**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA DEGRADAÇÃO FORÇADA
DE TERCONAZOL POR LC/MS-MS**J. W. V. SILVA¹, D. M. D. da Silva¹, N. B. T. da Silva¹, M. L. DUARTE¹, D. C. G. BEDOR¹¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e CosméticoE-mail para contato: w.viturino@hotmail.com

RESUMO – *A candidíase vulvovaginal é um problema que acomete a maioria das mulheres pelo menos uma vez na vida. Por sua vez, o terconazol é um antifúngico do grupo dos triazóis e tem sido utilizado no tratamento da vulvovaginite fúngica de forma bastante eficaz. Porém para que este medicamento seja produzido, faz-se necessário a realização de estudos que garantam o seu uso seguro e eficaz. Este trabalho traz como objetivo o estudo preliminar de degradação forçada, afim de avaliar as condições de estresse as quais o terconazol é susceptível de degradação. Para isto, os estudos de degradação foram guiados pelas recomendações trazidas pela ICH, e avaliados quanto à condições forçadas de degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica e de aquecimento. Na análise por LC-MS/MS em espectrômetro de massa triploquadrupolo o terconazol apresentou melhor ionização no modo positivo, sendo os fragmentos de 219 e 192 m/z os mais abundantes e usados para monitoramento das áreas dos picos cromatográficos. Os melhores resultados foram obtidos através de coluna C18 (150 x 2,0 mm) e fase móvel constituída por metanol:água (70:30), com fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 10 µL. O composto estudado demonstrou-se bastante sensível às condições ácidas, oxidativas e fotolíticas chegando a uma redução de 12, 43 e 99% nas áreas dos picos cromatográficos, respectivamente; apresentando-se estável às condições básicas e de aquecimento.*

Palavras chave: antifúngico; espectrometria de massas; produtos de degradação.

ABSTRACT – *Vulvovaginal candidiasis is a disease that affects most women at least once in life. Terconazole is an antifungal of the triazoles group and has been used in the treatment of fungal vulvovaginitis showing good response. However, in the production of this medicine, it is necessary to carry out studies that guarantee its safe and effective use. This work aims at the preliminary study of forced degradation, in order to evaluate the stress conditions in which terconazole is susceptible to degradation. For this, the degradation studies were guided by the recommendations described on ICH, and evaluated for forced conditions of acid degradation, basic, oxidative, photolytic and heating. Using LC-MS / MS analysis in a triple-mass spectrometer, terconazole showed*

better ionization in the positive mode, with the 219 and 192 m/z fragments being the most abundant and used to monitor the areas of the chromatographic peaks. The best results were obtained through a C18 column (150 x 2.0 mm) and mobile phase consisting of methanol: water (70:30), with a flow of 0.4 mL / min and injection volume of 10 µL. The studied compound was very sensitive to the acid, oxidative and photolytic conditions reaching a reduction of 12, 43 and 99% in the areas of the chromatographic peaks, respectively; but the drug was stable in basic and heating conditions.

Keywords: antifungal; mass spectrometry; degradation products.

1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal, é a segunda causa mais comum de vaginite e representa cerca de 40% dos problemas vaginais das pacientes atendidas na atenção básica, afetando 75% das mulheres pelo menos uma vez na vida. As recomendações das diretrizes terapêuticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) trazem o grupo dos triazóis de uso tópico como os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da candidíase vulvovaginal (NYIRJESY, SOBEL, 2003). Este grupo teve o terconazol (PM 532 g/mol) como seu primeiro medicamento comercializado e desde então tem apresentado grande eficácia em regimes de tratamento de curto prazo, além de promover altas taxas de cura nos exames clínicos e micológicos, apresentando baixas taxas de reincidência quando comparado a outras drogas antifúngicas do grupo imidazol, o que evidencia a importância da produção deste medicamento (RIZK et al., 2014).

Entre os aspectos importantes relacionados ao desenvolvimento e registro de medicamentos está a estabilidade, que pode ser definida como a capacidade de um produto manter suas especificações frente as condições a que possam estar expostos desde a fabricação até o final de prazo de validade estabelecido. Fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e outros intrínsecos às propriedades físico-químicas, processo produtivo, bem como materiais de embalagem podem influenciar diretamente na estabilidade de medicamentos e acelerar o processo de degradação (SILVA et al., 2009).

Assim, problemas relacionados a instabilidade de medicamentos podem ter entre outras consequências a degradação do fármaco em estruturas sem atividade farmacológica ou redução da mesma, podendo levar a ineficácia terapêutica, além da formação de produtos de degradação (PDs) que apresentam potencial toxicidade, pondo em risco a sua segurança. Dessa forma, há necessidade de estudos que avaliem a estabilidade destes produtos por parte das indústrias farmacêuticas (BAERTSCHI, 2001).

Para que se possa avaliar os produtos de degradação de um produto farmacêutico, recorre-se aos testes de degradação forçada, que consistem em submeter o produto a condições forçadas de degradação superiores as estabelecidas para os testes de estabilidade acelerada. Estes testes incluem obrigatoriamente a exposição do produto ao aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos (ICH, 2003; BRASIL, 2015). Além disso, o estudo de

degradação forçada permite o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade (MIE), que deve ser capaz de realizar a separação, detecção e quantificação, quando necessário, dos PDs, mesmo que em baixas concentrações, e com seletividade, bem como prover informações sobre as rotas de degradação desses subprodutos que podem surgir durante o período de armazenamento (FUCINA, 2012). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é realizar um estudo preliminar de degradação forçada do fármaco terconazol, com o intuito de investigar sua estabilidade a tais condições, como uma forma de avaliar a possível formação de produtos de degradação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR LC/MS-MS

Para o desenvolvimento do método foi utilizado um cromatógrafo à líquido de ultra eficiência (Nexera X2, Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas triploquadrupolo e interface por eletronebulização (Q-TRAP 5500® LC- MS/MS, Sciex, EUA). Inicialmente, soluções de terconazol a 20 ng/mL foram infundidas no espectrômetro de massas para determinação de seu modo de ionização. Para determinação do perfil de fragmentação, bem como para otimização das condições espectrofotométricas foi realizado o experimento automático de infusão por fluxo contínuo (FIA). Para realização da separação cromatográfica foram testadas diferentes colunas e combinações de solventes utilizados como fase móvel, levando em consideração a polaridade do terconazol. As avaliações de volume de injeção, volume morto, fluxo de fase móvel e temperatura do forno foram realizadas para demonstração das melhores condições.

2.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo de degradação forçada foi realizado seguindo as diretrizes trazidas pela *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2017), bem como a RDC 53/2015 que estabelece parâmetros para realização dos estudos de degradação.

Para o estudo de degradação forçada por condições ácida e básica, foram preparadas soluções de terconazol com concentração final de 20 µg/mL em triplicata, utilizando como solvente soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio com concentrações de 0,4 e 2 M. Depois de prontas, as soluções foram deixadas a temperatura ambiente e foram submetidas à análise no tempo de 72 horas. O estudo de degradação forçada em solução oxidante foi realizado de acordo com a metodologia descrita para realização de degradação forçada em soluções ácida e básica, porém utilizando solução de peróxido de hidrogênio 1,5 e 3% como solvente. A solução antes de ser analisada foi brandamente aquecida para eliminar o excesso do peróxido, a fim de diminuir a resposta analítica. Para avaliação da degradação fotolítica, foram preparadas soluções de terconazol 20 µg/mL em triplicata e posteriormente expostas a luz solar por 72 horas. Como controle, foram utilizadas amostras nas mesmas condições das soluções teste, porém protegidas com papel alumínio. Para realização do estudo de degradação por aquecimento, quantidade igual a 100 mg de terconazol (IFA) foi pesada e acondicionada em placa de Petri e colocada em estufa a uma temperatura controlada de 80° C por um período de 72. Cada amostra coletada foi preparada e diluída com metanol para uma

concentração de 20 ng/mL para posterior análise no sistema LC/MS-MS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO

O modo de ionização do terconazol foi testado nos modos positivos e negativos no espectrômetro de massas triplo quadrupolo, com o objetivo de determinar o melhor modo para ser utilizado no método. Como resultado observou-se que o terconazol apresenta boa ionização em ambos os modos, porém foi escolhido o modo positivo por apresentar maior intensidade de sinal. A determinação do íon precursor foi avaliada através do modo de varredura Q1 MultipleIon (Q1MS) e foi observado que o sinal do Terconazol $[M+H]^+$ 532 m/z foi o de maior intensidade. Por sua vez, o seu perfil de fragmentação demonstrou que os fragmentos mais abundantes foram os de 219 e 192 m/z , como já demonstrado em estudos anteriores (CHITESCU et al., 2012). O espectro de massa do terconazol e de seus picos isotópicos, bem como seu perfil de fragmentação são demonstrados nas figuras 1 e 2 respectivamente.

Figura 1 – Espectro de massa do terconazol e de seus picos isotópicos.

Figura 2 – Perfil de fragmentação do terconazol.

A tabela 1 traz os parâmetros espectrométricos obtidos através do espectrômetro de massas triploquadrupolo, otimizados através do experimento automático de infusão por fluxo contínuo (FIA).

Tabela 1 – Parâmetros espectrométricos obtidos pelo FIA

Q 3 Mass m/z	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
219,0	91	10	41	22
192,1	91	9	39	22

Entre as colunas cromatográficas testadas, a Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 (150 x 2.0 mm) da Shimadzu foi a que apresentou os melhores resultados, quando comparados aos da SunFire C18 (50 x 2.1 mm) da Waters e Kinetex C18 (100 x 2.1 mm) da Allcrom. A escolha da fase móvel foi feita com base na disponibilidade do laboratório, onde metanol e água foram testados em diferentes proporções com a finalidade de se obter o melhor formato de pico e intensidade de sinal analítico, sendo na proporção de 70:30 (MeOH:H₂O) obtidos os melhores resultados. O volume de injeção foi fixado em 10 µL. Apesar da alta lipofilicidade, o terconazol apresentou baixa retensividade em colunas C18, uma vez que em valores de pH mais baixos ele se apresenta principalmente na sua forma ionizada, o que lhe confere menor afinidade por fases estacionárias apolares. A alcalinização do pH da fase móvel mostra-se como uma alternativa para o aumento de sua retenção, visto que o terconazol é uma base forte.

O pico cromatográfico do terconazol na proporção de fase móvel estabelecida apresentou simetria adequada e tempo de retenção fora do volume morto o que é fundamental em análises cromatográficas. A figura 3 traz o pico do terconazol, gerado a partir do sistema LC-MS/MS por uma amostra na concentração de 20 ng/mL,

Figura 3 – Picos cromatográficos dos fragmentos mais intensos do terconazol.

3.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Poucos são os métodos analíticos descritos na literatura para o terconazol, principalmente aqueles relacionados a estudo de estabilidade aplicados a produtos de degradação (EKIERT, 2010). O método proposto foi aplicado na avaliação da estabilidade inerente do terconazol a diferentes condições de estresse, tais como:

Alcalina, ácidas, oxidativas, térmicas e fotolíticas.

O composto estudado demonstrou-se bastante sensível às condições oxidativas, principalmente naquelas onde o peróxido de hidrogênio estava em maior concentração (3%), chegando a uma redução de 50% da área do pico cromatográfico, o que não foi demonstrado nas amostras com 1,5%. A sensibilidade de outros fármacos da classe dos triazóis à oxidação tem sido demonstrada na literatura (ZHONG et al.; 2012). Da mesma forma, foi observada uma degradação de cerca de 10% e 13% para as amostras submetidas à 0,4 e 2 M de HCl, respectivamente. Por outro lado, não houve redução significativa do sinal analítico do terconazol submetido à solução alcalina, mesmo quando expostas a maior concentração molar, o que demonstra sua estabilidade a esta condição. Por sua vez, RIZK e colaboradores (2014) realizaram um estudo que demonstrou a estabilidade do terconazol, na forma farmacêutica supositório, à solução oxidativa de peróxido de hidrogênio 30% por 24 horas, divergindo dos resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados de degradação fotolítica revelaram grande sensibilidade do terconazol à luz, demonstrando uma fotólise de quase 100%, o que foi evidenciado pela brusca diminuição dos picos cromatográficos. Diferentemente disso, a exposição à alta temperatura evidenciou um incremento nas áreas dos picos, o que pode ter acontecido por um aumento de massa pesada de terconazol, dada a redução da umidade do pó. No entanto, uma investigação mais aprofundada deve ser realizada.

A tabela 2 traz um resumo dos resultados obtidos nos testes de degradação forçada do terconazol. A porcentagem degradada foi calculada tomando como base a média das áreas dos picos cromatográficos das amostras submetidas às condições de estresse com amostras controle que não foram submetidas a tais condições.

Tabela 2- Percentual de degradação do terconazol nas diferentes condições de estresse.

Condição degradativa	Áreas media dos picos (mAU)	Percentual degradado (%)
Peróxido 1,5%	1810247	5,752
Peróxido 3%	1088391	43,334
HCl 0,4 M	1725853	10,146
HCl 2M	1681142	12,474
NaOH 0,4 M	1943242	0,126
NaOH 2 M	1918315	0,390
Aquecimento	2258816	-7,370*
Exposição à luz	48350	99,692

* Aumento percentual

Em compostos nitrogenados, a depender dos grupamentos que formam a cadeia lateral de ambos nitrogênios, há susceptibilidade maior para a oxidação de um dos nitrogênios do anel, sendo estes conhecimentos muito importantes em estudos de degradação forçada (FREED et al., 2008). Há várias discussões entre os pesquisadores a

respeito de qual percentual de degradação é o ideal. Um valor entre 5% e 20% é considerado razoável para fins de validação dos ensaios cromatográficos. Para fins regulatórios a RDC nº53, especifica que os testes devem promover degradação superior à 10% e inferior àquela que levaria a degradação completa da amostra, o que segundo esta poderia comprometer o teste. (BLESSY et al., 2014).

4. CONCLUSÃO

Os estudos de degradação forçada representam uma abordagem necessária na avaliação de formação de produtos de degradação em medicamentos. O método por LC/MS-MS proposto se mostrou adequado na avaliação preliminar do perfil de degradação do terconazol submetido aos estudos de degradação forçada, que se apresentou instável nas condições ácidas, oxidativas e fotolíticas e estável nas condições básicas e de aquecimento, após 72 horas de estudo. Foi observado que a degradação do terconazol é dependente da concentração de peróxido e ácido clorídrico, sugerindo uma cinética de degradação de primeira ordem, e independe da concentração de hidróxido de sódio. Faz-se necessária a otimização dos experimentos de degradação por aquecimento realizados, com a finalidade de realizar uma melhor avaliação acerca do incremento das áreas dos picos cromatográficos dessas amostras. Esta avaliação preliminar de degradação forçada é muito importante e representa o primeiro passo na realização de estudos com produtos de degradação.

5. REFERÊNCIAS

BAERTSCHI, S. W. **Pharmaceutical Stress testing: Predictive Drug Degradation**. 2ª edição. Nova Ioque: Informa Healthcare, 2001.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **J Pharm Biomed Anal**, v. 4, p. 159–165, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**, Brasília. ANVISA, 2015.

CHITESCU, Carmen Lidia, et al. Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water by U-HPLC–Exactive Orbitrap MS. **Anal Bioanal Chem.**, vol. 403, p. 2997-3011, 2012.

EKIERT, R. J.; KRZEK, J.; TALIK, P. Chromatographic and electrophoretic techniques used in the analysis of triazole antifungal agents—a review. **Talanta**, vol. 82, p. 1090-1100, 2010.

FREED, A. L. et al. pH control of nucleophilic/electrophilic oxidation. **Int J Pharm.**, v. 357, p. 180–188, 2008.

FUCINA, G. et al. Development and validation of a stability indicative HPLC-PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae, **Talanta**, vol. 101, p. 530-536, 2012.

NYIRJESY, P.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, vol. 30, p. 671-684, 2003.

RIGNALL, A. ICHQ1A (R2). **Stability Testing of New Drug Substance and Product and ICHQ1C Stability Testing of New Dosage Forms**. ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide, 2017.

RIZK, Mohamed, et al. Micellar liquid chromatographic determination of sertaconazole and terconazole in bulk, pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma. *B-FOPCU*, 2014, 52.1: 155-164.

SILVA, K. E. R., et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *J. Basic Appl. Pharm Sci.*, p.129135, 2009.

ZHONG, W. et al. Structural characterization of a novel degradant of the antifungal agent posaconazole. *J Pharm Biomed Anal*, v. 66, p. 40–49, 2012.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético- UFPE, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPE.