanhos (100, 150 e 250 mm) e diâmetros de partícula (3 e 5  $\mu\text{m}$ ), além de colunas de fase normal tipo HILIC e propil-ciano; b) diferentes solventes orgânicos como acetonitrila (ACN), metanol e isopropanol); c) pareamento iônico com pentano e heptano sulfonato de sódio; d) trietilamina e dibutilamina; e) temperatura da coluna (25 – 65  $^{\circ}\text{C}$ ); f) pH da fase aquosa (1,5 – 9,0); g) gradiente com tempo de eluição baixo e alto; h) redução da concentração de fármaco em vista a investigar possível *overload* de analito na coluna; i) diferentes tipos e concentrações do tampão.



**Figura 5.** Cromatogramas da AMF sobrepostos com as seguintes condições: a) fase móvel constituída de ACN:ácido fosfórico 0,5% (60:40), vazão 1,2 mL/min, temperatura 35  $^{\circ}\text{C}$ , coluna fenila; b) fase móvel constituída de ACN: trietilamina (TEA) 0,2% + ácido fosfórico 0,2% pH 3,0 (50:50), vazão 1,2 mL/min, temperatura 35  $^{\circ}\text{C}$ , coluna C18; c) fase móvel constituída de ACN:ácido clorídrico 0,05 M pH 3,0 (50:50), vazão 1,2 mL/min, temperatura 35  $^{\circ}\text{C}$ , coluna C18. Ampliação dos picos para melhor visualização da assimetria.

Em nenhuma das condições testadas o fator cauda foi menor que dois, contudo verificou-se que o aumento da concentração do tampão fosfato de 10 mM para 50 mM, resultou em picos menos assimétricos (fator cauda em torno de 2,6 para 50 mM). O aumento da concentração do tampão fosfato para 150 mM resultou em fator cauda próximo a 2,0. Com estes resultados foi delineado experimento fatorial em vista de conhecer o efeito de fatores potencialmente relevantes em diferentes parâmetros cromatográficos. A Tabela 4 resume os fatores e níveis avaliados em experimento fatorial completo ( $2^4$  com duas réplicas e ponto central com três réplicas). As respostas avaliadas foram fator cauda, fator capacidade e número de pratos. A seletividade e resolução não foram incluídas, pois nesta fase inicial ainda não se tinha um produto de degradação e o fator cauda era um problema que inviabilizava o prosseguimento dos estudos analíticos.

**Tabela 4.** Fatores e níveis de experimento fatorial completo ( $2^4$  com duas réplicas e ponto central com três réplicas).

<b>Fator</b>	<b>Nível Baixo</b>	<b>Nível Alto</b>
Metanol (%)	64	70
Conc. Tampão (mM)	50	250
pH	1,75	2,25
Temperatura Coluna (°C)	25	45

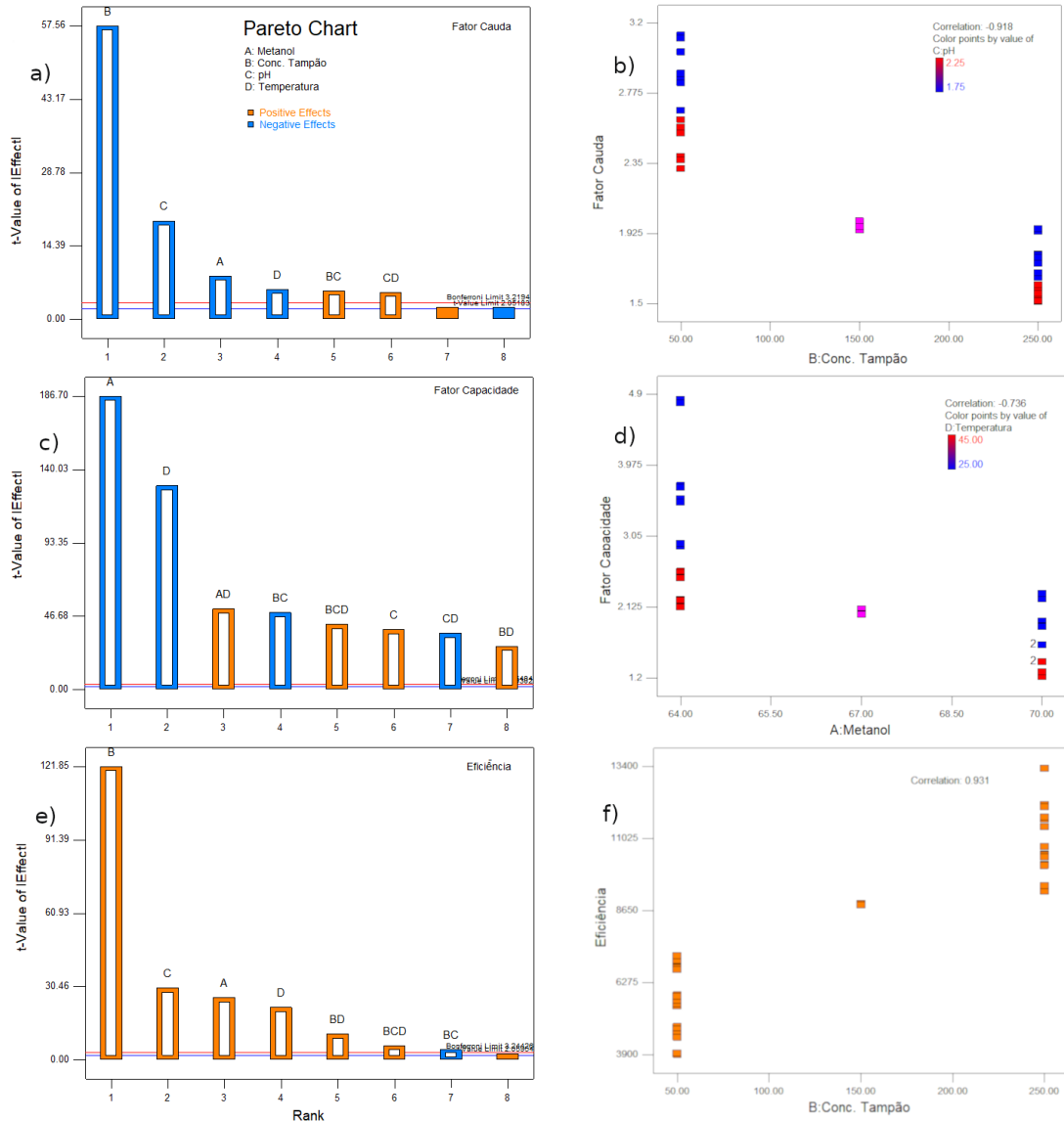
Tampão fosfato é utilizado para o controle de pH de fases móveis em concentrações de 5 – 25 mM. Em geral, não se recomenda o uso de concentração maior que 50 mM devido ao problema de solubilidade que pode causar precipitação do fosfato e complicações no cromatógrafo com desgaste dos selos da bomba, pistão, além de entupimento de tubulação e da coluna (CARR e SCHELLINGER, 2004). Em estudos prévios com a acetonitrila foram obtidos resultados um pouco melhores que o metanol, sobretudo em relação à largura do pico e pressão do sistema (ambos menores para acetonitrila). Contudo, somente o metanol foi capaz de solubilizar o tampão fosfato em concentrações maiores que 50 mM e, por isso, foi selecionado para o delineamento fatorial. A alta pressão no sistema cromatográfico

foi ajustada com variação na vazão da fase móvel, resultando em pressão menor que 250 bar com 0,9 mL/min.

A análise do delineamento fatorial foi realizada com auxílio do *software Design Expert* versão 7.1.5 (Minneapolis, US). Foram encontrados fatores significativos para todas as respostas avaliadas com modelos ajustados e excelente capacidade de predição ( $r^2 > 0,988$  em todos os casos – Resultados detalhados no anexo I). A Figura 6 apresenta graficamente os resultados da análise fatorial, sendo em laranja efeitos positivos (fator varia com a resposta) e em azul efeitos negativos (fator varia de forma inversa com a resposta).

O fator cauda teve a concentração do tampão como fator mais relevante com relação inversa, ou seja, quanto maior a concentração de tampão, menor o fator cauda (Figura 6.a). Somados, concentração do tampão e pH, contribuem com 93,84% da variação verificada na soma dos quadrados e definitivamente, juntos, são responsáveis pelas alterações verificadas no fator cauda neste estudo. Assim, concentração de tampão e pH no nível alto foram as condições experimentais que resultaram em menores valores de fator cauda (Figura 6.b).

O fator capacidade apresentou a porcentagem de metanol e temperatura da coluna como fatores com maior efeito (54,13 e 26,15% da variação das somas dos quadrados, respectivamente) (Figura 6.c). Como esperado para cromatografia em fase reversa o aumento da porcentagem de solvente orgânico na fase móvel e da temperatura da coluna acabam por reduzir o tempo de retenção do analito, reduzindo o fator capacidade. Valores de fator capacidade inferiores a 2,0 não são recomendados e dificilmente geram métodos capazes de separar o analito de componentes da formulação e impurezas. Na Figura 6.d fica claro que a redução na porcentagem de metanol aumenta o fator capacidade com todos os experimentos obtendo valores de  $k > 2,0$ . A temperatura também possui efeito e a temperatura mais baixa testada (25 °C) em associação com porcentagem de metanol no nível baixo acabam por elevar o  $k$  para valores maiores que 3,0.



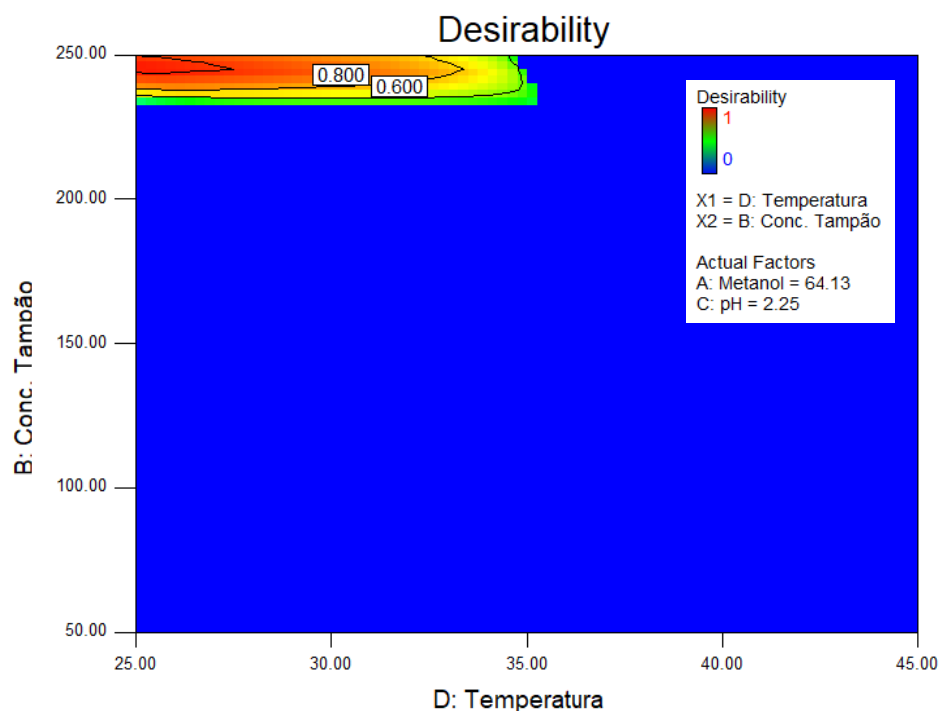
**Figura 6.** Resultados da análise fatorial. Gráficos de Pareto dos fatores e interações para: a) fator cauda, c) fator capacidade, e) número de pratos (eficiência). As linhas vermelhas e azul representam os valores limite de  $t$  e *Bonferroni* acima dos quais os efeitos são considerados estatisticamente significativos. Gráficos dos fatores com maior efeito versus respostas, sendo: b) fator cauda, d) fator capacidade, f) número de pratos (eficiência).

A concentração do tampão foi o fator com maior influência (86,65% da variação da soma dos quadrados) no número de pratos (eficiência na Figura 6). A relação foi positiva de maneira que o aumento da concentração de tampão causa aumento no número de pratos. No nível mais alto de concentração de tampão os valores de número de pratos ficam acima do desejado (> 5.000).

Uma análise rápida permite verificar que o fator cauda e o número de pratos são favorecidos em grande extensão pelo aumento da concentração de tampão e em menor grau pelo incremento do pH. Em contraponto, o fator capacidade possui

melhores resultados nos níveis inferiores de metanol e temperatura da coluna. Contudo, existe influência dos quatro fatores nas três respostas avaliadas, o que torna a escolha de uma condição para prosseguimento do desenvolvimento de método, uma tarefa bastante difícil. Diversas técnicas são utilizadas para otimização de múltiplas respostas e a *Desirability Function* é uma delas. Este método descreve uma função objetivo que reflete valores desejáveis para cada resposta que varia de zero a um (menos ao mais “desejável”, respectivamente) (MYERS *et al.*, 2009). As faixas das respostas empregadas, considerando os resultados experimentais e os valores desejáveis para os parâmetros cromatográficos já descritos anteriormente, foram: 1,5 – 1,7 para o fator cauda, 3,0 – 4,0 para fator capacidade e 6.000 – 12.000 para pratos.

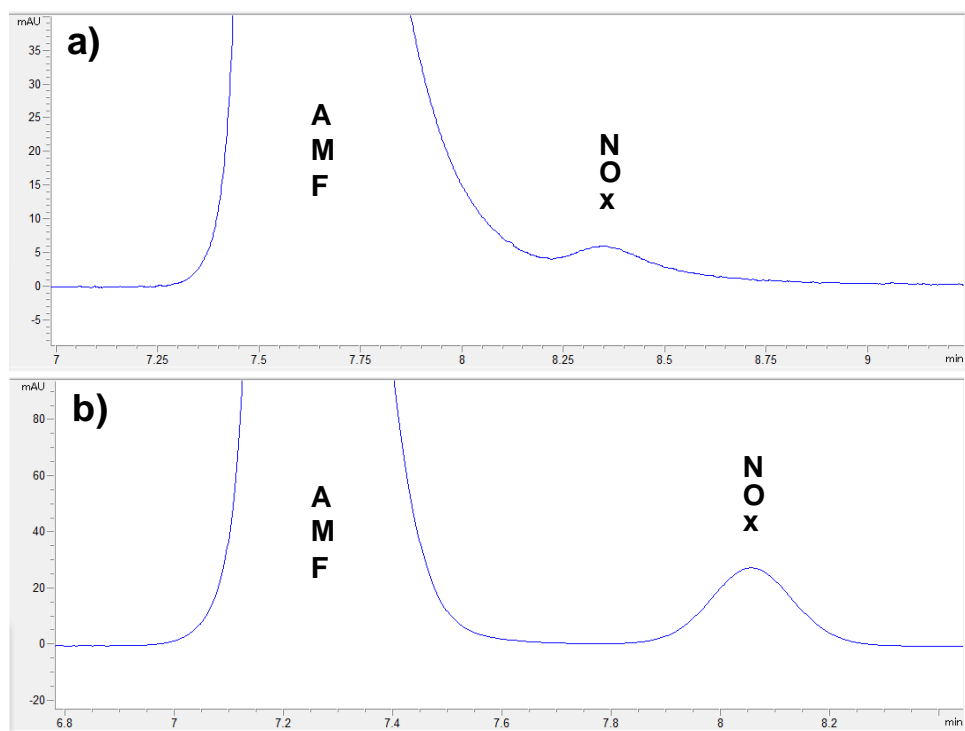
A Figura 7 apresenta o resultado da otimização do método cromatográfico empregando a *Desirability Function*. Existe um pequeno espaço amostral que atende as especificações estabelecidas para as respostas (fator cauda e capacidade, e número de pratos). Com base neste espaço amostral selecionou-se a condição: metanol 64%, concentração do tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 e temperatura da coluna 30 °C (especialmente porque 25 °C é difícil de manter em dias quentes). A AMF foi testada nestas condições e apresentou valores satisfatórios de fator cauda e capacidade, bem como de pratos (1,61, 3,49 e 10.135, respectivamente).



**Figura 7.** Gráfico da otimização do método cromatográfico com a *Desirability Function*.

Com método cromatográfico otimizado, amostras de AMF foram submetidas à degradação forçada em meio ácido, básico e oxidação (com peróxido de hidrogênio ao abrigo da luz) e, então, submetidas à análise. Os meios ácido e básico não alteram o perfil cromatográfico das amostras de AMF. A degradação por oxidação reduziu a intensidade do pico da AMF e apresentou um pico de produto de degradação (Figura 8.a). Os picos não ficaram bem resolvidos e novo ajuste no método fez-se necessário. Com base nos resultados prévios (Figura 6.b e 6.d), reduziu-se a porcentagem de metanol com o objetivo de alterar o fator capacidade da AMF e do produto de degradação melhorando a seletividade do método. Metanol a 62% foi capaz de separar os picos, porém houve aumento da pressão do sistema (superior a 275 bar) e aumento da largura do pico (com redução dos pratos para o limite inferior desejado de 5.000). Em vistas a minimizar os efeitos da redução do metanol, foi aumentada a temperatura da coluna para 45 °C obtendo-se redução na pressão ( $\approx 200$  bar) e aumento dos pratos ( $\approx 6.000$ ) com resolução entre os picos satisfatório ( $R_s > 2,0$ ) (Figura 8.b). Assim, os fatores cromatográficos considerados críticos foram ajustados a metanol 62%, concentração do tampão 250 mM, pH 2,25 e temperatura da coluna (45 °C), para a validação do método analítico.





**Figura 8.** Cromatogramas da degradação oxidativa da AMF: a) metanol:tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (64:36 v/v), temperatura 30 °C; b) metanol:tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), temperatura 45 °C.

#### 4.5 Condições cromatográficas

A partir dos resultados obtidos na otimização, considerou-se o método como definido, estando adequado para os objetivos a que foi proposto. A Tabela 5 apresenta as condições estabelecidas para a execução da validação analítica. O tempo de análise foi de 10 minutos.

**Tabela 5.** Condições cromatográficas definidas para a validação do método por CLAE.

Característica	Descrição
Coluna	ACE® fenila (150 mm x 4,6 mm x 3 µm)
Fase móvel <sup>a</sup>	Metanol:tampão fosfato 250 mM pH 2,25 (62:38 v/v)
Vazão	0,9 mL/min
Volume de injeção	15 µL
Comprimento de onda	218 nm
Temperatura do forno	45°C

<sup>a</sup> pressão obtida próxima a 200 bar.

É importante ressaltar que o metanol e o tampão fosfato devem estar previamente combinados para uso na CLAE, pois a mistura dos eluentes pelo *mixer* do cromatógrafo acaba prejudicando o sistema, possivelmente devido à precipitação.

#### **4.6 Especificidade**

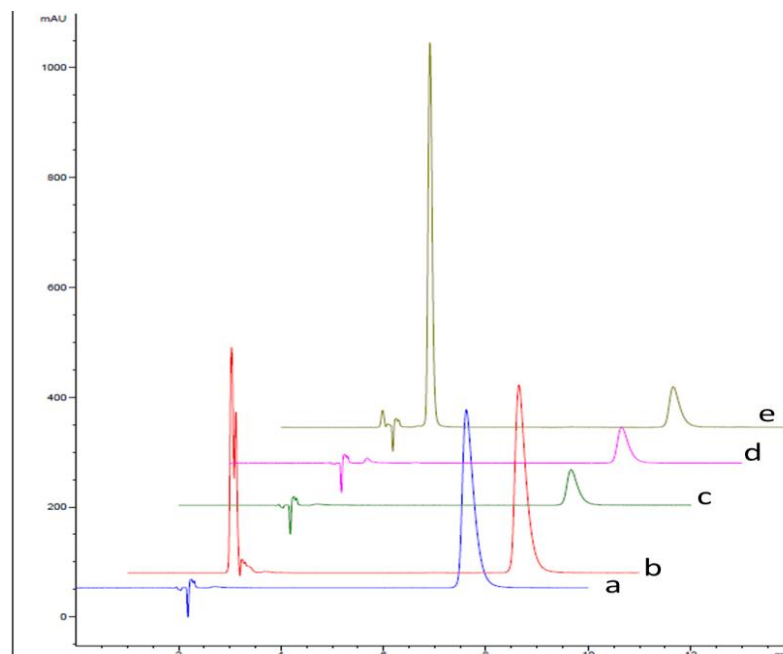
A especificidade pode ser conceituada como a capacidade que o método possui de medir exatamente o analito em presença de outros constituintes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2017). Para o método ser considerado específico, precisa demonstrar separação adequada do pico do analito e outros picos do cromatograma. Os picos de interesse também precisam apresentar fator de pureza satisfatório, ou seja, não deve haver coeluição.

A especificidade do método foi investigada por meio da determinação do fator de pureza, através da comparação de espectros sobre a área do pico, empregando detector de arranjo de diodos, em conjunto com os resultados do teste de degradação forçada.

A degradação forçada foi avaliada por meio da análise de amostras de AMF, formulação IHM e as formulações Loceryl<sup>®</sup> sob as condições de estresse oxidativo, ácido e básico.

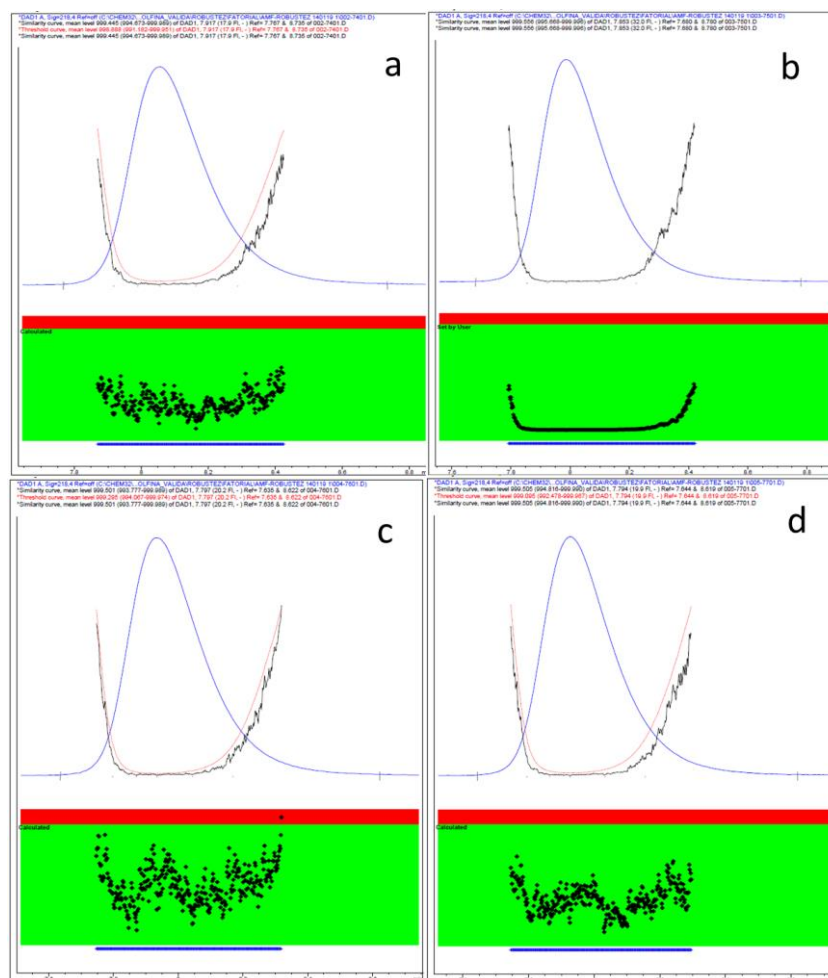
##### **4.6.1 Resultados e discussão**

A partir dos dados obtidos, pode-se observar na Figura 9 que não há interferência ou sobreposição dos excipientes das formulações no tempo de retenção da AMF. Na (Figura 9.b) é possível verificar os picos referentes aos excipientes acetilcisteína e ácido ascórbico presentes na formulação IHM, e na (Figura 9.e) o pico referente ao conservante fenoxietanol presente na composição do Loceryl<sup>®</sup> creme.



**Figura 9.** Cromatogramas sobrepostos: a) padrão AMF 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; b) formulação IHM; c) padrão AMF 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; d) LOE; e) LOC. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), vazão 0,9 mL/min, temperatura de análise de 45 °C, coluna fenila (150 mm x 4,6 mm x 3  $\mu\text{m}$ ).

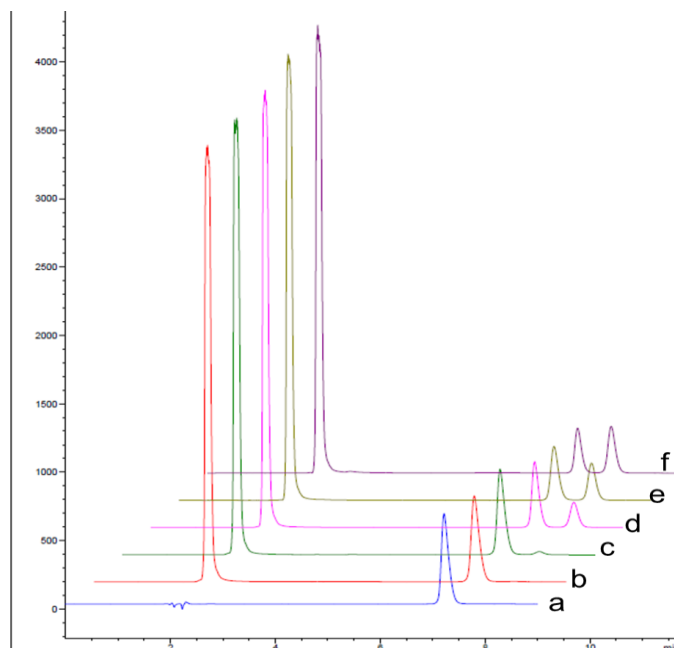
Para a análise de pureza de pico, os espectros na faixa de 205–300 nm foram registrados a uma frequência de 1,28 Hz e o espectro de ruído e compensação de fundo subtraídos dos espectros de pico. A sensibilidade da inclinação para integração foi ajustada em 10 e 20 para AMF a 50 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Como pode ser observado na Figura 10, a AMF apresentou-se espectroscopicamente pura (impureza não detectada na análise da curva de similaridade e índice de pureza do pico muito próximo de 1.000) na análise das formulações em teste.



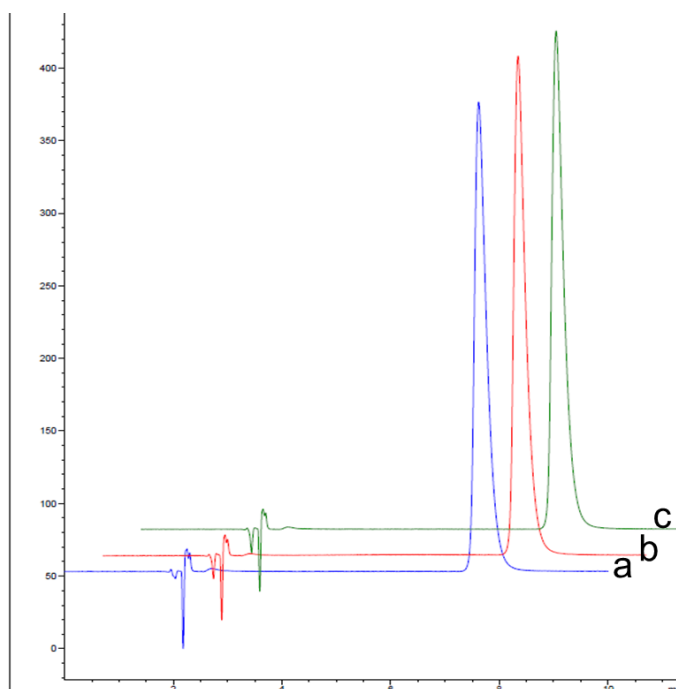
**Figura 10.** Gráfico de pureza dos picos referentes à: a) padrão AMF, b) formulação IHM, c) LOE, d) LOC.

A especificidade do método também foi avaliada por meio da análise de amostras de AMF submetidas a condições de estresse oxidativo, expostas a peróxido de hidrogênio a 3% em diferentes pH (faixa 3,0 -10,0), e também a condições de estresse ácido e básico conforme detalhado no Capítulo II.

Pode-se observar na Figura 11 que a resolução do pico da AMF demonstrou-se satisfatória, indicando que não houve interferências ou coeluição do produto de degradação com a AMF (os picos existentes no início das análises são referentes ao peróxido de hidrogênio). Na Figura 12 observa-se que não houve degradação da AMF nos meios ácido e básico.



**Figura 11.** Cromatogramas sobrepostos da análise da AMF submetida às condições de estresse oxidativo em diferentes pH: a) padrão AMF; b) pH 3,0; c) pH 5,0; d) pH 6,5; e) pH 8,0; f) pH 10,0. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), vazão 0,9 mL/min, temperatura de análise de 45 °C, coluna fenila (150 mm x 4,6 mm x 3 µm).



**Figura 12.** Cromatogramas sobrepostos da análise da AMF submetida às condições de estresse: a) padrão AMF; b) estresse ácido; c) estresse básico (tempo final – dia 4). Condições cromatográficas: fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato 250 mM, pH 2,25 (62:38 v/v), vazão 0,9 mL/min, temperatura de análise de 45 °C, coluna fenila (150 mm x 4,6 mm x 3 µm).

Conforme os resultados obtidos, não se verificou alteração no formato do pico ou coeluição na análise com detector de arranjo de diodos, portanto, considera-se que o método é específico para análise da AMF frente às condições testadas.

#### 4.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de planejamento fatorial de Plackett-Burman, utilizando-se quatro parâmetros e um ponto central. Para demonstrar a robustez do método quanto a pequenas variações estudou-se o efeito de quatro fatores importantes: concentração do tampão, temperatura de análise, pH do tampão e concentração de metanol. Este planejamento prevê nove ensaios, que foram realizados conforme exposto na Tabela 6.

**Tabela 6:** Variações experimentais para a avaliação da robustez.

Condição	Conc. Tampão	T (°C)	Conc. MeOH	pH do Tampão
1	240	42	60	2,15
2	260	42	60	2,35
3	240	48	60	2,35
4	260	48	60	2,15
5	240	42	64	2,35
6	260	42	64	2,15
7	240	48	64	2,15
8	260	48	64	2,35
9*	250	45	62	2,25

\* condição padrão

##### 4.7.1 Resultados e discussão

Para verificação da robustez avaliou-se o efeito das variações frente ao fator capacidade, o fator cauda e o teor de AMF da formulação IHM e das formulações Loceryl®.

A Tabela 7 apresenta os resultados do teor de AMF na formulação IHM e nas formulações LOE e LOC, no ensaio de robustez. Como pode ser observado, os valores de DPR foram adequados para as três formulações, demonstrando que o método é robusto nas condições testadas.

**Tabela 7.** Resultados do ensaio de robustez para a formulação IHM, LOE e LOC.

Condição	IHM*	LOE*	LOC*
1	267,80	49,93	47,59
2	266,50	49,82	47,32
3	265,70	49,54	47,15
4	265,30	49,44	46,90
5	264,90	49,45	46,61
6	265,10	49,43	46,74
7	265,70	49,66	46,85
8	265,90	49,66	46,80
9	265,60	49,38	46,69
<b>Média*</b>	265,80	49,60	47,00
<b>DPR (%)</b>	<b>0,33</b>	<b>0,39</b>	<b>0,69</b>

\* em µg/mL em relação ao padrão de AMF analisado na mesma condição cromatográfica da amostra.

#### 4.8 Linearidade

Os parâmetros estatísticos de linearidade são críticos para estimativas de fármacos na rotina e o intervalo depende da aplicação pretendida do método (70-130%, recomendado para uniformidade de conteúdo). Duas faixas de concentração foram avaliadas, pois as formulações possuem diferentes procedimentos de extração e concentrações. A formulação IHM é uma solução hidrofílica contendo alta dosagem de AMF e, por esta razão, foi escolhido um alvo analítico de concentração de 250 µg/mL. Além disso, para estudos de estabilidade, são utilizadas as maiores concentrações de fármacos compatíveis com a técnica, uma vez que os produtos de degradação têm mais chances de serem descobertos e elucidados. O Loceryl® creme foi, certamente, a formulação com maiores dificuldades para extração e precisou-se de mais solvente para extrair a AMF, o que resultou em menor concentração alvo (50 µg/mL).

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas padrão para cada faixa de concentração, sendo que cada amostra foi analisada em triplicata (três injeções por amostra).

#### **4.8.1 Linearidade AMF 1 e AMF 2**

O preparo das amostras está descrito abaixo. As diluições para avaliação da linearidade foram preparadas empregando o diluente 1 (etanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (50:50 v/v)). Para as duas curvas preparadas a faixa de 70-130% foi empregada.

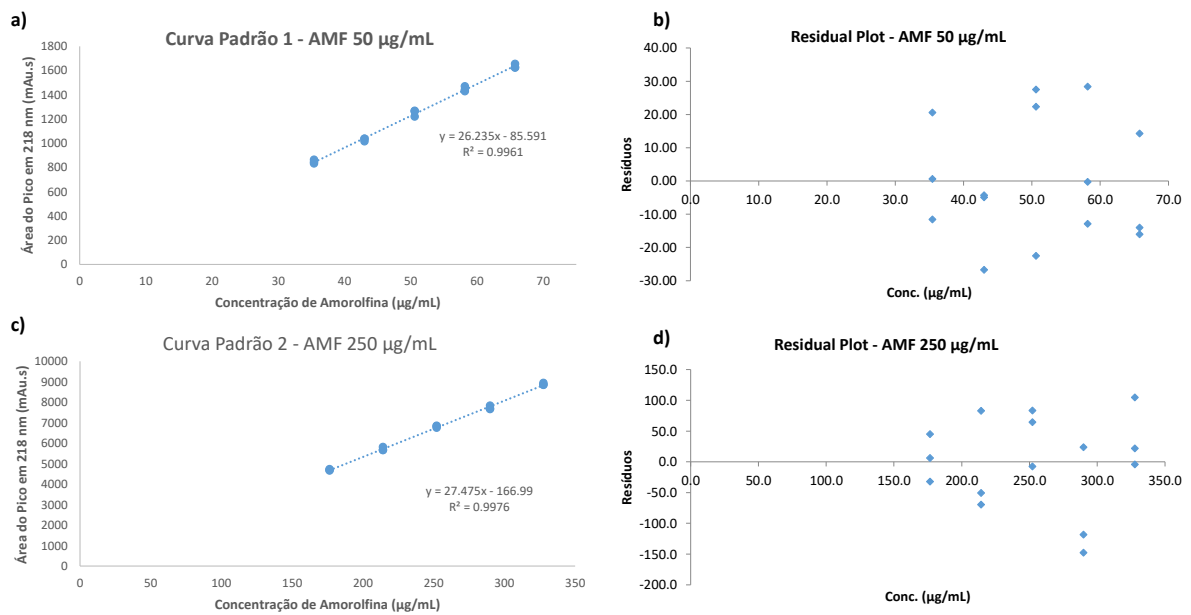
*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF1) – Curva Padrão 1:* Transferiu-se 25,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 50 mL, solubilizou-se em 2 mL de etanol e completou-se o volume com diluente 1 (conc. 500 µg/mL). A SE AMF1 foi diluída com diluente 1 para obter-se as concentrações de 35,0; 42,5; 50,0; 57,5 e 65,0 µg/mL de AMF.

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF2) – Curva Padrão 2:* Transferiu-se 25,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 25 mL, solubilizou-se em 2 mL de etanol e completou-se o volume com diluente 1 (conc. 1000 µg/mL). A SE AMF2 foi diluída com diluente 1 para obter-se as concentrações de 175,0; 212,5; 250,0; 287,5 e 325,0 µg/mL de AMF.

#### **4.8.2 Resultados e discussão**

A Figura 13 apresenta os gráficos das curvas padrão e resíduos obtidos nas análises da linearidade, bem como a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).





**Figura 13.** Representação gráfica das curvas padrão ((a) e (c)) e gráfico dos resíduos ((b) e (d)) para diferentes concentrações da AMF).

A Tabela 8 apresenta o resumo dos resultados correspondentes à análise de regressão linear dos dados determinados a partir das curvas de concentração da AMF vs área do pico em 218 nm.

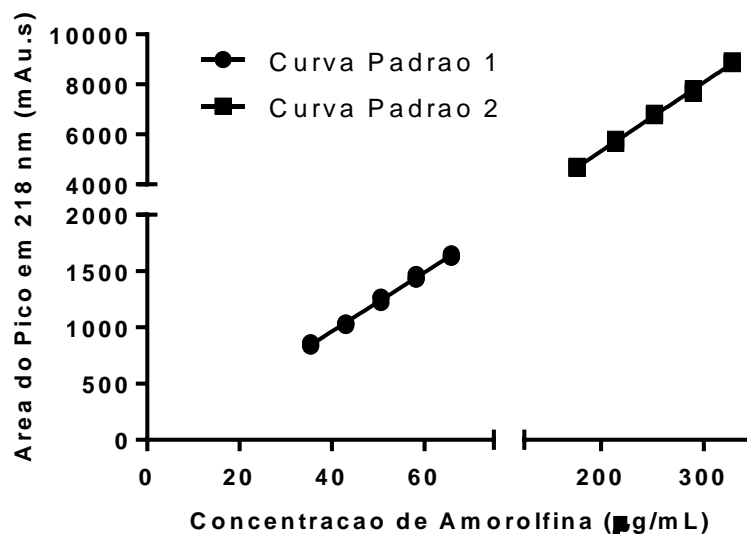
**Tabela 8.** Resumo dos resultados da análise estatística das curvas padrão de AMF. Resultados Detalhados no Anexo II.

Parâmetro	Curva Padrão 1	Curva Padrão 2
Ponto Central (µg/mL)	50,0	250,0
Faixa 70 – 130% (µg/mL)	35,0 – 65,0	175,0 – 325,0
Inclinação	26,24	27,48
Intercepto	-85,59	-166,99
r (coeficiente de correlação)	0,9980	0,9988
ANOVA Regressão (valor-p)	$5,04 \cdot 10^{-17}$	$1,79 \cdot 10^{-18}$
DPR <sub>reg</sub> (%)	1,43	1,11
Resíduos Padronizados (mínimo; máximo)	(-1,46; 1,55)	(-2,00; 1,41)

Os resultados obtidos na análise da linearidade para ambos os alvos de concentração apresentaram-se satisfatórios. A análise de ANOVA mostra regressão linear significativa ( $p < 0,001$ ), a correlação entre concentração e a resposta é fortemente positiva ( $r > 0,995$ ) e as parcelas residuais não demonstraram tendência. Estes resultados comprovam a relação direta entre a concentração de AMF e a área do pico a 218 nm descrita por um modelo de regressão linear simples.

O desvio padrão da regressão (DPRreg) é uma medida padronizada da dispersão da área do pico e sua dimensão é um bom parâmetro para a avaliação da variabilidade dos resultados da linearidade. Os valores de DPRreg inferiores a 2,0% foram considerados adequados, uma vez que devem atender aos limites de DPR esperados para o ensaio de precisão (ERMER e PLOSS, 2005).

A título de investigação as curvas padrão 1 e 2 foram comparadas estatisticamente com auxílio do Programa GraphPad Prism 6 (Figura 14). Caso as duas curvas estejam na faixa linear do detector é esperado que suas inclinações e interceptos sejam equivalentes. Altura de pico muito baixa ( $<1$  mAu) ou muito alta ( $>1000$  mAu) costumam alterar a inclinação e/ou intercepto. As curvas padrão 1 e 2 foram testadas e as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,36$  e  $0,96$ , para inclinação e intercepto, respectivamente – ver Anexo III para maiores detalhes). Estes resultados demonstram que ambas as curvas padrão são equivalentes e que estão dentro da faixa linear do detector de arranjo de diodos (faixa linear de  $10^3$ ) com altura dos picos nas faixas de 80 – 160 e 400 – 800 mAu, aproximadamente, para as curvas padrão 1 e 2, respectivamente.



**Figura 14.** Representação gráfica das curvas padrão 1 e 2 da AMF, utilizadas na comparação das regressões lineares.

#### 4.9 Avaliação da precisão

Para avaliação da precisão, enfrentou-se algumas dificuldades com as formulações Loceryl®. Tentou-se, primeiramente, pipetar o volume de LOE, mas os resultados obtidos foram bastante discrepantes, dessa forma passou-se a pesar o volume de LOE, para assim conseguir-se melhores resultados, e tratando-se de forma farmacêutica volátil precisou-se pesar diretamente no balão volumétrico (BV). Existiram dificuldades também com o LOC, na extração da AMF do creme. Inicialmente diluiu-se a formulação em BV de 5 mL mas a quantidade de AMF não foi satisfatória, então modificou-se a diluição para BV de 25 mL, concluindo-se a necessidade de maior quantidade de diluente para uma melhor extração e consequente redução da concentração de AMF na solução de análise.

Após o alinhamento dessas questões, a precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), sendo expressa pela análise dos desvios padrão relativos (DPR). A avaliação foi realizada com amostras da formulação IHM, Loceryl® creme e Loceryl® esmalte.

#### **4.9.1 Avaliação da precisão da formulação IHM**

Para avaliação da precisão da formulação IHM foram preparadas seis amostras distintas e duas soluções padrão, sendo cada uma delas analisada em triplicata (três injeções de cada amostra e padrão). O preparo das amostras está descrito abaixo.

*H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%:* 0,1 mL de ácido fosfórico reagente e água para 100 mL.

*Diluyente 1:* etanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (50:50 v/v).

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF2):* Transferiu-se 25,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 10 mL, solubilizou-se em 2 mL de etanol e completou-se o volume com diluyente 1. A SE AMF2 foi diluída com diluyente 1 para obter-se a concentração de 250,0 µg/mL de AMF.

*Solução amostra IHM:* Transferiu-se 85 µL da formulação IHM para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluyente 1.

#### **4.9.2 Avaliação da precisão do Loceryl® creme (LOC)**

Para avaliação da precisão do Loceryl® creme foram preparadas seis amostras distintas e duas soluções padrão, sendo cada uma delas analisada em triplicata (três injeções de cada amostra e padrão). O preparo das amostras está descrito abaixo.

*Diluyente 2:* etanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (2:1 v/v).

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF1):* Transferiu-se 25,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 10 mL, solubilizou-se em 2 mL de etanol e completou-se o volume com diluyente 2. Após transferiu-se 500 µL da SE AMF para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com diluyente 2 (conc. final 50 µg/mL).

*Solução amostra LOC:* Pesou-se em béquer, 500 mg Loceryl® creme, adicionou-se 500 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% e misturou-se com espátula, repetiu-se a adição de 500 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% e misturou-se por mais duas vezes. Adicionou-se 1 mL de diluente 2, misturou-se e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Repetiu-se a adição de diluente 2 por mais três vezes até total transferência do creme para o balão volumétrico. Completou-se o volume do balão volumétrico com diluente 2 e agitou-se. Filtrou-se primeiramente com papel filtro quantitativo (Quanty JP42 – 80g/m<sup>2</sup> poro 8 µm, permeabilidade do ar: 3l/s m<sup>2</sup>) e após com filtro de seringa (0,45 µm PVDF).

#### **4.9.3 Avaliação da precisão do Loceryl® esmalte (LOE)**

Para avaliação da precisão do Loceryl® esmalte foram preparadas seis amostras distintas e duas soluções padrão, sendo cada uma delas analisada em triplicata (três injeções de cada amostra e padrão). O preparo das amostras está descrito abaixo.

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF1):* preparada como descrito no item 4.9.2.

*Solução amostra LOE:* Transferiu-se aproximadamente 16 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% para balão volumétrico de 50 mL, pesou-se o volume de 50 µL Loceryl® esmalte em balança analítica, diretamente no balão volumétrico, completou-se o volume com etanol absoluto e agitou-se. Filtrou-se com filtro de seringa (0,45 µm PVDF).

#### **4.9.4 Resultados e discussão**

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A repetibilidade expressa a variabilidade analítica sob as mesmas condições durante um curto intervalo de tempo (dentro do ensaio, intra-ensaio). Sugere-se a realização de pelo menos nove determinações abrangendo um intervalo especificado ou seis determinações a 100%. Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR),

também conhecido como coeficiente de variação (CV), que requer valores de 1 a 2% (ICH, 2005; ERMER e MILLER, 2005; BRASIL, 2017).

Conforme descrito na Tabela 9, os resultados de repetibilidade, em 2 dias de análise, gerando 12 determinações, foram calculados pela média do desvio padrão relativo (DPR) das duas análises. Para a precisão interdia, calculou-se a média do DPR das 12 determinações de repetibilidade. Os valores percentuais médios encontrados no doseamento das amostras, bem como os resultados de DPR obtidos foram satisfatórios, demonstrando a precisão do método.

**Tabela 9.** Resumo dos resultados referentes à avaliação da precisão para as diferentes formulações contendo amorolfina (AMF). Resultados Detalhados no Anexo IV.

Resumo da Precisão	Conc. AMF <sup>a</sup>	Precisão Intermediária <sup>b</sup>	Repetibilidade <sup>c</sup>	Rep. Inj. <sup>a</sup>
Formulação IHM *	104,20%	1,32%	1,35%	0,15%
LOE **	97,40%	1,63%	1,21%	0,34%
LOC***	96,20%	1,58%	1,49%	0,21%

concentração: \*3%; \*\*5%; \*\*\*0,25% de cloridrato de amorolfina

<sup>a</sup> média de 12 determinações

<sup>b</sup> DPR de 12 determinações

<sup>c</sup> média do DPR das 2 repetibilidades

A partir dos valores de DPR obtidos entre as concentrações das amostras, pode-se afirmar que o método proposto apresentou resultados adequados e de acordo com as especificações.

#### 4.10 Avaliação da exatidão

Para a análise da exatidão da formulação IHM foi utilizado o método de adição do padrão, na qual foram adicionadas quantidades conhecidas do analito à solução placebo. No caso das formulações Loceryl<sup>®</sup>, por apresentarem uma matriz complexa, quantidades conhecidas do padrão foram adicionadas à solução amostra.

#### 4.10.1 Avaliação da exatidão da formulação IHM

Para avaliação da exatidão da formulação IHM foram preparadas amostras em três diferentes concentrações, em triplicata, as quais estão apresentadas na Tabela 10. O preparo das amostras está descrito a seguir.

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF2):* Transferiu-se 250,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 10 mL, solubilizou-se em 4 mL de etanol e completou-se o volume com água purificada. (conc. 25 mg/mL).

*Placebo:* Foi preparado como descrito no item 4.3, porém sem a adição da amorolfina.

**Tabela 10.** Preparo das amostras utilizadas na exatidão da formulação in house made - IHM

Nível	SE AMF2 (µL)	Placebo (µL)	Volume Final
Baixo	70	85	10 mL
Médio	100	85	10 mL
Alto	130	85	10 mL
Padrão	100	0	10 mL
Placebo	0	85	10 mL

#### 4.10.2 Avaliação da exatidão do Loceryl® creme (LOC)

Para avaliação da exatidão do Loceryl® creme foram preparadas amostras em três diferentes concentrações, em triplicata, as quais estão apresentadas na Tabela 11. O preparo das amostras está descrito abaixo.

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF 1):* Transferiu-se 50,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 50 mL, solubilizou-se em 5 mL de etanol e completou-se o volume com diluente 2. (conc. final 1000 µg/mL).

*Solução amostra LOC:* Pesou-se em béquer, 250 mg de Loceryl® creme, adicionou-se o volume de SE AMF indicado na tabela e misturou-se com espátula, adicionou-

se 500 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% e misturou-se por mais duas vezes. Adicionou-se 800 µL de diluente 2, misturou-se e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Repetiu-se a adição de diluente 2 por mais três vezes até total transferência do creme para o balão volumétrico. Completou-se o volume do balão volumétrico com diluente 2 e agitou-se. Filtrou-se primeiramente com papel filtro quantitativo (Quanty JP42 – 80g/m<sup>2</sup> poro 8 µm, permeabilidade do ar: 3l/s m<sup>2</sup>) e após com filtro de seringa (0,45 µm PVDF).

**Tabela 11.** Preparo das amostras utilizadas na exatidão do Loceryl® creme

Nível	LOC (mg)	SE AMF (µL)	Volume Final
Baixo	250	250	25 mL
Médio	250	625	25 mL
Alto	250	1000	25 mL
Controle	250	0	25 mL
Padrão	0	500	10 mL

#### 4.10.3 Avaliação da exatidão do Loceryl® esmalte (LOE)

Para avaliação da exatidão do Loceryl® esmalte foram preparadas amostras em três diferentes concentrações, em triplicata, as quais estão apresentadas na Tabela 12. O preparo das amostras está descrito abaixo.

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF 1):* Preparada conforme descrito no item 4.10.2.

*Solução amostra LOE:* Transferiu-se aproximadamente 16 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% para balão volumétrico de 50 mL, pesou-se o volume de 25 µL de Loceryl® esmalte em balança analítica, diretamente no balão volumétrico, adicionou-se o volume de SE AMF indicado na tabela, completou-se o volume com etanol absoluto e agitou-se. Filtrou-se com filtro de seringa (0,45 µm PVDF).



**Tabela 12.** Preparo das amostras utilizadas na exatidão do Loceryl® esmalte

Nível	LOE (µL)	SE AMF (µL)	Volume Final
Baixo	25	500	50 mL
Médio	25	1250	50 mL
Alto	25	2000	50 mL
Controle	25	0	50 mL
Padrão	0	500	10 mL

#### **4.10.4 Resultados e discussão**

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo com relação a um valor aceito como verdadeiro, e deve ser verificada a partir de, pelo menos, nove determinações, envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração, contemplando uma média de recuperação entre 98-102% e um desvio padrão relativo menor que 2 (ERMER e MILLER, 2005).

Para o ensaio de exatidão as amostras foram analisadas em três níveis de concentração (baixo, médio e alto). Como pode-se observar na Tabela 13, os valores das médias de recuperação são 100,1, 100,5 e 100,7% com média de DPR 1,50, 1,39 e 0,93% para a formulação IHM, Loceryl® esmalte e Loceryl® creme, respectivamente. Além disso, os intervalos de 95% para as médias incluem 100,0%.

**Tabela 13.** Resultados referentes à avaliação da exatidão.

Resumo da Exatidão	DPR (n=9)	Média (n=9)	IC95%
Formulação IHM	1,50%	100,10%	98,9-101,2
LOE	1,39%	100,50%	99,4-101,5
LOC	0,93%	100,70%	100,0-101,4

A partir dos resultados obtidos no teste de exatidão, verificado pelo princípio da recuperação, o método apresentou-se satisfatório.

#### **4.11 Conclusões**

Entre os fatores avaliados para o desenvolvimento do método por CLAE-DAD para análise da amorolfina, a concentração do tampão fosfato apresentou grande influência na performance do sistema cromatográfico. As altas concentrações de tampão fosfato (250 mM em pH 2,25) não apresentaram grandes desafios instrumentais e o sistema cromatográfico funcionou adequadamente com reprodutibilidade de resultados.

O método desenvolvido e validado apresentou especificidade, linearidade, robustez, precisão e exatidão adequadas para quantificação da amorolfina na formulação IHM, Loceryl<sup>®</sup> esmalte e Loceryl<sup>®</sup> creme.

## **5. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA AMOROLFINA E IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO**



## 5.1 Introdução

Os estudos de estabilidade têm como objetivo adquirir informações sobre a qualidade de um fármaco ou medicamento e sua variação em função do tempo, sob a interferência de diversos fatores como a exposição à temperatura, umidade e luz. No entanto, existem outros fatores de risco que podem ter impacto na estabilidade do produto, relacionados a fatores internos como a reatividade dos ingredientes ativos, excipientes e material de embalagem, bem como as interações entre esses componentes. Estes riscos são reduzidos pelo teste de estresse que deve fazer parte do desenvolvimento do produto. Em vista disso, é de extrema importância a avaliação da estabilidade, que pode ser investigada através de estudos de estabilidade acelerada, estudos de acompanhamento e estudos de longa duração (HUYNH-BA, 2009; BRASIL, 2015).

Os testes de estabilidade forçada ou testes de estresse, devem ser realizados em condições mais severas de degradação, excedendo as condições utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada. A exposição do fármaco ou do produto acabado às condições de estresse, como estresse térmico, hidrólise ácida e básica, oxidação e fotólise, fornece informações valiosas a respeito da estabilidade intrínseca da molécula, permitindo elucidar possíveis produtos de degradação, determinar sua segurança e desenvolver análises e procedimentos para quantificar estas novas espécies químicas. Nesse contexto, estes testes são indispensáveis para o desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade (ICH, 2003; ALSANTE *et al.*, 2007; BAERTSCHI *et al.*, 2016).

Dessa forma, a degradação de uma substância pode gerar inúmeras alterações e por isso torna-se importante avaliar a estabilidade da mesma, para garantir que o produto atenda suas especificações durante todo o período de armazenamento. Ao considerar-se essas informações e com o propósito de expandir o conhecimento, decidiu-se determinar a estabilidade da amorolfina e a cinética de degradação do fármaco.

## 5.2 Estabilidade da solução padrão e degradação forçada da amorolfina

As soluções de AMF (SQR - Padrão), ácido, base e peróxido foram preparadas como descrito a seguir e misturadas conforme Tabela 14.

*Solução estoque amorolfina (SE AMF):* Transferiu-se 150,0 mg de AMF para balão volumétrico de 5 mL, solubilizou-se em 3,5 mL de etanol e completou-se o volume com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (conc. 30.000 µg/mL).

*Solução de ácido clorídrico 1M (HCl):* Transferiu-se 4,15 mL de HCl para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com etanol 67% (v/v).

*Solução de hidróxido de potássio 1M (KOH):* Transferiu-se 2,8 g de KOH para balão volumétrico de 50 mL, solubilizou-se com 40 mL de etanol 67% (v/v) e completou-se o volume com etanol 67% (v/v).

*Solução de peróxido de hidrogênio 5% (SPH):* Transferiu-se 1,67 mL de peróxido de hidrogênio para balão volumétrico de 10 mL, solubilizou-se com 6 mL de etanol e completou-se o volume com água (v/v).

*Padrão de AMF:* Transferiu-se 20,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 25 mL, solubilizou-se em 2 mL de etanol e completou-se o volume com diluente 1 (Solução Estoque – SE AMF). A SE AMF foi diluída com diluente 1 para obter-se a concentração de 200,0 µg/mL de AMF (3 réplicas). As soluções padrão foram filtradas (0,45 µm PVDF) para vial e analisadas pelo método de CLAE-DAD validado (descrito no Capítulo 1) nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 dias.

**Tabela 14.** Preparo das soluções e condições da degradação forçada.

<b>Tipo de Degradação Forçada</b>	<b>SE AMF</b>	<b>Agente de Degradação</b>	<b>Réplicas</b>	<b>pH<sup>c</sup></b>	<b>Amostragem (dias)</b>
<b>Controle<sup>a</sup></b>	680 µL	170 µL de Diluente 1	3	3,0	1,2,3 e 4
<b>Ácido<sup>a</sup></b>	680 µL	170 µL de HCl 1M	2	1,0	1,2,3 e 4
<b>Alcalino<sup>a</sup></b>	680 µL	170 µL de KOH 1M	2	12,0	1,2,3 e 4
<b>Oxidativo<sup>b</sup></b>	680 µL	170 µL de SPH 5%	2	4,0	1,2,3 e 4

<sup>a</sup> Mantidos em vial de vidro hermético à temperatura ambiente.

<sup>b</sup> Mantido em vial de vidro hermético âmbar à temperatura ambiente.

<sup>c</sup> Medido com fita de pH Merck®

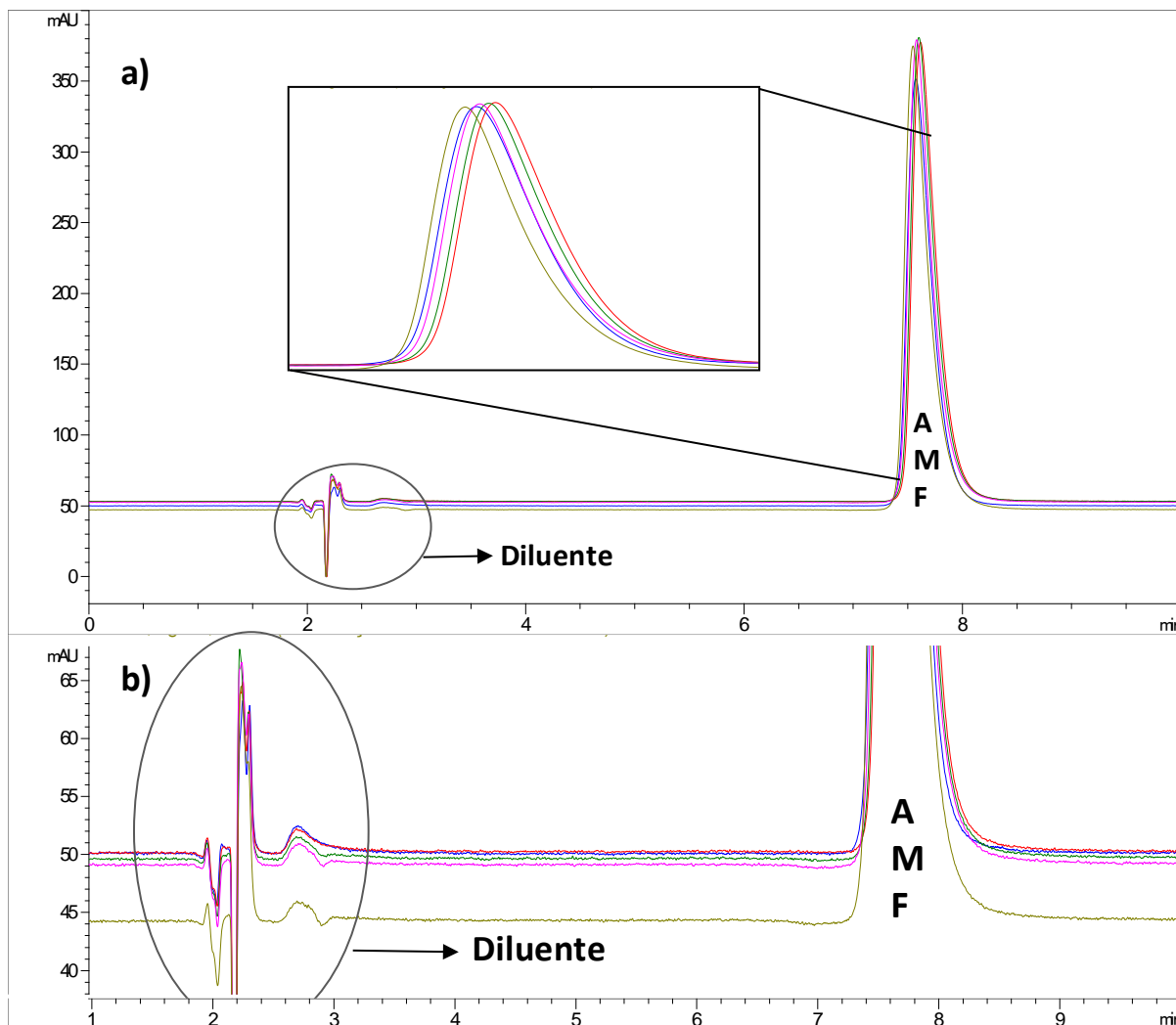
Em cada tempo descrito na Tabela 14, 85 µL das amostras foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e volume completado com etanol 67% (v/v). As amostras foram filtradas (0,45 µm PVDF) para vial (concentração teórica aproximada de 200 µg/mL de AMF) e analisadas pelo método de CLAE-DAD validado.

## **5.2.1 Resultados e discussão**

### **5.2.1.1 Estabilidade da solução padrão**

Três réplicas do padrão (sem adição de agentes químicos para degradação) foram mantidas e analisadas durante 4 dias. Os critérios definidos para estabelecer a estabilidade do padrão foram: 1) não haver picos secundários, além daqueles relacionados ao diluente; 2) o pico da AMF manter o tempo de retenção e ser espectroscopicamente puro (peak purity > 995 e curva de similaridade não atravessar a curva “threshold”); 3) o percentual de AMF se manter na faixa de 98,0 – 102,0% (arbitrariamente o tempo zero foi considerado 100% e as áreas dos picos dos demais tempos foram relacionadas com o tempo zero para obtenção dos percentuais em função do tempo).

A Figura 15 apresenta os resultados cromatográficos e espectroscópicos representativos da análise da solução padrão de AMF 200 µg/mL. Não se verificou a presença de picos secundários nos padrões contendo 40 e 200 µg/mL de padrão de AMF.



**Figura 15.** Análise da estabilidade do padrão de AMF (200 µg/mL). a) cromatogramas sobrepostos da solução padrão de AMF nos tempos: 0, 1, 2, 3 e 4 dias com ampliação dos picos; b) ampliação do cromatograma para melhor visualização da linha de base e ausência de picos secundários.

Os parâmetros cromatográficos dos padrões de AMF encontram-se resumidos na Tabela 15. Durante os quatro dias de análise, os parâmetros mantiveram-se reprodutíveis. Além disso, não foi detectada impureza na análise da pureza de pico. Os resultados da quantidade de padrão de AMF em função do tempo ficaram na faixa de 98,0 – 102,0% e a variação dos resultados pode ser explicada pelo erro analítico.



**Tabela 15.** Resumo dos resultados da estabilidade da solução padrão de AMF a 40 e 200 µg/mL.

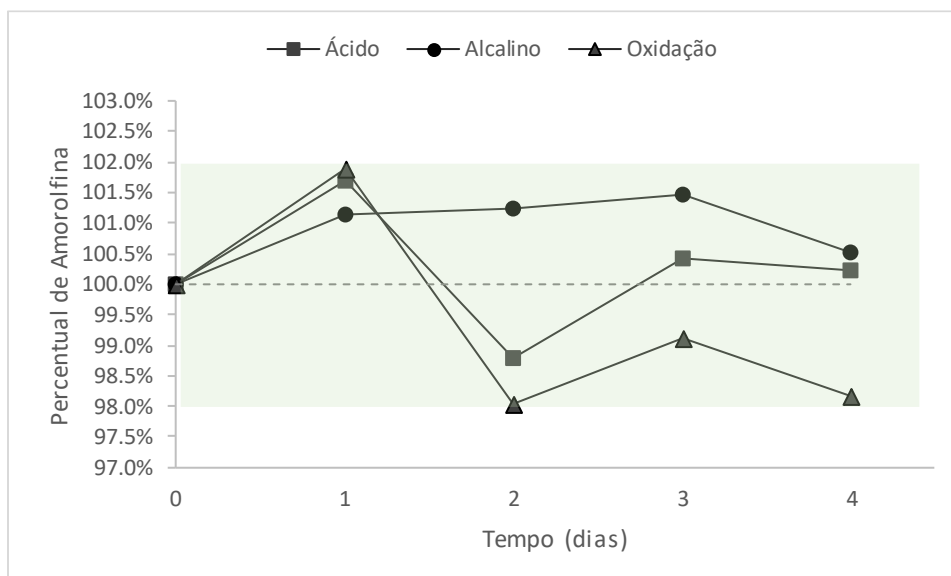
<b>Padrão (µg/mL)</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>AMF (Média - DP)<sup>a</sup></b>	<b>Tr (min)<sup>a</sup></b>	<b>Pureza<sup>a</sup></b>
<b>40</b>	0	100,0% - 0,27%	7.60	999.8
	1	101,8% - 0,52%	7.65	999.8
	2	100,6% - 0,51%	7.63	999.9
	3	99,6% - 0,58%	7.61	999.8
	4	98,6% - 0,52%	7.59	999.8
<b>200</b>	0	100,0% - 0,42%	7.56	999.9
	1	99,4% - 1,21%	7.61	999.9
	2	99,4% - 1,23%	7.59	999.9
	3	99,3% - 1,20%	7.57	999.9
	4	99,5% - 1,35%	7.54	999.9

<sup>a</sup> n=3.

Os resultados cromatográficos relacionados à ausência de picos secundários, manutenção do tempo de retenção e pureza espectroscópica, além do teor ter se mantido próximo a 100%, para os padrões de 40 e 200 µg/mL, indicam que a solução padrão de AMF é estável por pelo menos 4 dias, em vials transparentes no auto-injetor à temperatura ambiente.

#### **5.2.1.2 Degradação forçada da amorolfina**

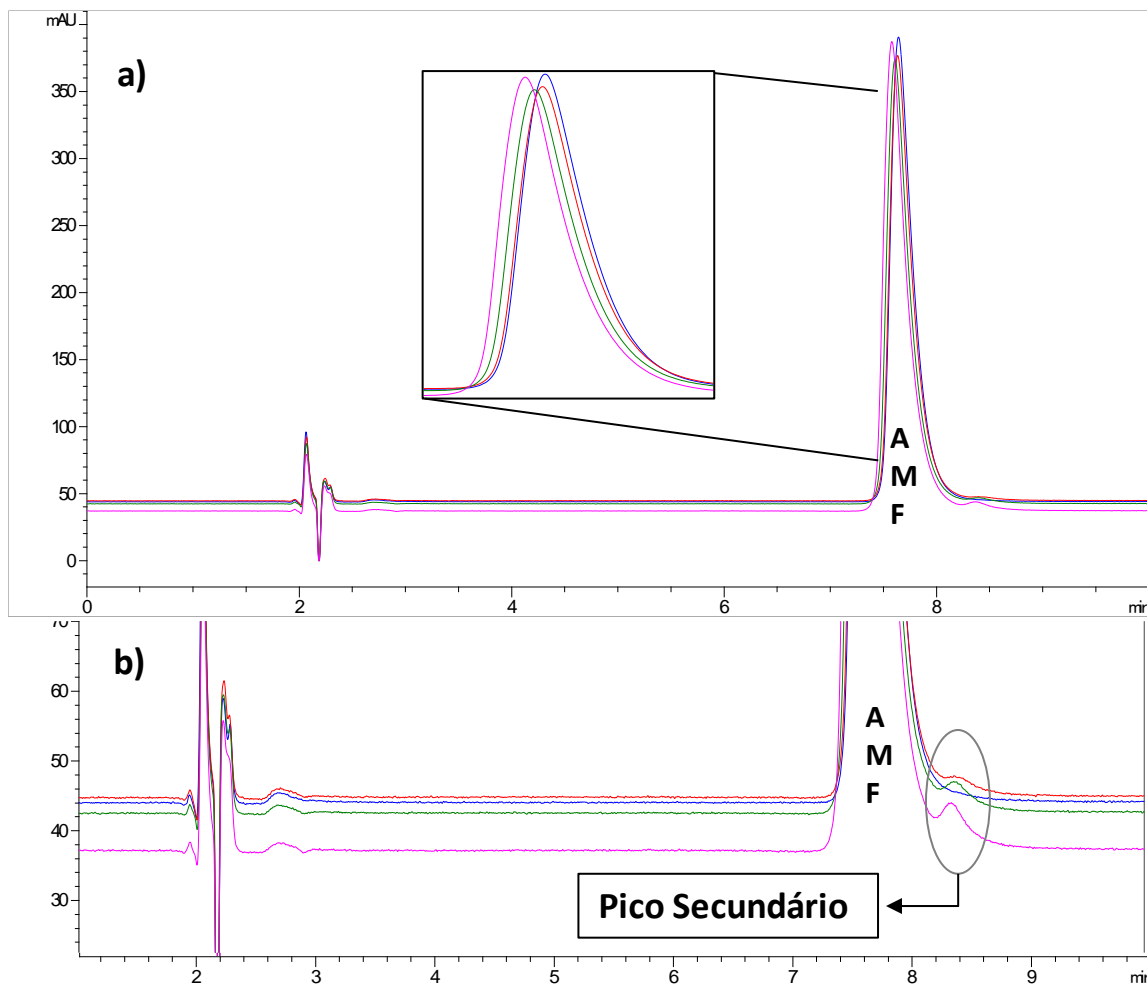
Soluções de AMF foram submetidas à degradação forçada em meio ácido, básico e oxidativo. Os critérios para caracterização da estabilidade nestas condições foram os mesmos empregados para solução padrão (item 5.2.1.1). O tempo de retenção, pureza de pico e teores de AMF (Figura 16) mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos para as três condições testadas.



**Figura 16.** Estabilidade da AMF a 200 µg/mL em função do tempo para diferentes condições de degradação. Ácido – pH 1,0; Alcalino – pH 12,0; Oxidação – pH 4,0 e Peróxido de hidrogênio 1%. Marcadores – média, n=2.

Nas condições ácida e básica não se verificou a presença de picos secundários indicando que a AMF é estável nestes meios por pelo menos 4 dias à temperatura ambiente. Na condição oxidativa, a partir do terceiro dia, foi possível verificar a presença de um pico secundário, ao lado do pico da AMF (Figura 17). O pico secundário, apesar de pequeno, não permitiu estabelecer a AMF como sendo estável na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1% e novos estudos foram realizados para comprovação da degradação.

Além disso, esta análise foi realizada com metanol 64% e temperatura do forno igual a 30 °C (demais condições do sistema cromatográfico descritos no Capítulo I item 4.5), porém os picos da AMF e do degradado não apresentaram adequada resolução. Após alguns testes, verificou-se que a redução do metanol para 62% e aumento da temperatura do forno para 45 °C acabou por resolver os picos em questão ( $R_s > 2,5$ ) com pressão menor que 200 bar. Estas condições foram utilizadas nos demais estudos de degradação e na validação do método analítico.



**Figura 17.** Análise da estabilidade da AMF (200 µg/mL) em condições oxidativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% e pH 4,0). a) cromatogramas sobrepostos da solução de AMF em condições oxidativas nos tempos: 1, 2, 3 e 4 dias com ampliação dos picos; b) ampliação do cromatograma para melhor visualização da linha de base e presença de pico secundário.

### 5.3 Avaliação da degradação oxidativa da amorolfina

Aminas terciárias, como a AMF, apresentam tendência em formar N-óxidos durante o armazenamento a longo prazo (exemplo: raloxifeno em comprimidos) (HARTAUER *et al.*, 2000). Em solução, a oxidação de aminas terciárias é um processo dependente do pH e quando ionizadas, a taxa de oxidação é bastante reduzida (BAERTSCHI *et al.*, 2016).

Estudo da degradação da AMF em diferentes pH foi realizado. Amostras de AMF 250 µg/mL foram submetidas a peróxido de hidrogênio a 3% em diferentes valores de pH (faixa 2,9 - 10,8) à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo avaliadas por método de CLAE-DAD pelo período de 36 horas. As soluções padrão

e tampões foram preparadas como descrito a seguir e o preparo das amostras está exposto na Tabela 16.

*Solução estoque padrão amorolfina (SE AMF):* Transferiu-se 25,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se o volume com etanol (conc. final 2500 µg/mL).

*Solução Tampão:* soluções de fosfato a 140 mM em diferentes pH foram preparadas com auxílio do app Biological Buffer Calculator (John Wiley & Sons) para plataforma Android. Os pH das soluções tampão foram medidos em pHmetro e ficaram na faixa de ± 0,05 do previsto pelo aplicativo.

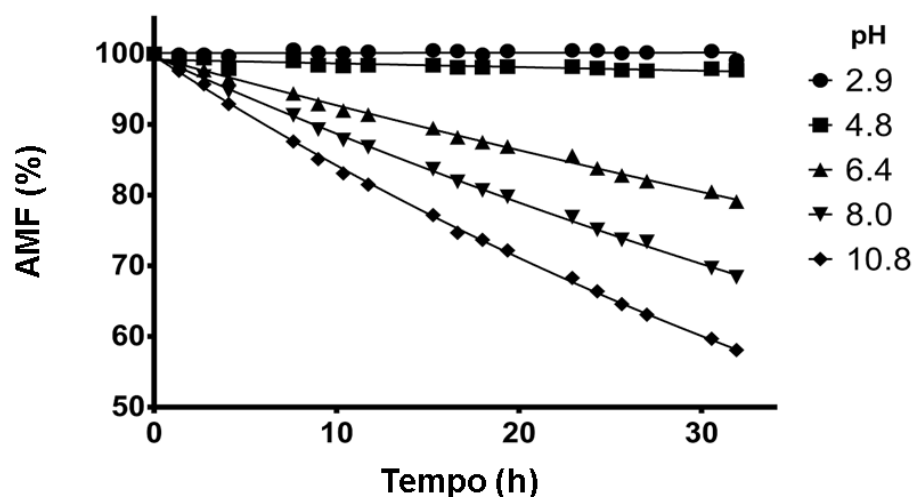
**Tabela 16.** Preparo das amostras utilizadas na degradação da AMF.

pH	SE AMF (mL)	Etanol (mL)	Peróxido 30%(mL)	Vol. Tampão (q.s.p.)
2,9	1	3	1	10 mL
4,8	1	3	1	10 mL
6,4	1	3	1	10 mL
8,0	1	3	1	10 mL
10,8	1	3	1	10 mL
Padrão <sup>a</sup>	1	3	0	10 mL
Branco <sup>a</sup>	0	3	1	10 mL

<sup>a</sup> Padrão e Branco em pH 2,9.

### **5.3.1 Resultados e discussão**

A Figura 18 apresenta os resultados do percentual de AMF em função do tempo para os diferentes pH do meio em condições de degradação oxidativa forçada (peróxido de hidrogênio – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%). O experimento demonstra claramente que a estabilidade da AMF em meio oxidativo é dependente do pH do meio. Em pH 2,9 não se verificou redução no teor de AMF em função do tempo e as variações observadas podem ser explicadas pelo erro analítico (resultados detalhados no Anexo VI).



**Figura 18.** Representação gráfica da cinética de degradação oxidativa da AMF (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) em diferentes pH.

Os perfis foram modelados e melhores ajustes foram obtidos pelo Log da concentração de AMF em função do tempo. A Tabela 17 apresenta as constantes de reação calculadas e os valores de  $t_{90\%}$ . Nota-se um aumento significativo da degradação quando o pH é alterado de 4,8 para 6,4. Isto pode ser explicado pelo valor de pKa da AMF = 6,6 (NEUBERT *et al.*, 2006) e a suposição de que aminas terciárias oxidam mais facilmente quando não ionizadas. À medida que a concentração de AMF não ionizada (NI) aumenta, maior é a constante de reação ( $k$ ) e em pH 10,8 são necessários 6,3 h para o teor de AMF reduzir em 10%.

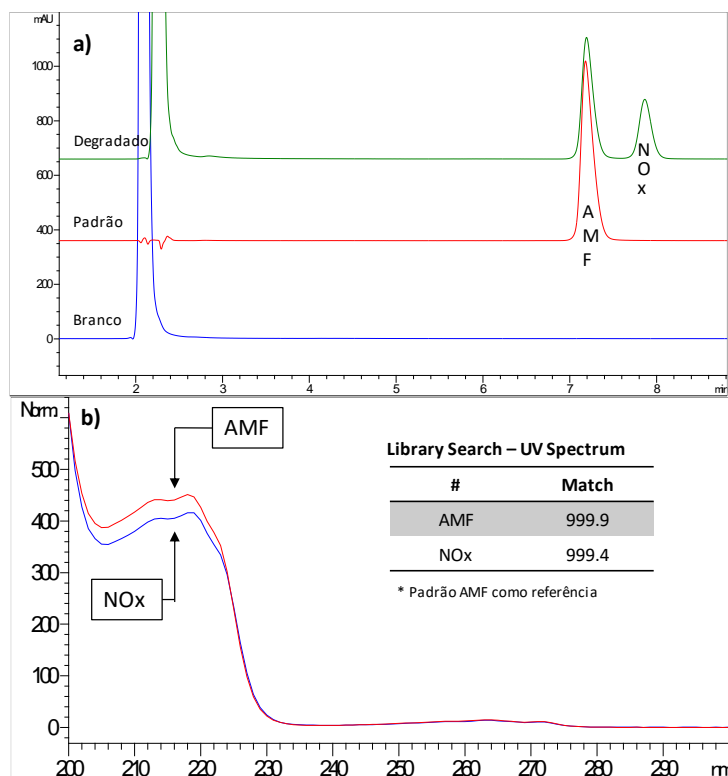
**Tabela 17.** Valores da constante de reação ( $k$  para relação Log [AMF] vs tempo) e de  $t_{90\%}$  para degradação da AMF em meio oxidativo em diferentes pH.

pH	4,8	6,4	8,0	10,8
$k$ (h <sup>-1</sup> )	$7,39 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$1,93 \cdot 10^{-4}$	$2,81 \cdot 10^{-4}$
$t_{90\%}$ (h)	237,7	15,0	9,1	6,3
% Ionizado <sup>a</sup>	98,4	61,3	3,8	<0,1
[AMF] NI (µg/mL) <sup>b</sup>	3,9	96,7	240,4	250,0

<sup>a</sup> estimativa calculada pela equação de Handersson-Hasselbach considerando pKa do grupo amina terciária da AMF igual a 6,6.

<sup>b</sup> estimativa da concentração de AMF não ionizada, em µg/mL.

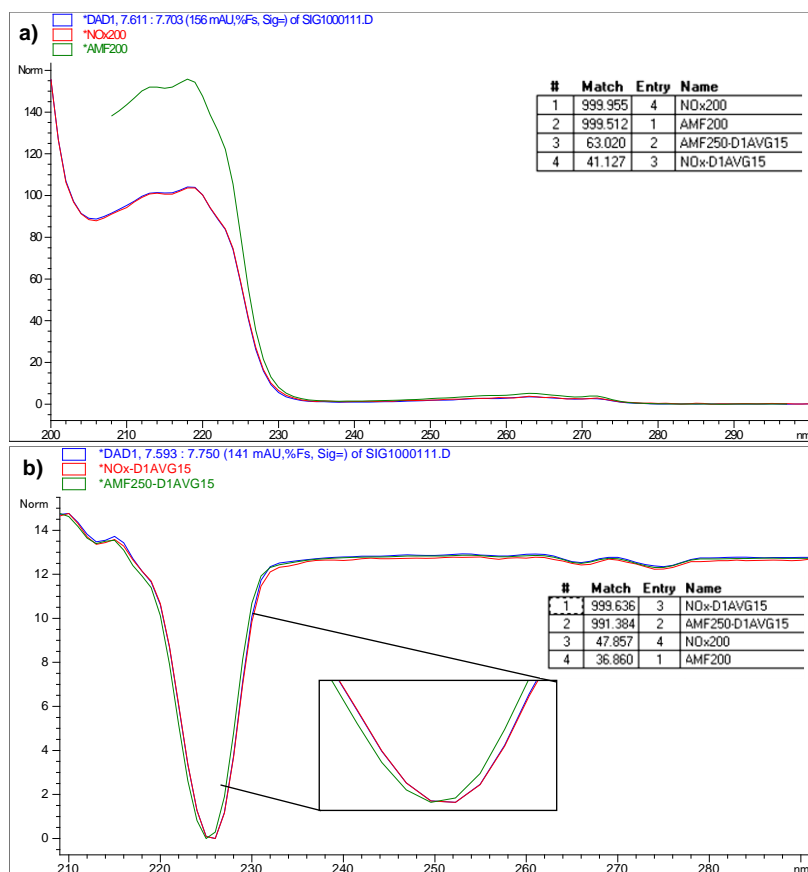
A Figura 19 apresenta os resultados da análise cromatográfica de solução de AMF submetida à degradação em meio oxidativo após 24 h. Nota-se a presença de um segundo pico referente à degradação da AMF com tempo de retenção levemente superior a AMF e com resolução igual a 2,62. Os espectros da AMF e de seu degradado são praticamente idênticos com máximo de absorção em 218 nm. A busca dos espectros da AMF e do degradado (NOx), obtidos da solução degradada, na biblioteca que contém o espectro do padrão de AMF resultou em similaridade superior a 999 para ambos os compostos. Isto indica que, possivelmente, a alteração química ocorrida na molécula da AMF não ocorreu em torno do grupo cromóforo do fármaco (anel aromático e seus substituintes diretos).



**Figura 19.** Resultado representativo da análise da estabilidade da AMF em meio oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) em pH 10,8. a) cromatogramas em 218 nm dos resultados de 24 h para o branco, padrão e degradado; b) espectros dos ápices dos picos da AMF e do N-óxido da AMF (NOx).

O detector DAD e o software Agilent Chemstation podem gerar derivadas (dA/dλ) dos espectros UV e estes contêm maior número de máximos e mínimos que podem ser extremamente úteis para identificar e rastrear picos (CRAWFORD, 2019). Os espectros de UV e UV primeira derivada (UV-d1) da AMF e do degradado (NOx)

foram adicionados à biblioteca do software Agilent Chemstation e a UV-d1 foi capaz de melhor discriminar o NOx da AMF como pode ser visto na Figura 20. É importante ressaltar que a média de 15 pontos foi utilizada para suavizar o espectro que foi derivado e, assim, minimizar o ruído da UV-d1. Um aspecto importante relacionado à interpretação é que o fator de similaridade é um indicativo de quanto as formas, e não a intensidade de sinal, de dois espectros são parecidos. Nota-se que apesar do espectro UV do padrão AMF ter intensidade diferente do espectro UV do NOx (Figura 20.a), suas formas são praticamente idênticas e o fator de similaridade foi calculado como 999,512. Porém, uma pequena alteração na forma dos espectros (máximos de 225 e 226 nm para AMF e NOx, respectivamente), obtida pela UV-d1 (Figura 20.b), reduz o fator similaridade entre UV-d1 da AMF e NOx que apresentaram valor calculado de 991,384, enquanto que o espectro referência do NOx e o espectro teste do NOx mantém alta similaridade (999,636). Estes resultados foram reproduzíveis e confirmam que a UV-d1 é uma potente ferramenta para diferenciar compostos de uma mesma classe que tenham espectros de UV muito parecidos.



**Figura 20.** Comparação de espectros UV e UV-d1 do pico do NOx (estabilidade 24 h em pH 10,8) com a biblioteca do software Agilet Chemstation contendo os espectros de referência do AMF e NOx (purificado). a) espectros de UV e fatores de similaridade (“Match” no quadro) do NOx; b) espectros UV-d1 e fatores de similaridade e ampliação do UV-d1 para melhor visualização da diferença de formas entre espectros UV-d1.

#### 5.4 Purificação do produto de degradação

Para a purificação do produto de degradação da AMF foi utilizada a coluna de separação SPE Finisterre® C18/18, 500 mg/6 mL. A AMF foi degradada em meio oxidativo e pH 10,8 como descrito a seguir para obtenção do degradado – NOx.

*Amostra de degradação da AMF:* Transferiu-se 10,0 mg de padrão de AMF para balão volumétrico de 5 mL, solubilizou-se em 2,5 mL de etanol, adicionou-se 1,75 mL de tampão pH 10,8 e 0,75 mL de peróxido de hidrogênio 30%. Armazenou-se em temperatura ambiente e protegida da luz por sete dias.

Após o sétimo dia de degradação, a purificação da amostra ocorreu da seguinte forma: adicionou-se a solução degradada na coluna SPE e lavou-se com 7 mL de água purificada. O degradado fica retido na coluna. Outras duas lavagens com 7 mL de água foram realizadas para garantir a retirada do tampão fosfato. A



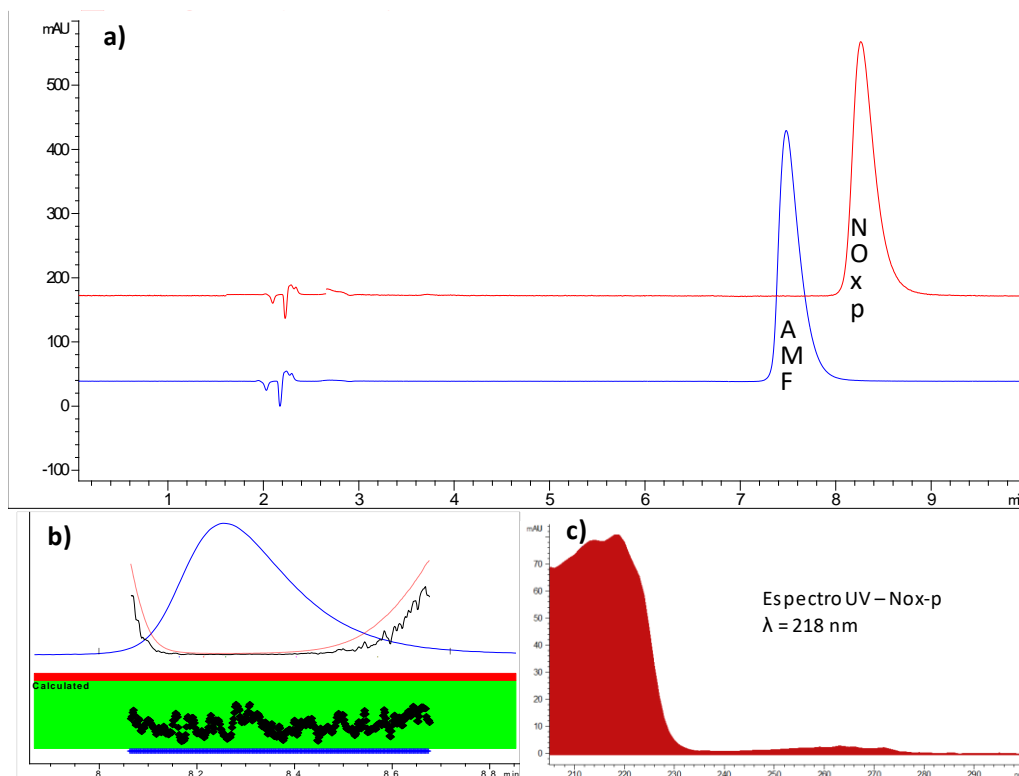
fase aquosa foi descartada. Adicionou-se 10 mL de metanol na coluna SPE e coletou-se o metanol eluído. Novos 10 mL foram adicionados à coluna e o eluente coletado novamente. As frações metanólicas coletadas foram reunidas e secas a 60°C em estufa de circulação. O que resta é um sólido levemente amarelado com rendimento de 7,8 mg que, por conveniência será chamado de NOx-p.

O sólido foi então caracterizado por CLAE-DAD, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e LC-MS.

## **5.5 Caracterização do produto de degradação purificado**

### **5.5.1 CLAE-DAD**

O NOx-p foi analisado pelo método de CLAE-DAD validado (Figura 21). O cromatograma não apresentou pico secundário, o tempo de retenção foi maior do que o do AMF (usado como controle). Não se verificou a presença de impurezas na análise por pureza de pico e o espectro UV do NOx-p é similar ao do AMF. A purificação, por este método, foi considerada satisfatória e o restante da amostra foi submetido aos ensaios de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e massas.



**Figura 21.** Resultados representativos da análise do NOx-p por CLAE-DAD. a) cromatograma em 218 nm do NOx-p com AMF como controle (ambos a 200 µg/mL); b) pureza de pico do NOx-p; c) espectro UV do NOx-p.

### 5.5.2 LC-MS

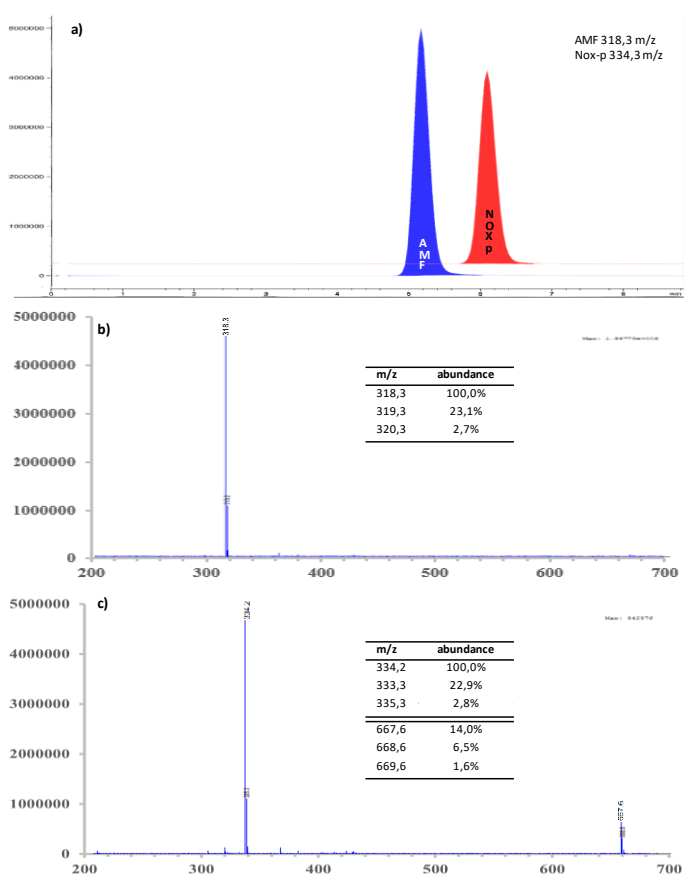
O NOx-p e AMF foram analisados por LC-ESI-MS em sistema Agilent (Santa Clara) com módulos Infinity 1260 (degaseificador, bomba, autoinjeter, forno e detector UV) e detector tipo quadropólo único modelo 6120. As condições cromatográficas para a realização do ensaio estão descritas na Tabela 18.

**Tabela 18.** Condições cromatográficas e do detector de massa para análise da AMF e NOx-p.

Característica	Descrição
Coluna	Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4.6x50 mm, 2.7 µm)
Fase Móvel	ACN:H <sub>2</sub> O:Ác. Fórmico (50:50:0,1 v/v/v)
Vazão	0,35 mL/min
Volume de Injeção	4,0 µL
Temperatura do forno	40 °C
Detecção por massas	Tensão capilar +3.7 kV, fluxo do gás de secagem 12 L/min, pressão do nebulizador 40 psig, temperatura do gás de secagem 280 °C, fragmentador 150 V

A Figura 22 apresenta os resultados do LC-ESI-MS para AMF e NOx-P. Os picos apresentaram boa intensidade de sinal no modo positivo em concentrações de 50 a 1000 ng/mL e as duas substâncias apresentaram pureza de pico. A AMF teve maior abundância na m/z 318,3 referente ao íon molecular  $[M-H]^+$  e, além disso, a sua abundância isotópica encontra-se muito próxima da teórica.

A análise por massas do NOx-p apresentou pico com m/z de 334,2. Um incremento na relação m/z de 15,9 condizente com a adição de um oxigênio à molécula da AMF. A distribuição isotópica em torno do pico de m/z 334,2 possui abundâncias próximas as esperadas para o N-óxido da AMF. Além disso, existe a presença de sinal com m/z 667,6 e seus isótopos que pode ser atribuído ao  $[M_2-H]^+$  - dímero do N-óxido da AMF. Moléculas contendo N-óxidos possuem forte tendência à formação de dímero em análises por massas associadas à cromatografia líquida (ESI e APCI) (JAHOUH *et al.*, 2015; KALARIYA *et al.*, 2015). Estes resultados experimentais reforçam a ideia de que o degradado da AMF é um N-óxido.



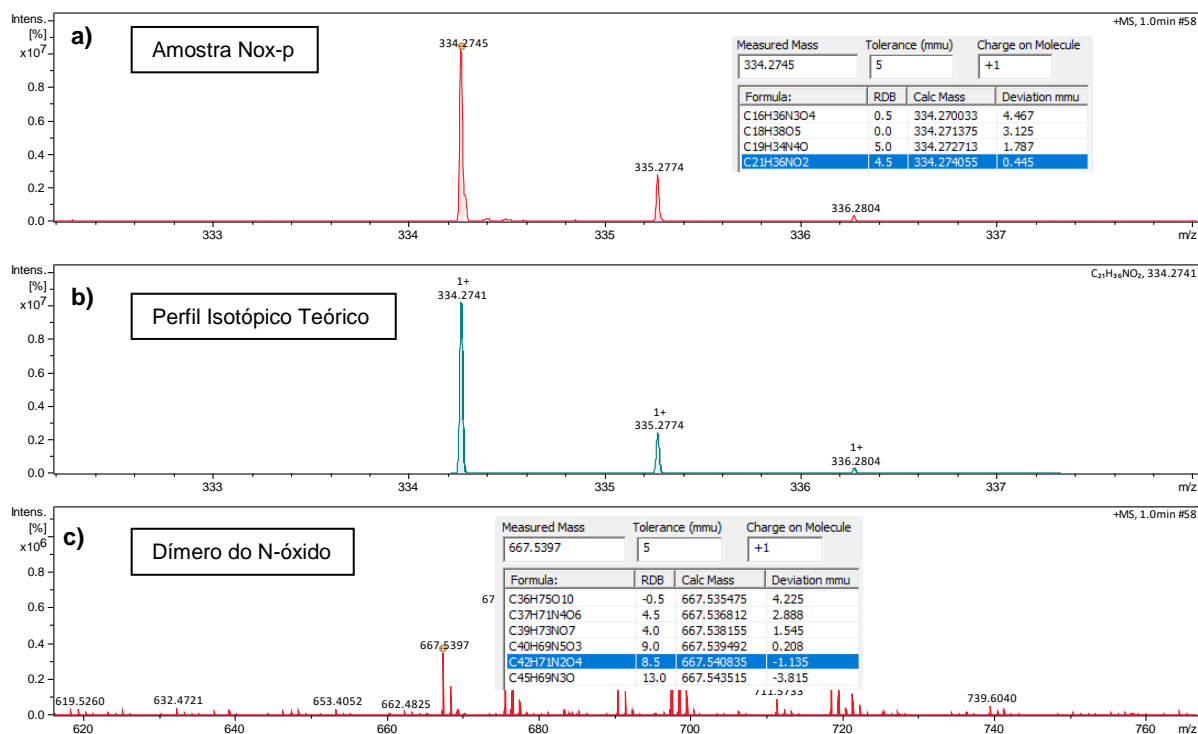
**Figura 22.** Resultados do LC-ESI-MS de baixa resolução para amostras de 1 µg/mL da AMF e do NOx-p. a) cromatogramas da AMF padrão e NOx-p; b) espectro de massas e abundâncias da AMF; c) espectro de massas e abundâncias do NOx-p.

O NOx-p foi analisado com equipamento de massas de alta resolução para complementar as análises de identificação e caracterização do purificado oriundo da degradação oxidativa da AMF e predição da fórmula molecular. A amostra foi submetida a uma infusão direta no LC-QTOF Bruker (Shimadzu®) modelo Nexera x2 Impact II. As condições da análise estão descritas na Tabela 19.

**Tabela 19.** Condições da infusão direta para análise do NOx-p.

Condições na infusão direta	
Fonte/polaridade de íons	APCI/+
Tensão de desvio da placa final	500 V
Corona	4000 Na
Aquecedor APCI	450 ° C
Pressão do Nebulizador	0,4 Bar
Gás Secagem	4 L min <sup>-1</sup>
Temperatura do gás de secagem	200 ° C
Faixa de massa (m / z)	50-1000
Calibração	Formiato de sódio

A Figura 23 apresenta os espectros de massas experimental do NOx-p e teórico para o íon molecular positivo do N-óxido da AMF (C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>2</sub>). Nota-se grande similaridade entre os espectros com m/z experimental de 334,2745 e teórica de 334,2741. A predição do *software* indica o [M-H]<sup>+</sup> do N-óxido da AMF como fórmula elementar com erro de -1.3 ppm (menor erro entre as fórmulas preditas). A análise também apresentou pico com m/z 667,5397 que pode ser associado ao dímero do N-óxido da AMF com erro igual a 1,7 ppm. Estes resultados sustentam o conhecimento teórico e resultados experimentais de que o produto oxidativo da AMF em pH > pKa é seu N-óxido (C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>2</sub> – massa exata 333,2668).



**Figura 23.** Espectros de massas de alta resolução do NOx-p. a) resultado experimental do NOx-p e predição; b) perfil isotópico teórico; c) dímero do N-óxido e predição. Predição realizada no software Elemental Composition Calculator (by Frank Antolasic).

### 5.5.3 RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da AMF e do NOx-p foram obtidos em espectrometro Bruker Ascend™ 400 MHz. Para as análises ambos os compostos foram dissolvidos em metanol deuterado com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os resultados foram adquiridos e processados pelo software Bruker Top Spin 3.2 e analisados no software MestReNova versão 12.0.

As Figuras 24 e 25 apresentam os espectros de RMN do hidrogênio e do carbono da AMF e do NOx-p. É importante ressaltar que a AMF encontra-se na forma de sal, cloridrato, o que torna o nitrogênio mais eletronegativo do que se estivesse na forma de base livre e, por isso, mais semelhante ao N-óxido (estrutura esperada) (LAPLANCHE *et al.*, 1992). A contagem de sinais e o número de hidrogênios foram idênticos para as duas moléculas confirmando que ambas as moléculas possuem 35 hidrogênios. Porém, a atribuição dos deslocamentos foi complexa, pois a presença de dois grupos metileno, em C8 e C11, vizinhos ao

carbono quiral em C9, faz com que os hidrogênios do metileno experimentem ambientes distintos de maneira que ao invés de 2 sinais (1 para os hidrogênios do C8 e outro para os do C11) esperam-se 4 sinais (LEBRUN *et al.*, 1999). O nitrogênio protonado ou na forma de N-óxido tem o mesmo efeito para os metilenos dos C13 e C19. Como todos estes átomos são vizinhos, a região de 2.0 a 3.5 ppm apresentou uma série de sinais de difícil atribuição, incluindo algumas sobreposições. Como as moléculas são muito parecidas a maioria dos átomos de hidrogênio não apresentaram diferença significativa entre os deslocamentos químicos observados para a AMF e para o NOx-p. Estes resultados indicam que não houve grande modificação estrutural na molécula do NOx-p em relação à AMF. As maiores variações ocorreram nos hidrogênios ligados a C11 e C13,19. Contudo, os espectros de RMN <sup>1</sup>H não foram conclusivos quanto ao tipo de alteração existente entre as moléculas em análise.

As atribuições para os espectros de RMN <sup>13</sup>C foram mais simples e os deslocamentos químicos tiveram alteração significativa para C11 e C13,19. O C11 obteve sinal em 64,82 ppm na molécula da AMF e 78,08 ppm no NOx-p. Esta variação de mais de 10 ppm é considerada significativa e indica que o átomo de carbono se encontra mais desblindado em ambiente mais eletronegativo na molécula de NOx-p, o que é condizente com o grupo N-óxido que é mais eletronegativo que o grupo amino protonado. Os carbonos do anel morfolina, C13 e C19, também experimentaram o efeito semelhante indicando que houve alteração na eletronegatividade do nitrogênio que se liga aos átomos C13, C19 e C11 (HARTAUER *et al.*, 2000).

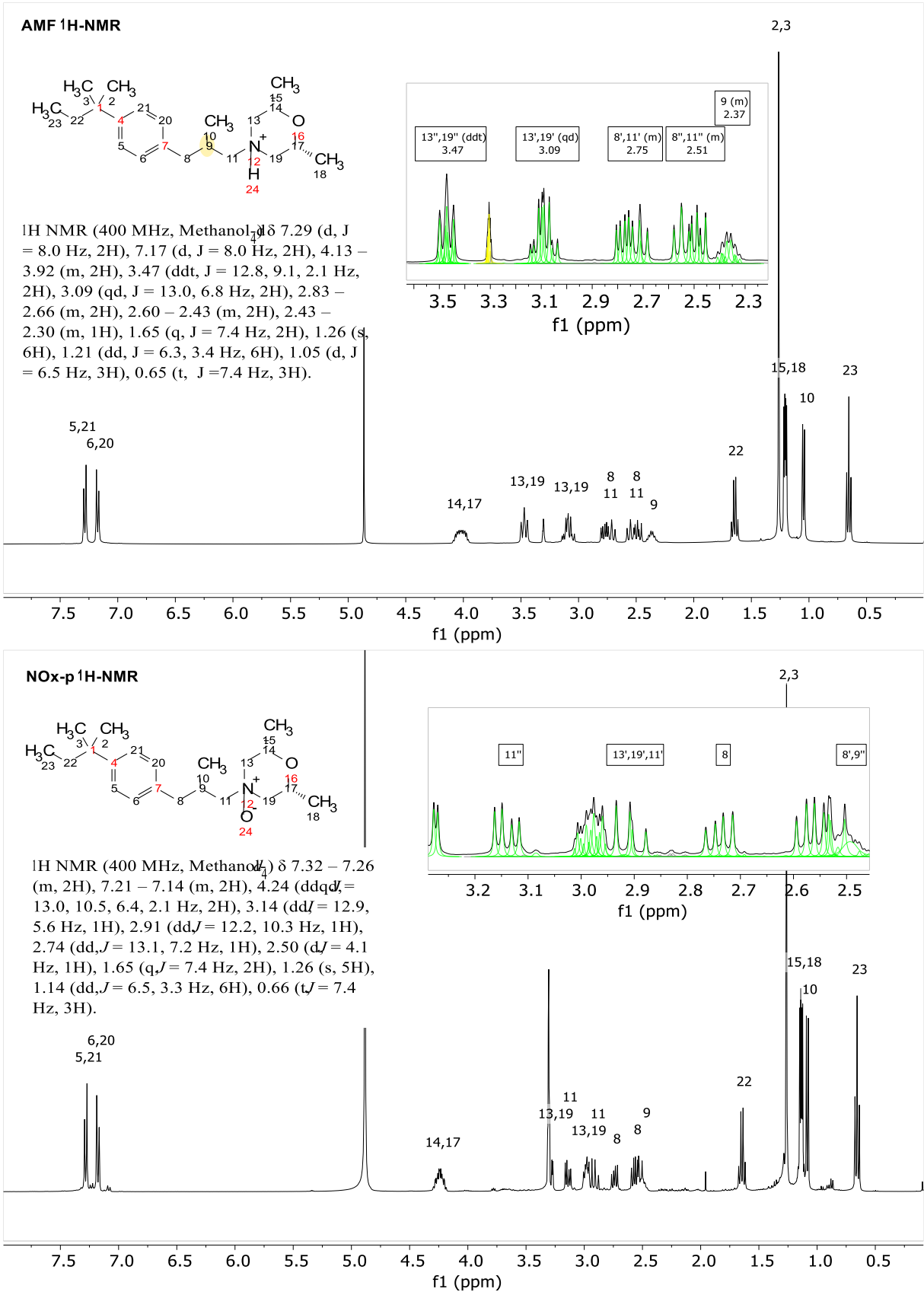
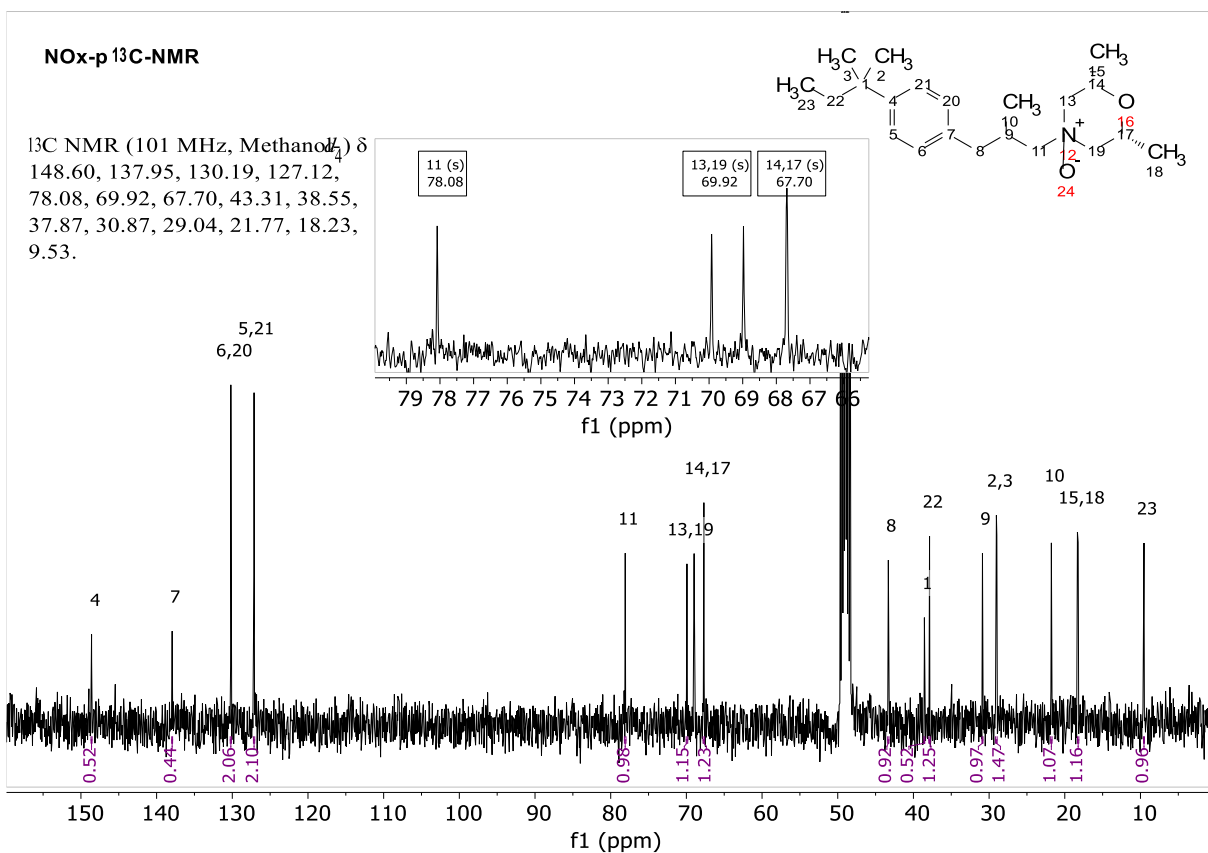
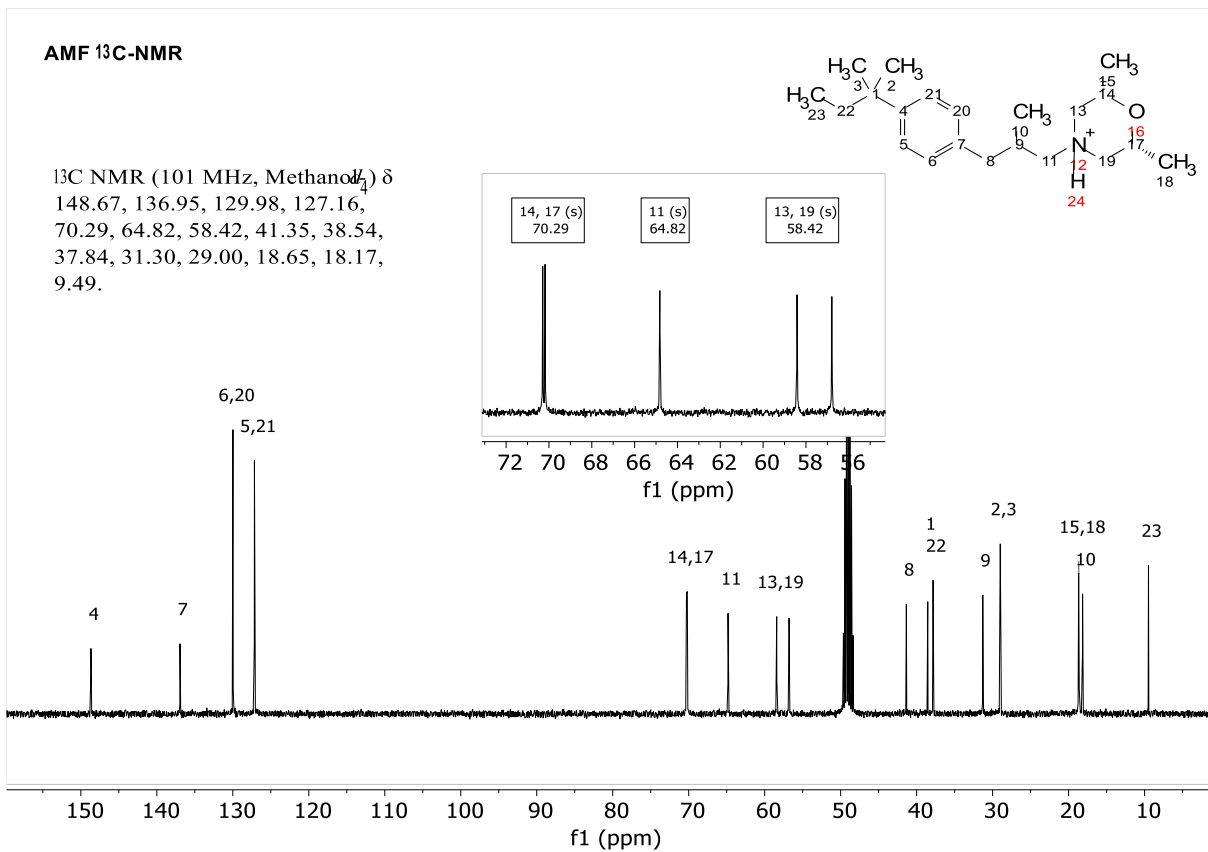


Figura 24.  $^1\text{H}$ -RMN da AMF e do NOx-p com deslocamentos químicos e atribuições.



**Figura 25.**  $^{13}\text{C}$ -RMN da AMF e do NOx-p com deslocamentos químicos e atribuições.

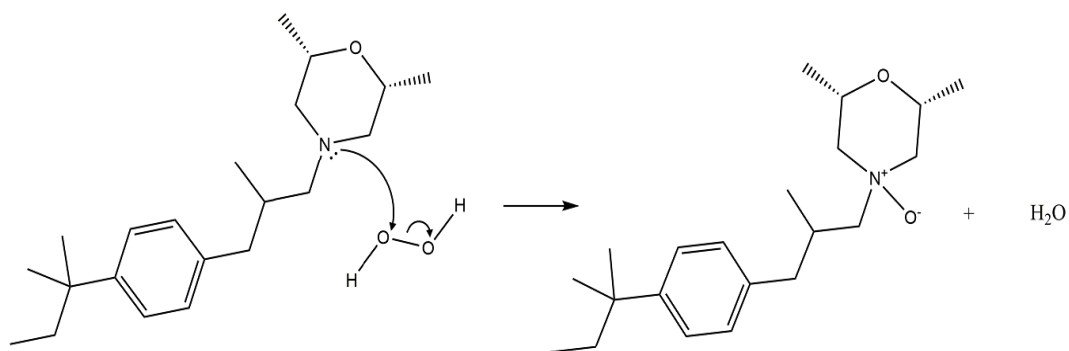


## 5.6 Identificação do produto da degradação oxidativa da amorolfina

A caracterização de produtos de degradação é uma tarefa complexa que emprega diferentes estratégias e técnicas de análise. A identificação de um produto de degradação e de sua rota de degradação envolvem uma série de considerações e não basta uma técnica de análise ou um dado da literatura para que se obtenha sucesso nestes projetos. Sabendo-se disto, a seguir são enumerados os resultados que guiaram nossa tomada de decisão para identificação do produto de degradação purificado – NOx-p:

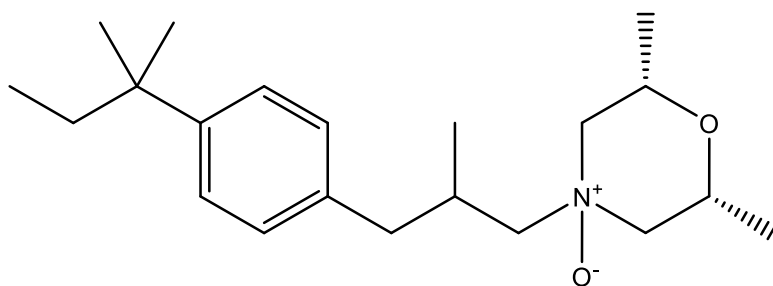
- 1) A oxidação da AMF foi um processo dependente do pH com aumento da velocidade de reação quando do aumento da concentração da forma não ionizada da amina terciária (em pH mais básico). A literatura científica descreve a oxidação de aminas terciárias a seus respectivos N-óxidos em função do pH do meio (FREED *et al.*, 2008).
- 2) As análises por CLAE-DAD demonstraram que a AMF degradou em meio oxidativo gerando um produto com tempo de retenção levemente maior e com espectro de UV muito similar;
- 3) As análises por massas de baixa resolução indicaram que a relação m/z aumentou em 16 da AMF para o NOx-p, sendo a adição de um oxigênio à molécula da AMF uma das possibilidades viáveis. Além do pico do íon molecular, em m/z 334,3, verificou-se a presença de pico em m/z 667,6, que pode ser atribuído à formação de dímeros típico de moléculas contendo grupos N-óxido em técnicas como ESI e APCI;
- 4) A análise por massa de alta resolução predisse a seguinte fórmula estrutural:  $C_{21}H_{35}NO_2$  com erro na casa de 1 ppm;
- 5) A análise por RMN  $^1H$  demonstrou que o número de hidrogênios das duas moléculas analisadas manteve-se constante e igual a 35 hidrogênios. O RMN  $^{13}C$  demonstrou que os carbonos ligados ao nitrogênio foram os que tiveram variação nos seus deslocamentos químicos com aumento da eletronegatividade.

Estes resultados permitem propor a reação química da Figura 26 como representativa do processo de degradação da AMF em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio e formação do N-óxido da AMF.



**Figura 26.** Reação de oxidação da AMF em peróxido de hidrogênio.

A Figura 27 apresenta alguns resultados obtidos a partir da estrutura química proposta obtida com auxílio do software ChemDraw Professional versão 16.



*(2S,6R)*-2,6-dimethyl-4-(2-methyl-3-(4-(*tert*-pentyl)phenyl)propyl)morpholine 4-oxide

Chemical Formula:  $C_{21}H_{35}NO_2$

Exact Mass: 333.3

Molecular Weight: 333.5

*m/z*: 333.3 (100.0%), 334.3 (22.7%), 335.3 (2.5%)

Elemental Analysis: C, 75.63; H, 10.58; N, 4.20; O, 9.59

**Figura 27.** Nome químico e informações químicas básicas do N-óxido da AMF.

## 5.7 Conclusões

Os resultados e discussões deste capítulo permitem concluir que:

- ✓ A solução de análise do padrão de AMF é estável por pelo menos 4 dias à temperatura ambiente;
- ✓ A amorolfina é estável nas condições ácidas e básicas testadas;
- ✓ A amorolfina degrada em meio oxidativo, porém é dependente do pH do meio. Quanto maior a quantidade de fármaco não ionizado ( $\text{pH} > \text{pKa}$ ), maior o valor da constante de reação ( $k$ ) e mais rápida a degradação;
- ✓ A UV-derivada é uma técnica potente para identificação de compostos que possuem espectros de UV similares;
- ✓ As técnicas de LC-MS e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitiram identificar e confirmar o N-óxido como produto de degradação oxidativo da AMF.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação da amorolfina presente em formulações farmacêuticas foi capaz de comprovar a acurácia e confiabilidade do método.

A análise da amostra degradada da amorolfina em espectrômetro de massas e de ressonância magnética nuclear permitiu elucidar a estrutura química do produto de degradação formado após exposição do fármaco à degradação oxidativa.

Estes resultados serão compilados e propostos na forma de artigo para publicação em periódico de circulação internacional.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.

AMEEN, M.; LEAR, J. T.; MADAN, V.; MOHD MUSTAPA, M. F.; RICHARDSON, M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. **British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 5, p.937-958,2014.

ANDRIĆ, F.; HÉBERGER, K. How to compare separation selectivity of high-performance liquid chromatographic columns properly? **Journal of Chromatography. A**, v. 1488, p. 45–56, 2017.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2224-2234, 2009.

AVANCINI, J.; ZUCCHI, P. Prevalence of dermatoses in patients referred for evaluation in an outpatient clinic of specialties. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 4, p. 513-516, 2018.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. (Ed.). **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. 2. Ed. CRC Press, 2016.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28. p. 1011-1040, 2002.

BANERJEE, M.; GHOSH, A. K.; BASAK, S.; DAS, K D.; GANGOPADHYAY, D. N. Comparative evaluation of effectivity and safety of topical amorolfine and clotrimazole in the treatment of tinea corporis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 6, p. 657-662, 2011.

BEN YOUSSEF, A.; KALLEL, A.; AZAIZ, Z.; JEMEL, S.; BADA, N.; CHOUCHEM, A.; BELHADJ-SALAH, N.; FAKHFAKH, N.; BELHADJ, S.; KALLEL, K. Onychomycosis: Which fungal species are involved? Experience of the Laboratory of Parasitology-Mycology of the Rabta Hospital of Tunis. **Journal de Mycologie Médicale**, In Press, 2018.

BORMAN, P.; NETHERCOTE, P.; CHATFIELD, M.; THOMPSON, D. The application of quality by design to analytical methods, **Pharmaceutical Technology**, v. 31, p. 142-152, 2007.

BOUKSIR, K.; KAZZAZ, M.; FEHRI, H. F.; BOUZIANE, H.; BOUKSIR, H.; HASKOURI, F.E. *Monascus ruber*: A new of onychomycosis in the north of Morocco (Tetouan). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, p. 502-509, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília/DF, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Determina a publicação do “Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília/DF, 2015.

BROWN, M. B.; KHENGAR, R. H.; TURNER, R. B.; FORBES, B.; TRAYNOR, M. J.; EVANS, C. R. G.; JONES, S. A. Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of unguinal chemical penetration enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 370, p. 61–67, 2009.

BUNYARATAVEJ, S.; LEEYAPHAN, C.; RUJITHARANAWONG, C.; SURAWAN, T. M.; MUANPRASAT, C.; MATTHAPAN, L. Efficacy of 5% amorolfine nail lacquer in *Neoscytalidium dimidiatum* onychomycosis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 4, p. 359-363, 2016.

CARNEY, C.; TOSTI, A.; DANIEL, R.; SCHER, R.; RICH, P.; DECOSTER, J.; ELEWSKI, B. A new classification system for grading the severity of onychomycosis: Onychomycosis Severity Index. **Archives of Dermatology**, v. 147, n. 11, p. 1277-1282, 2011.

CARR, PW; SCHELLINGER, AP. Solubility of Buffers in Aqueous-Organic Eluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Lc Gc North America**, v. 22, n. 6, p. 546–548, 2004.

CHEM ACX. Chemical Database. Disponível em <[https://chemacx.cambridgesoft.com/ChemACX/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=200000&AppName=CHEMACX&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=8&SearchCriteriaValue=amorolfine\\*](https://chemacx.cambridgesoft.com/ChemACX/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=200000&AppName=CHEMACX&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=8&SearchCriteriaValue=amorolfine*)> Acesso em: 02 mar. 2019.

CHEN, M.; XU, Y.; HONG, N.; YANG, Y.; LEI, W.; DU, L.; ZHAO, J.; LEI, X.; XIONG, L.; CAI, L.; XU, H.; PAN, W. Epidemiology of fungal infections in China. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 58-75, 2018.

DE BERKER, D. Nails and hair. **Medicine**, v. 37, p. 286-290, 2009.

DHIB, I.; FATHALLAH, A.; YAACOUB, A.; ZEMNI, R., GAHA, R., SAID, M. B. Clinical and mycological features of onychomycosis in central Tunisia: a 22 years retrospective study (1986–2007). **Mycoses**, v. 56, p. 273-280, 2013.



DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R. Chapter 14 - Method development in liquid chromatography. In: FANALI, S. et al. (Eds.). **Liquid Chromatography**. 2. Ed. Elsevier, p. 375–388, 2017.

**EMA**, European Medicines Agency, Food and Drug Administration (FDA), EMA-FDA Pilot Program for Parallel Assessment of Quality-by-Design Applications: Lessons Learnt and Q&A Resulting from the First Parallel Assessment, 2013.

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.

ERMER, J.; MILLER, J. H. McB (Ed.). **Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice**. John Wiley & Sons, 2005.

ERMER, J.; PLOSS, H. J. Validation in pharmaceutical analysis: Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 37, n. 5, p. 859-870, 2005.

EVANS, E. G. V. The rationale for combination therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. S60, p. 9-13, 2001.

FAERGEMANN, J.; CORREIA, O.; NOWIKI, R.; RO, B. I. Genetic predisposition. Understanding underlying mechanisms of onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19(1), p. 17-19, 2005.

**FB**, FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods**. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1994.

FENG, X.; XIONG, X.; RAN, Y. Efficacy and tolerability of amorolfine 5% nail lacquer in combination with systemic antifungal agents for onychomycosis: A meta-analysis and systematic review. **Dermatologic therapy**, v. 30, n. 3, p. e12457, 2017.

FERRARI, J. Fungal toenail infections. **Clinical Evidence**, v. 03, p. 1715, 2014.

FLAGOTHIER, C.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PIÉRARD, G. E. New insights into the effect of amorolfine nail lacquer. **Mycoses**, v. 48, n. 2, p. 91-94, 2005.

FREED, A. L.; STROHMEYER, H. E.; MAHJOUR, M.; SADINENI, V.; REID, D. L.; KINGSMILL, C. A. pH control of nucleophilic/electrophilic oxidation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 357, n. 1-2, p. 180-188, 2008.

GAO, Y.; LI, L.; ZHANG, J.; SHU, W.; GAO, L. Simultaneous determination of triacetin, acetic ether, butyl acetate and amorolfine hydrochloride in amorolfine liniment by HPLC. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 25, n. 2, p. 389-394, 2012.

GARCIA-ROMERO, M. T.; GRANADOS, J.; VEGA-MEMIJE, M. E.; ARENAS, R. Analysis of Genetic Polymorphism of the HLA-B and HLA-DR Loci in Patients with Dermatophytic Onychomycosis and in Their First-Degree Relatives. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 103(1), p. 59-62, 2012.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N.; LONG, L. In vitro antifungal activity of ME1111, a new topical agent for onychomycosis, against clinical isolates of dermatophytes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5154-5158, 2015.

GHANNOUM, M.; LONG, L.; KUNZE, G.; SARKANY, M.; OSMAN-PONCHET, H. A pilot, layer-wise, ex vivo evaluation of the antifungal efficacy of amorolfine 5% nail lacquer versus other topical antifungal nail formulations in healthy toenails. **Mycoses**, In Press, 2019.

GRDINIĆ, V.; VUKOVIĆ, J. Prevalidation in pharmaceutical analysis: Part I. Fundamentals and critical discussion. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n. 3, p. 489-512, 2004.

GUIBAL, F., BARAN, R., DUHARD, E., FEUILHADE DE CHAUVIN, M. Épidémiologie et prise en charge des onychomycoses en pratique dermatologique libérale en France. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 135, p. 561-566, 2008.

GUPTA, A. K.; DAIGLE, D.; FOLEY, K. A. Topical therapy for toenail onychomycosis: an evidence-based review. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 15, n. 6, p. 489-502, 2014.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M. Improved efficacy in onychomycosis therapy. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 5, p. 555-563, 2013.

GUPTA, V.; JAIN, A. D. K.; GILL, N. S.; GUPTA, K. Development and validation of HPLC method - a review. **International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

HARTAUER, K. J.; ARBUTHNOT, G. N.; BAERTSCHI, S. W.; JOHNSON, R. A. et al. Influence of peroxide impurities in povidone and crospovidone on the stability of raloxifene hydrochloride in tablets: identification and control of an oxidative degradation product. **Pharmaceutical development and technology**, v. 5, n. 3, p. 303-319, 2000.

HASCHE, E. G.; PODDA, M. Onychomykose: Konzepte für die Praxis. **Der Hautarzt**, v. 69, n. 9, p. 718-725, 2018.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 229-240, 2010.

HOLZGRABE, U; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. Quantitative NMR spectroscopy—applications in drug analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 38, n. 5, p. 806-812, 2005.

HPLC UV detection. Disponível em <<https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatographyblog/hplcchromatography-tips/hplc-uv-detection>> Acesso em: 26 abr. 2019.

HUYNH-BA, K. (Ed.). **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices**. Springer Science & Business Media, 2009.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8 (R2)**. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2)**. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2003.

ICH. **Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical methods text and methodology Q2 (R1)**. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

JAHOUH, F.; MARONGIU, F.; SERRA, M. P.; LACONI, E.; BANOUB, J. Gas-phase fragmentation of the N-oxide and N-hydroxylated derivatives of retrorsine using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 19, p. 1733-1748, 2015.

KALARIYA, P. D.; TALLURI, M. V. N. K.; PATEL, P. N.; SRINIVAS, R. Identification of hydrolytic and isomeric N-oxide degradants of vilazodone by on line LC–ESI–MS/MS and APCI–MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 102, p. 353-365, 2015.

KAUR, R.; KASHYAP, B.; BHALLA, P. Onychomycosis-epidemiology, diagnosis and management. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 108-116, 2008.

KREIJKAMP-KASPERS, S. Oral antifungal medication for toenail onychomycosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2017.

LAFFLEUR, F.; ATALL, M. Preparation and evaluation of a novel dosage form for onychomycosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.518, p. 105-110, 2017.

LAPLANCHE, L.A.; ROTHCHILD, R.; XU, Y. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Studies of Etidocaine Free Base and Hydrochloride Salt. Solvent and Temperature Dependence. **Spectroscopy Letters**, v. 25, n. 1, p. 133-161, 1992.

LEBRUN, B.; BRAEKMAN, J.C.; DALOZE, D. Complete assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra of the Coccinellidae-defensive alkaloids myrrhine, precoccinelline and hippodamine, their N-oxides and the corresponding hydrochlorides. **Magnetic Resonance In Chemistry**, v. 37, p. 60-64, 1999.

LOFTSSON, T. **Drug stability for pharmaceutical scientists**. Academic Press, 2014.

MACAULEY, W. J.; JONES, S. A.; TRAYNOR, M. J.; GUESNÉ, S.; MURDAN, S.; BROWN, M. B. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 102, p. 178-184, 2016.

MARCH, J. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**. 3. Ed. New York: John Wiley & Sons, 1985.

MIRON, D.; CORNELIO, R. ; TROLEIS, J. ; MARIATH, J. ; ZIMMER, A.R. ; MAYORGA, P. ; SCHAPOVAL, E.E.S. . Influence of penetration enhancers and molecular weight in antifungals permeation through bovine hoof membranes and prediction of efficacy in human nails. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 20-25, 2014.

MURDAN, S. Drug delivery to the nail following topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, n. 1-2, p. 1-26, 2002.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C.M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3. Ed. John Wiley & Sons, 2009.

NELSON, E. D.; HARMON, P. A.; SZYMANIK, R. C.; TERESK, M. G.; LI, L.; SEBURG, R. A.; REED, R. A. Evaluation of solution oxygenation requirements for azonitrile-based oxidative forced degradation studies of pharmaceutical compounds. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 95, n. 7, p. 1527-1539, 2006.

NEUBERT, R. H.; GENSBÜGEL, C.; JÄCKEL, A.; WARTEWIG, S. Different physicochemical properties of antimycotic agents are relevant for penetration into and through human nails. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 7, p. 604-607, 2006.

NOGUEIRAS-NIETO, L., GOMEZ-AMOZA, J.L., DELGADO-CHARRO, M.B., OTERO-ESPINAR, F.J. Hydration and N-acetyl-l-cysteine alter the microstructure of

human nail and bovine hoof: implications for drug delivery. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v.156, p. 337–344, 2011.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of pharmaceutical products. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 22. ed. Philadelphia: The university of the sciences, v. 1, 2013.

PASQUINI, B.; ORLANDINI, S.; CAPRINI, DEL BUBBA, M.; INNOCENTI, M.; BRUSOTTI, G.; FURLANETTO, S. Cyclodextrin- and solvent-modified micellar electrokinetic chromatography for the determination of captopril, hydrochlorothiazide and their impurities: a quality by design approach. **Talanta**, v. 160, p. 332-339, 2016.

POOJARY, S. A. Topical antifungals: A review and their role in current management of dermatophytoses. **Clinical Dermatology Review**, v. 1, n. 3, p. 24-29, 2017.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**, 2002.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SAEEDI, P.; SHAVANDI, A.; MEREDITH-JONES, K. Nail Properties and Bone Health: A Review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 31, 2018.

SAHU, P. K.; RAMISETTI, N. R.; CECCHI, T.; SWAIN, S.; PATRO, C. S.; PANDA, J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 147, p. 590-611, 2018.

SANER, M. V.; KULKARNI, A. D.; PARDESHI, C. V. Insights into drug delivery across the nail plate barrier. **Journal of Drug Targeting**, v. 22, n. 9, p. 769-789, 2014.

SHIVAKUMAR, H. N.; JULURI, A.; DESAI, B. G.; MURTHY, S. N. Ungual and Transungual drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, p. 901-911, 2012.

SIGURGEIRSSON, B.; BARAN, R. The prevalence of onychomycosis in the global population—a literature study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 11, p. 1480-1491, 2014.

SIGURGEIRSSON, B.; OLAFSSON, J. H.; STEINSSON, J. T.; KERROUCHE, N.; SIDOU, F. Efficacy of amorolfine nail lacquer for the prophylaxis of onychomycosis over 3 years. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, p. 910-915, 2010.

SIGURGEIRSSON, B.; STEINGRÍMSSON, O. Risk factors associated with onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 1, p. 48-51, 2004.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVA, P.; SILVA, C. L.; PERESTRELO, R.; NUNES, F. M.; CÂMARA, J. S. A useful strategy based on chromatographic data combined with quality-by-design approach for food analysis applications. The case study of furanic derivatives in sugarcane honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 117-126, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 3. Ed. Wiley & Sons, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

TOL, T.; KADAM, N.; RAOTOLE, N.; DESAI, A.; SAMANTA, G. A simultaneous determination of related substances by high performance liquid chromatography in a drug product using quality by design approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1432, p. 26-38, 2016.

TURNER, R.; WEAVER, S.; CASERTA, F.; BROWN, M. B. A Novel Vehicle for Enhanced Drug Delivery Across the Human Nail for the Treatment of Onychomycosis. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20(1), p. 71-81, 2016.

**USP 42. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 36. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.

VOGT, F. G.; KORD, A. S. Development of quality-by-design analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

WALTERS, K. A.; ABDALGHAFORB, H. M.; LANE, M. E. The human nail – Barrier characterisation and permeation enhancement. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 435, p. 10– 21, 2012.

WELSH, O VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 151-159, 2010.

ZAIKIN, V. G. Chromatography-mass spectrometry. **Journal of analytical chemistry**, v. 66, n. 11, p. 1090, 2011.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; GOUVEA, C.; ROMERO, M. Et al. HLA-associated susceptibility to chronic onychomycosis in Brazilian Ashkenazi Jews. **International Journal of Dermatology**, v. 35, p. 681-682, 1996.

ZAUG, M. Amorolfine nail lacquer: clinical experience in onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 4, n. 1, p. S23-S30, 1995.

ZHAO, Z. Z.; QIN, X. Z.; WU, A.; YUAN, Y. Novel rearrangements of an N-oxide degradate formed from oxidation of a morpholine acetal substance P antagonist. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n. 8, p. 1957-1961, 2004.





## **ANEXO I**

### **Resultados da otimização do método por CLAE-DAD para amorolfina**



# Resultados provenientes do Programa Design Expert 7.1.5 (Minneapolis, US)

## Design Summary

Study Type Factorial  
 Initial Design 2 Level Factorial  
 Center Points 3  
 Design Model 4FI

Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
A	Metanol	(%)	Numeric	64.00	70.00	-1.0	1.0	67.0	2.9
B	Conc. Tampão	(mM)	Numeric	50.00	250.00	-1.0	1.0	150.0	95.6
C	pH		Numeric	1.75	2.25	-1.0	1.0	2.0	0.2
D	Temperatura	(°C)	Numeric	25.00	45.00	-1.0	1.0	35.0	9.6

Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	Fator Cauda		35	Factorial	1.514	3.126	2.16026	0.524725	2.06473	None	R2FI
Y2	Fator Capacidad (k)		35	Factorial	1.2155	4.8305	2.3153	0.923454	3.97408	None	R4FI
Y3	Eficiência		35	Factorial	3911	13345	8395.74	2915.07	3.41217	None	R3FI

## Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Metanol	is in range	64	70	1	1	3
Conc. Tampão	is in range	50	250	1	1	3
pH	is in range	1.75	2.25	1	1	3
Temperatura	is in range	25	45	1	1	3
Fator Cauda	is target = 1.65	1.55	1.7	0.33	0.33	3
Fator Capacidad	is target = 3.5	3	4	0.33	0.33	2
Eficiência	is target = 8000	6000	12000	0.1	0.1	1

## Solutions

Number	Metanol	Conc. Tampão	pH	Temperatura	Fator Cauda	Fator Capacidad	Eficiência	Desirability	Selected
1	<u>64.13</u>	<u>245.74</u>	<u>2.25</u>	<u>25.18</u>	<u>1.65</u>	<u>3.5</u>	<u>10187.1</u>	<u>1.0</u>	<u>Selected</u>
2	64.14	247.16	2.24	25.00	1.65	3.5	10189.4	1.0	
3	64.10	246.48	2.25	25.25	1.65	3.5	10198.5	1.0	
4	64.09	249.79	2.22	25.07	1.65	3.50001	10220.4	1.0	
5	64.04	248.10	2.24	25.41	1.65	3.5	10224.6	1.0	
6	64.01	247.64	2.24	25.60	1.65	3.5	10232.3	1.0	
7	64.03	249.54	2.23	25.37	1.65	3.49999	10236.5	1.0	
8	64.01	247.05	2.25	25.66	1.64953	3.50001	10231.5	1.0	
9	64.12	246.77	2.24	25.11	1.65042	3.5	10191.2	1.0	
10	64.00	249.70	2.23	25.65	1.65	3.49372	10259.2	1.0	
11	64.26	247.68	2.23	25.00	1.65	3.46484	10212.8	1.0	
12	64.00	246.20	2.25	26.85	1.65	3.44485	10327.2	1.0	
13	64.54	243.49	2.25	25.00	1.65	3.40797	10201.3	1.0	
14	64.05	244.51	2.25	25.69	1.6569	3.50109	10190.6	1.0	
15	64.48	250.00	2.21	25.00	1.65003	3.39831	10271.4	1.0	
16	64.00	246.22	2.25	27.79	1.65	3.39632	10412.4	1.0	
17	64.55	250.00	2.20	25.24	1.65	3.36906	10301.7	1.0	
18	64.00	250.00	2.22	28.40	1.65	3.35523	10506.1	0.9	
19	64.80	241.98	2.25	25.00	1.65014	3.3432	10219.4	0.9	
20	64.76	242.70	2.25	25.06	1.64776	3.3463	10234.6	0.9	

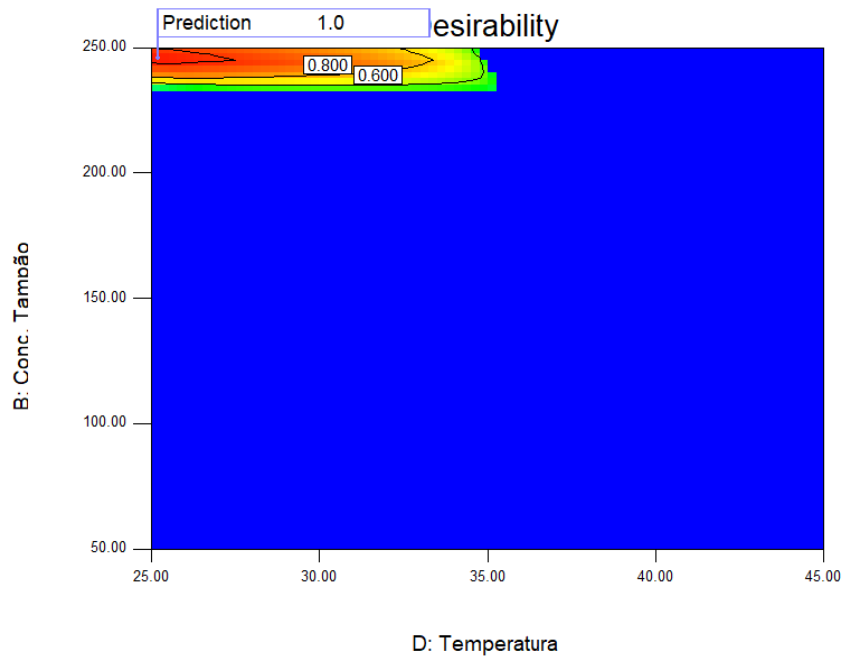
## Resumo da primeira solução com predição igual a 1.

Design-Expert® Software



X1 = D: Temperatura  
X2 = B: Conc. Tampão

Actual Factors  
A: Metanol = 64.13  
C: pH = 2.25



Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.	Coding
A	Metanol	64.13	64.00	70.00	0.000	Actual
B	Conc. Tampão	245.74	50.00	250.00	0.000	Actual
C	pH	2.25	1.75	2.25	0.000	Actual
D	Temperatura	25.18	25.00	45.00	0.000	Actual

Response	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
Fator Cauda	1.65	0.022	1.60	1.70	0.054	1.54	1.76
Fator Capacidad	3.5	0.014	3.47	3.53	0.026	3.45	3.55
Eficiência	10187.1	67.31	10048.43	10325.69	147.94	9882.36	10491.75

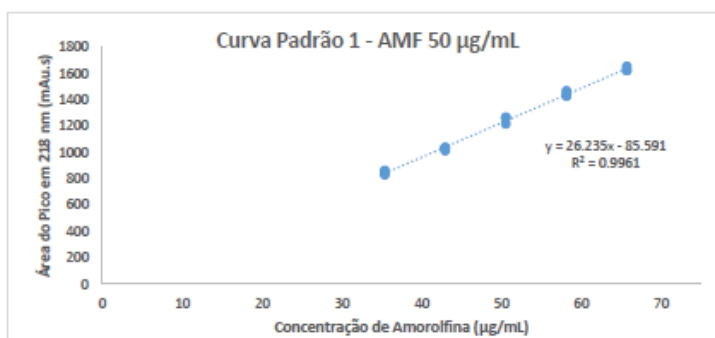
**ANEXO II**  
**Resultados do Ensaio de Linearidade**



# CURVA PADRÃO 1

Linearity AMF 50 (70-130%) - For Loceryl Formulations

Conc. (µg/mL)	Peak Area at 218 nm (mAu.s)*	Inj. Rep. (%)
35.4	864.2	0.12%
35.4	844.3	0.24%
35.4	832.1	0.10%
43.0	1037.9	0.11%
43.0	1016.0	0.21%
43.0	1038.5	0.07%
50.6	1219.4	0.09%
50.6	1269.3	0.03%
50.6	1264.2	0.06%
58.2	1469.4	0.25%
58.2	1440.7	0.13%
58.2	1428.2	0.11%
65.8	1654.4	0.04%
65.8	1626.1	0.02%
65.8	1624.1	0.21%



\* mean of three injections

## SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.9980
R Square	0.9961
Adjusted R Sq	0.9958
Standard Error	19.01
Observations	15
<b>RSDreg(%)</b>	<b>1.43%</b>

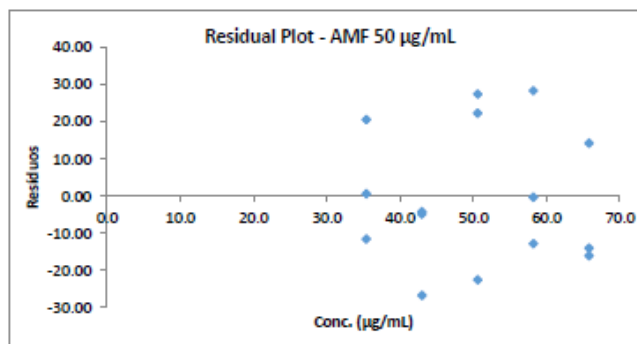
## ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	1189524.96	1189524.96	3292.720172	5.04392E-17
Residual	13	4696.367645	361.2590496		
Total	14	1194221.328			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-85.59	23.65	-3.62	0.00	-136.68	-34.50
Conc. (µg/mL)	26.24	0.46	57.38	0.00	25.25	27.22

## RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Peak Area at 218 nm (mAu.s)	Residuals	Standard Residuals
1	843.7	20.57	1.12
2	843.7	0.61	0.03
3	843.7	-11.56	-0.63
4	1042.8	-4.92	-0.27
5	1042.8	-26.75	-1.46
6	1042.8	-4.29	-0.23
7	1241.9	-22.54	-1.23
8	1241.9	27.42	1.50
9	1241.9	22.26	1.22
10	1441.0	28.32	1.55
11	1441.0	-0.34	-0.02
12	1441.0	-12.87	-0.70
13	1640.2	14.21	0.78
14	1640.2	-14.03	-0.77
15	1640.2	-16.09	-0.88

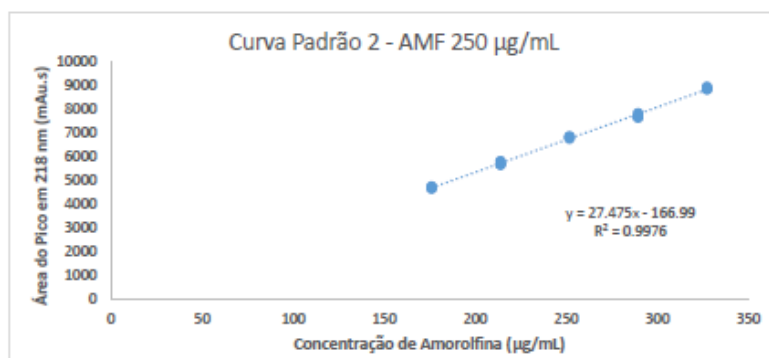


## CURVA PADRÃO 2

Linearity AMF 250 (70-130%) - For In House Made Formulation (IHM)

Conc. (µg/mL)	Peak Area at 218 nm (mAu.s)*	Inj. Rep. (%)
176.4	4685.9	0.25%
176.4	4724.6	0.11%
176.4	4647.3	0.06%
214.2	5667.6	0.17%
214.2	5648.6	0.07%
214.2	5801.0	0.10%
252.0	6749.2	0.12%
252.0	6839.8	0.26%
252.0	6820.8	0.12%
289.8	7647.4	0.26%
289.8	7676.7	0.13%
289.8	7819.0	0.12%
327.6	8855.6	0.07%
327.6	8829.4	0.04%
327.6	8938.3	0.06%

\* mean of three injections



### SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.9988
R Square	0.9976
Adjusted R Square	0.9975
Standard Error	76.62
Observation	15
<b>RSDreg(%)</b>	<b>1.11%</b>

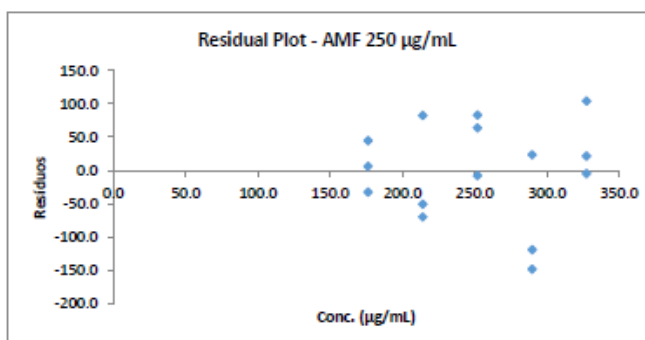
### ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	32358206.21	32358206	5511.411	1.79E-18
Residual	13	76324.68237	5871.1294		
Total	14	32434530.89			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-166.99	95.34	-1.75	0.10	-372.95	38.98
Conc. (µg/mL)	27.48	0.37	74.24	0.00	26.68	28.27

### RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Peak Area at 218 nm (mAu.s)	Residuals	Standard Residuals
1	4679.6	6.3	0.08
2	4679.6	45.0	0.61
3	4679.6	-32.4	-0.44
4	5718.2	-50.6	-0.69
5	5718.2	-69.6	-0.94
6	5718.2	82.8	1.12
7	6756.7	-7.5	-0.10
8	6756.7	83.0	1.12
9	6756.7	64.1	0.87
10	7795.3	-147.9	-2.00
11	7795.3	-118.6	-1.61
12	7795.3	23.7	0.32
13	8833.9	21.7	0.29
14	8833.9	-4.5	-0.06
15	8833.9	104.4	1.41





**ANEXO III**  
**Comparação das Regressões Lineares**



**Resultados da comparação das inclinações (slopes) e interceptos (intercepts) das diferentes curvas padrão pelo Programa Prism GraphPad 6\*.**

**Linear reg. of Data 1: Tabular results**

	Curva Padrao 1	Curva Padrao 2
Best-fit values		
Slope	26.20 ± 0.4566	27.48 ± 0.3701
Y-intercept when X=0.0	-83.87 ± 23.62	-167.0 ± 95.34
X-intercept when Y=0.0	3.201	6.079
1/slope	0.03817	0.03640
95% Confidence Intervals		
Slope	25.21 to 27.19	26.68 to 28.27
Goodness of Fit		
R square	0.9961	0.9976
Sy.x	19.01	76.62
Is slope significantly non-zero?		
F	3292	5511
DFn, DFd	1.000, 13.00	1.000, 13.00
P value	< 0.0001	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	15	15
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	15	15
Number of missing values	15	15
Equation	Y = 26.20*X - 83.87	Y = 27.48*X - 167.0

Are the slopes equal?

F = 0.867223. DFn=1 DFd=26

P=0.3603

If the overall slopes were identical, there is a 36% chance of randomly choosing data points with slopes this different. You can conclude that the differences between the slopes are not significant.

Since the slopes are not significantly different, it is possible to calculate one slope for all the data. The pooled slope equals 27.4257

Are the elevations or intercepts equal?

F = 0.00255453. DFn=1 DFd=27

P=0.9601

If the overall elevations were identical, there is a 96% chance of randomly choosing data points with elevations this different. You can conclude that the differences between the elevations are not significant.

Since the Y intercepts are not significantly different, it is possible to calculate one Y intercept for all the data.

The pooled intercept equals -150.178



**ANEXO IV**  
**Resultados do Ensaio de Precisão**



**PRECISÃO: Formulação solução hidrofílica - IHM contendo 30 mg/mL (3%) de amorolfina.**

Precision IHM Solution - 6 repetitions at 100% on 2 days (content of AMF.HCl: 30 mg/mL)									
Analyst: Diogo					Date: dez/10/2019				
Injection Repetition	Standard 1.1	Standard 1.2	IHM 1.1	IHM 1.2	IHM 1.3	IHM 1.4	IHM 1.5	IHM 1.6	
Inj 1	6552.2	6309.2	6940.6	6907	6672.3	6680.2	6833.4	6754.7	
Inj 2	6561.5	6304.4	6924.9	6888.4	6660.1	6660.9	6822.3	6770.5	
Inj 3	6567.5	6323.2	6914.3	6877.5	6649.6	6653.3	6807.7	6769.5	
Mean Area at 218 nm	6560.4	6312.3	6926.6	6891.0	6660.7	6664.8	6821.1	6764.9	
Injection Repeatability (%)	0.12%	0.15%	0.19%	0.22%	0.17%	0.21%	0.19%	0.13%	Repeatability 1
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	252.0	252.0	271.2	269.8	260.8	260.9	267.1	264.9	Mean RSD (%)
Drug Content (%)			106.4%	105.8%	102.3%	102.3%	104.7%	103.9%	104.2% 1.65%
Analyst: Rafaela									
Date: dez/12/2019									
Injection Repetition	Standard 2.1	Standard 2.2	IHM 2.1	IHM 2.2	IHM 2.3	IHM 2.4	IHM 2.5	IHM 2.6	
Inj 1	5908.9	6105.0	6206.9	6397.4	6375.9	6372.5	6302.5	6361.5	
Inj 2	5918.9	6096.6	6239.4	6409.7	6393.1	6375.5	6300.3	6354.8	
Inj 3	5926.8	6108.7	6232.7	6418.3	6383.5	6371.8	6307.4	6357.5	
Mean Area at 218 nm	5918.2	6103.4	6226.3	6408.5	6384.2	6373.3	6303.4	6357.9	
Injection Repeatability (%)	0.15%	0.10%	0.28%	0.16%	0.14%	0.03%	0.06%	0.05%	Repeatability 2
Conc. AMF (µg/mL)	252.0	252.0	261.0	268.7	267.7	267.2	264.3	266.6	Mean RSD (%)
Drug Content (%)			102.4%	105.4%	105.0%	104.8%	103.6%	104.5%	104.3% 1.05%
Precision Summary									
	Drug Content <sup>a</sup>	Intermediate Precision <sup>b</sup>	Repeatability <sup>c</sup>	Inj.Rep. <sup>a</sup>					
IHM Formulation*	104.2%	1.32%	1.35%	0.15%					
* state to content 30 mg/mL or 3% of amorolfine hydrochloride.									
<sup>a</sup> mean of 12 determinations									
<sup>b</sup> RSD of 12 determinations									
<sup>c</sup> Mean of the 2 repeatability RSD									

**PRECISÃO: Formulação Loceryl® esmalte – LOE contendo 50 mg/mL (5%) de amorolfina.**

Precision Loceryl Lacquer - 6 repetitions at 100% on 2 days (content of AMF: 50 mg/mL)									
Analyst: Rafaela					Date: jan/10/2019				
Injection Repetition	Standard 1.1	Standard 1.2	LoL 1.1	LoL 1.2	LoL 1.3	LoL 1.4	LoL 1.5	LoL 1.6	
Inj 1	1247.9	1289.7	1392.7	1381.4	1407.9	1396	1353.4	1362.3	
Inj 2	1254.7	1288.0	1411	1394	1420.3	1378.7	1375.4	1364.7	
Inj 3	1248.4	1281.1	1392.7	1390.5	1418.4	1382.9	1373.4	1369.2	
Mean Area at 218 nm	1250.3	1286.3	1398.8	1388.6	1415.5	1385.9	1367.4	1365.4	
Injection Repeatability (%)	0.30%	0.35%	0.76%	0.47%	0.47%	0.65%	0.89%	0.26%	
Mass Weighted (mg)			42.0	41.0	41.1	41.1	40.4	40.2	Repeatability 1
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	50.2	50.2	55.4	55.0	56.0	54.9	54.1	54.0	Mean RSD (%)
Drug Content (%)			96.8%	98.5%	100.1%	98.0%	98.4%	98.8%	98.4% 1.09%
Analyst: Fernanda									
Date: jan/04/2019									
Injection Repetition	Standard 1.1	Standard 1.2	LoL 2.1	LoL 2.2	LoL 2.3	LoL 2.4	LoL 2.5	LoL 2.6	
Inj 1	1218.5	1269.1	1338.1	1341.5	1387.4	1288.1	1389.6	1315.00	
Inj 2	1219.00	1269.8	1333.1	1347.3	1388.5	1278.3	1388.9	1311.8	
Inj 3	1220.6	1269.1	1334.4	1339.3	1388	1279.8	1389.2	1312.6	
Mean Area at 218 nm	1219.4	1269.3	1335.2	1342.7	1388.0	1282.1	1389.2	1313.1	
Injection Repeatability (%)	0.09%	0.03%	0.19%	0.31%	0.04%	0.41%	0.03%	0.13%	Repeatability 2
Mass Weighted (mg)			40.8	40.9	41.6	39.5	41.5	39.8	Mean RSD (%)
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	50.6	50.6	54.3	53.1	54.9	50.7	55.0	52.0	96.3% 1.33%
Drug Content (%)			97.8%	95.5%	97.0%	94.4%	97.3%	95.9%	
Precision Summary									
	Drug Content <sup>a</sup>	Intermediate Precision <sup>b</sup>	Repeatability <sup>c</sup>	Inj.Rep. <sup>a</sup>					
LoL Formulation*	97.4%	1.63%	1.21%	0.34%					
* state to content 30 mg/mL or 3%.									
<sup>a</sup> mean of 12 determinations									
<sup>b</sup> RSD of 12 determinations									
<sup>c</sup> Mean of the 2 repeatability RSD									

**PRECISÃO: Formulação Loceryl® creme – LOC contendo 2,5 mg/g (0,25%) de amorolfina.**

Precision Loceryl Cream - 6 repetitions at 100% on 2 days (content of AMF: 0.25% ou 2.5 mg/g)										
Analyst: Rafaela					Date: jan/04/2019					FC(HCl-AMF) 0.897
Injection Repetition	Standard 1.1	Standard 1.2	LoC 1.1	LoC 1.2	LoC 1.3	LoC 1.4	LoC 1.5	LoC 1.6		
Inj 1	1218.5	1269.1	1296.5	1408.5	1374.4	1357.5	1379.4	1341.4		
Inj 2	1219	1269.8	1300.3	1410.5	1374.8	1358.3	1382.7	1345.6		
Inj 3	1220.6	1269.1	1301.1	1411.7	1376.3	1354.5	1393.4	1346.2		
Mean Area at 218 nm	1219.4	1269.3	1299.3	1410.2	1375.2	1356.8	1385.2	1344.4		
Injection Repeatability (%)	0.09%	0.03%	0.19%	0.11%	0.07%	0.15%	0.53%	0.19%		
Mass Weighted (mg)			499.2	521.9	514	515.3	517.7	508	Repeatability 1	
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	50.6	50.6	52.8	57.3	55.9	55.2	56.3	54.7	Mean RSD (%)	
Drug Content (%)			94.9%	98.6%	97.6%	96.0%	97.6%	96.5%	96.9% 1.34%	
Analyst: Fernanda					Date: jan/10/2019					
Injection Repetition	Standard 1.1	Standard 1.2	LoC 2.1	LoC 2.2	LoC 2.3	LoC 2.4	LoC 2.5	LoC 2.6		
Inj 1	1247.9	1289.7	1376.2	1353.1	1352.4	1318.5	1328.8	1290.10		
Inj 2	1254.7	1288	1378	1355.1	1353.3	1326.4	1317.6	1293.9		
Inj 3	1248.4	1281.1	1377.8	1359.9	1351.3	1325.1	1322.3	1290.5		
Mean Area at 218 nm	1250.3	1286.3	1377.3	1356.0	1352.3	1323.3	1322.9	1291.5		
Injection Repeatability (%)	0.30%	0.35%	0.07%	0.26%	0.07%	0.32%	0.43%	0.16%		
Mass Weighted (mg)			510.8	510.3	514.4	504.1	498.7	495.2	Repeatability 2	
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	50.2	50.2	54.5	55.1	55.0	53.8	53.8	51.1	Mean RSD (%)	
Drug Content (%)			95.7%	96.9%	95.9%	95.8%	96.8%	92.6%	95.6% 1.64%	
Precision Summary	Drug Content <sup>a</sup>	Intermediate Precision <sup>b</sup>	Repeatability <sup>c</sup>	Inj.Rep. <sup>a</sup>						
LoC Formulation*	96.2%	1.58%	1.49%	0.21%						
* state to content 30 mg/mL or 3%.										
* mean of 12 determinations										
<sup>b</sup> RSD of 12 determinations										
<sup>c</sup> Mean of the 2 repeatability RSD										



**ANEXO V**  
**Resultados do Ensaio de Exatidão**



**EXATIDÃO: Formulação solução hidrofílica – IHM (adição de amorolfina ao placebo).**

Accuracy IHM Solution - 3 levels x 3 repetitions (standard added to placebo)												
Injection Repetition	AMF 250 (100%)		70%			100%			130%			
	Standard 1.1	Standard 1.2	IHM 70.1	IHM 70.2	IHM 70.3	IHM 100.1	IHM 100.2	IHM 100.3	IHM 130.1	IHM 130.2	IHM 130.3	
Inj 1	6063.9	6083.6	4324.0	4295.8	4282.7	6177.8	6099.1	5973.4	7788.9	7730.0	Missed	
Inj 2	6062.9	6082.2	4325.1	4312.0	4266.2	6178.6	6080.1	5939.9	7787.0	7710.7	7946.4	
Inj 3	6062.6	6087.8	4319.7	4292.0	4289.8	6187.2	6090.6	5957.1	7770.7	7752.4	7918.2	
Mean Area at 218 nm	6063.1	6084.5	4322.9	4299.9	4279.6	6181.2	6089.9	5956.8	7782.2	7731.0	7932.3	
Injection Repeatability (%)	0.01%	0.05%	0.07%	0.25%	0.28%	0.08%	0.16%	0.28%	0.13%	0.27%	0.25%	
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	250.2	250.2	178.1	177.1	176.3	254.6	250.9	245.4	320.6	318.5	326.8	
Recovery (%)			101.7%	101.1%	100.7%	101.8%	100.3%	98.1%	98.6%	97.9%	100.5%	
Per Level		RSD (n=3)		0.50%			1.86%		1.34%			
		Mean (n=3)		101.2%			100.0%		99.0%			
		CI95% (%)		99.9-102.4			95.4-104.7		95.7-102.3			
Total		RSD (n=9)	1.50%									
		Mean (n=9)	100.1%									
		CI95% (%)	98.9-101.2									

**EXATIDÃO: Formulação Loceryl® esmalte – LOE (adição de amorolfina na amostra do medicamento).**

Accuracy Loceryl Lacquer - 3 levels x 3 repetitions (standard added to Lacquer)													
Injection Repetition	AMF 50 (100%)		70%			100%			130%				
	Standard 1.1	Standard 1.2	Lacquer 1.1	Lacquer 1.2	LoL 70.1	LoL 70.2	LoL 70.3	LoL 100.1	LoL 100.2	LoL 100.3	LoL 130.1	LoL 130.2	LoL 130.3
Inj 1	1306.1	1298.0	577.3	577.2	921.6	869.5	862.9	1242.8	Missed	1305.4	1618.4	1683.5	1653.6
Inj 2	1299.6	1300.2	574.5	573.6	922.7	869.4	867.4	1238.5	1226.0	1308.5	1619.9	1672.2	1657.5
Inj 3	1313.7	1313.0	570.4	Missed	921.4	875.2	859.7	1252.1	1225.4	1305.1	1621.1	1679	1661.6
Mean Area at 218 nm	1306.5	1303.7	574.1	575.4	921.9	871.4	863.3	1244.5	1225.7	1306.3	1619.8	1678.2	1657.6
Injection Repeatability (%)	0.54%	0.62%	0.60%	0.44%	0.08%	0.38%	0.45%	0.56%	0.03%	0.14%	0.08%	0.34%	0.24%
Conc. AMF.HCl (µg/mL)	50.4	50.4	22.2	22.2	35.6	33.7	33.3	48.1	47.3	50.4	62.6	64.8	64.0
Lacquer added (mg)			17.7	18.0	20.5	19.1	18.6	18.4	18.1	19.9	17.5	19.0	18.9
		Lacquer Factor (µg/mL*mg)	1.24	Lacquer (µg/mL)	25.5	23.7	23.1	22.9	22.5	24.7	21.8	23.6	23.5
		Total - Lacquer (µg/mL)		10.1	9.9	10.2	25.2	24.8	25.7	40.8	41.2	40.5	
Recovery (%)				100.3%	98.2%	101.3%	99.9%	98.5%	102.0%	101.2%	102.1%	100.5%	
Per Level		RSD (n=3)		1.58%			1.75%		0.83%				
		Mean (n=3)		100.0%			100.1%		101.3%				
		CI95% (%)		96.0-103.9			95.8-104.5		99.2-103.3				
Total		RSD (n=9)	1.39%										
		Mean (n=9)	100.5%										
		CI95% (%)	99.4-101.5										

**EXATIDÃO: Formulação Loceryl® creme – LOC (adição de amorolfina na amostra do medicamento).**

Accuracy Loceryl Cream - 3 levels x 3 repetitions (standard added to Cream)													
Injection Repetition	AMF 50 (100%)				70%			100%			130%		
	Standard 1.1	Standard 1.2	Cream 1.1	Cream 1.2	LoL 70.1	LoL 70.2	LoL 70.3	LoL 100.1	LoL 100.2	LoL 100.3	LoL 130.1	LoL 130.2	LoL 130.3
Inj 1	1263.1	1291.6	637.1	636.6	949.5	935.5	947.2	1337.6	1329.7	1322.6	1745.1	1715.4	1667.0
Inj 2	1270.3	1290.7	642.7	633.1	966.6	940.6	955.1	1330.4	1335.7	1331.7	1751.8	1723.3	1692.8
Inj 3	1264.4	1298.8	639.6	635.9	968.7	941.9	957.2	1332.5	1327.6	1337.4	1769.4	1725.6	1697.0
Mean Area at 218 nm Injection	1265.9	1293.7	639.8	635.2	961.6	939.3	953.2	1333.5	1331.0	1330.6	1755.4	1721.4	1685.6
Repeatability (%)	0.30%	0.34%	0.44%	0.29%	1.10%	0.36%	0.55%	0.28%	0.32%	0.56%	0.71%	0.31%	0.96%
Conc. AMF.HCl	50.04	50.04	25.0	24.8	37.6	36.7	37.3	52.1	52.0	52.0	68.6	67.3	65.9
Cream added (mg)			242.9	244.7	269.5	260.1	267.6	260.1	262.4	264.8	278.0	262.1	247.7
		Cream Factor (µg/(mL*mg))	0.102	Cream (µg/mL)	27.6	26.6	27.4	26.6	26.8	27.1	28.4	26.8	25.3
			Total - Cream (µg/mL)	10.0	10.1	9.9	25.5	25.2	25.0	40.2	40.5	40.6	
Recovery (%)				100.4%	101.3%	99.0%	102.1%	100.8%	99.7%	100.5%	101.2%	101.4%	
Per Level		RSD (n=3)				1.13%			1.18%			0.48%	
		Mean (n=3)				100.2%			100.9%			101.0%	
		C195% (%)				97.4-103.0			97.9-103.8			99.8-102.2	
Total		RSD (n=9)			0.93%								
		Mean (n=9)			100.7%								
		C195% (%)			100.0-101.4								

**ANEXO VI**  
**Estabilidade da Amorolfina**



## Resultados da Estabilidade da Solução Padrão de Análise da Amorfina.

Tabela com resultados da estabilidade em solução do padrão de amorfina 200 µg/mL.

Padrão de Amorfina a 200 µg/mL.

Tempo (dias)	0	1	2	3	4
P200a	5146.4	5135.3	5148.1	5155.7	5183.9
(Área do pico)	5171.9	5154.9	5134.2	5157	5198.3
	<b>5159.2</b>	<b>5145.1</b>	<b>5141.2</b>	<b>5156.4</b>	<b>5191.1</b>
P200b	5165.6	5157.3	5131.3	5146.7	5147.3
(Área do pico)	5174.2	5167.9	5175.3	5148.3	5159.2
	<b>5169.9</b>	<b>5162.6</b>	<b>5153.3</b>	<b>5147.5</b>	<b>5153.3</b>
P200c	5034.5	5041.8	5043.3	5042.4	5055.2
(Área do pico)	5048.4	5050.2	5032.3	5045.4	5055.6
	<b>5041.5</b>	<b>5046.0</b>	<b>5037.8</b>	<b>5043.9</b>	<b>5055.4</b>

Tempo (dias)	P200a	P200b	P200c	Média	DP
0	100.0%	100.0%	100.0%	<b>100.0%</b>	<b>0.00%</b>
1	99.7%	99.9%	100.1%	<b>99.9%</b>	<b>0.18%</b>
2	99.7%	99.7%	99.9%	<b>99.8%</b>	<b>0.15%</b>
3	99.9%	99.6%	100.0%	<b>99.9%</b>	<b>0.25%</b>
4	100.6%	99.7%	100.3%	<b>100.2%</b>	<b>0.48%</b>
Média	100.0%	99.8%	100.1%	99.9%	0.21%
DPR	0.38%	0.17%	0.13%	0.17%	

Sobreposição dos cromatogramas do padrão de amorfina 200 µg/mL demonstrando pequena variação nas alturas do pico durante os quatro dias de análise da estabilidade. Resultados representativos de 1 vial.

Ampliação do cromatograma anterior para melhor visualização da reprodução dos tempos de retenção, forma e altura dos picos do padrão de amorfina 200 µg/mL.

