

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

Avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol e determinação da atividade antifúngica e da segurança biológica *in vivo* e *in vitro* do xampu de cetoconazol

Tese de Doutorado

Inara Staub

Porto Alegre, 2005.

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

Avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol e determinação da atividade antifúngica e da segurança biológica *in vivo* e *in vitro* do xampu de cetoconazol

INARA STAUB

Porto Alegre, 2005.

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

Avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol e determinação da atividade antifúngica e da segurança biológica *in vivo* e *in vitro* do xampu de cetoconazol

Tese apresentada por **Inara Staub** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bergold
Co-orientadora: Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Porto Alegre, 2005.

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 06 de julho de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Alex Flores
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Teresa Dalla Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

S798a	<p>Staub, Inara</p> <p>Avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol e determinação da atividade antifúngica e da segurança biológica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do xampu de cetoconazol / Inara Staub – Porto Alegre: UFRGS, 2005. - p.224: il., tab., gráf.</p> <p>Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. Cetoconazol. 2. Xampus. 3. Antifúngicos. 4. Fotoestabilidade. 5. Validação: método de análise de fármacos. I. Bergold, Ana Maria.; II. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. III. Título.</p> <p>CDU: 615.2.011</p>
-------	--

Bibliotecária Responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Agradecimentos a CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e aos Laboratórios de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade que disponibilizaram todos equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos.

*A vida pode florescer
numa existência inteira.
Mas tem de ser buscada, tem de ser
conquistada.*

Lya Luft

*Ao Auro, meu noivo,
por todo amor e carinho.*

*A minha família,
por sempre
acreditar em mim.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Maria Bergold meu agradecimento pela convivência, amizade, incentivo, conhecimento científico e ajuda de quem foi fundamental para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela receptividade, esclarecimentos e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Auro pelo amor, carinho, compreensão e constante incentivo.

A minha família pelo carinho e apoio em mais esta etapa da minha vida.

Aos Laboratórios de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade pela disponibilização dos equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Laboratório de Química Farmacêutica: Dr. Pedro Eduardo Fröhlich, Dr. Jarbas Alves Montanha e Dra. Grace Gosmann pelos esclarecimentos.

À Profa. Dra. Adriana Pohlman pela receptividade e pelo auxílio na interpretação dos dados dos métodos espectroscópicos.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto e Dra. Áurea Silveira Cruz, do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na execução e interpretação dos dados da avaliação da segurança biológica.

Aos Laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química (UFRGS) e Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química (UFSM) pela execução das análises de RMN.

Ao Dr. Pascal Sonnet da Faculté de Pharmacie, Université Picardie Jules Verne (Amiens-França) pela execução das análises de RMN.

Ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM-UFRGS) pela execução das análises de espectrometria de massas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Eliane, Carolina, Vanessa, Alexandre, Sirlei, Andréa, Marinês, Lidiane, Liliana, Rochele,

Letícia, Tiago, Tiago Mota, Marquinho, Luis, Sílvio, Jeferson, Raquel e Larissa pelo convívio e amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Controle de Qualidade: Cristiane, Cássia, Ana Rita, Vanessa e Júlia pela ajuda durante a realização dos ensaios microbiológicos.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica: Claiton, Simone Gnoato, Simone Quintana e Juliane pela ajuda durante o isolamento dos produtos de degradação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xx
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvii
RESUMO.....	xxix
ABSTRACT.....	xxxii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
2.1. Objetivos gerais.....	07
2.2. Objetivos específicos.....	07
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1. Infecções fúngicas.....	11
3.2. Pele e anexos cutâneos.....	12
3.3. Pitíriase versicolor e dermatite seborréica.....	14
3.4. Xampus.....	15
3.5. Antifúngicos.....	19
3.5.1. Histórico.....	19
3.5.2. Cetoconazol.....	22
3.5.2.1. Uso oral.....	23
3.5.2.2. Uso tópico.....	25
3.5.2.3. Métodos para determinação do cetoconazol.....	27

3.5.2.4. Estabilidade.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. DESCRIÇÃO GERAL.....	35
4.2. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR).....	35
4.3. MATÉRIA-PRIMA.....	36
<u>4.3.1. Análise qualitativa da matéria-prima.....</u>	<u>36</u>
4.3.1.1. Características organolépticas.....	36
4.3.1.2. Determinação do ponto de fusão.....	36
4.3.1.3. Rotação específica.....	36
4.3.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	37
4.3.1.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.....	38
4.3.1.6. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	38
4.3.1.7. Perda por dessecação.....	38
<u>4.3.2. Análise quantitativa da matéria-prima.....</u>	<u>38</u>
4.3.2.1. Volumetria em meio não-aquoso.....	38
4.4 FORMAS FARMACÊUTICAS.....	39
<u>4.4.1. Xampu de cetoconazol 2 % preparado no laboratório (Xb-Ceto).....</u>	<u>39</u>
4.4.1.1. Preparo do xampu base (Xb).....	39
4.4.1.2. Preparo do xampu de cetoconazol 2 % (Xb-Ceto).....	40
<u>4.4.2. Xampu comercial de cetoconazol 2% (Form1 e Form2).....</u>	<u>40</u>
<u>4.4.3. Solução Metanólica 2 % (Sol-ceto).....</u>	<u>42</u>
4.5. ANÁLISE DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	42
<u>4.5.1. Análise Qualitativa.....</u>	<u>42</u>
4.5.1.1. Características organolépticas.....	42
4.5.1.2. Determinação da densidade.....	42
4.5.1.3. Determinação do pH.....	43
4.5.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	43

<u>4.5.2. Análise Quantitativa</u>	44
4.5.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
4.5.2.1.1. Reagentes.....	44
4.5.2.1.2. Equipamento.....	45
4.5.2.1.3. Fase móvel.....	45
4.5.2.1.4. Condições cromatográficas.....	45
4.5.2.1.5. Validação.....	46
4.5.2.1.5.1. Linearidade.....	46
4.5.2.1.5.2. Precisão.....	46
A) <i>Preparo da solução de cetoconazol SQR</i>	47
B) <i>Preparo das soluções amostra</i>	47
C) <i>Cálculos</i>	47
4.5.2.1.5.3. Especificidade.....	48
4.5.2.1.5.4. Exatidão.....	48
4.5.2.1.5.5. Robustez.....	49
A) <i>Estabilidade da solução</i>	49
B) <i>Modificações na fase móvel</i>	50
4.5.2.1.5.6. Limites de quantificação e detecção.....	50
4.5.2.2. Ensaio microbiológico.....	51
4.5.2.2.1. Material.....	52
4.5.2.2.2. Preparo do meio de cultura.....	52
4.5.2.2.3. Preparo da solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0.....	53
4.5.2.2.4. Preparo da solução salina.....	53
4.5.2.2.5. Preparo do inóculo.....	53
4.5.2.2.6. Validação.....	54
4.5.2.2.6.1. Preparo das soluções de cetoconazol SQR.....	54
4.5.2.2.6.2. Preparo das soluções amostra.....	55

4.5.2.2.6.3. Ensaio.....	55
4.5.2.2.6.4. Cálculos.....	56
4.5.2.2.6.5. Exatidão.....	56
A) <i>Preparo das soluções de cetoconazol SQR</i>	57
B) <i>Preparo das soluções amostra</i>	57
C) <i>Preparo das soluções R1, R2 e R3</i>	57
4.6. ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE.....	58
<u>4.6.1. Avaliação do cetoconazol frente à luz UV-C e luz UV-A</u>	58
4.6.1.1. Amostras expostas à luz UV.....	58
A) <i>Matéria-prima</i>	58
B) <i>Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)</i>	59
C) <i>Xampu de cetoconazol 2 % (Xb-ceto)</i>	59
4.6.1.2. Determinação do teor de cetoconazol.....	60
<u>4.6.2. Avaliação do cetoconazol frente à luz natural</u>	60
4.6.2.1. Amostras expostas à luz natural.....	61
A) <i>Matéria-prima</i>	61
B) <i>Solução metanólica de cetoconazol 2 %</i>	61
C) <i>Xampu de cetoconazol 2 %</i>	61
D) <i>Formulações comerciais</i>	61
4.6.2.2. Detecção dos produtos de degradação.....	62
4.6.2.3. Determinação do teor de cetoconazol.....	62
4.6.2.4. Determinação da densidade.....	62
4.6.2.5. Determinação do pH.....	62
4.7. ESTABILIDADE QUÍMICA.....	63
<u>4.7.1. Degradação ácida</u>	63
A) <i>Matéria-prima</i>	63
B) <i>Formas farmacêuticas</i>	63

<u>4.7.2. Degradação alcalina</u>	63
A) <i>Matéria-prima</i>	63
B) <i>Formas farmacêuticas</i>	64
<u>4.7.3. Degradação com peróxido de hidrogênio</u>	64
A) <i>Matéria-prima</i>	64
B) <i>Formas farmacêuticas</i>	64
4.8. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	65
<u>4.8.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</u>	65
4.8.1.1. Degradação das amostras.....	65
4.8.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa.....	65
4.8.1.2.1. Equipamento.....	66
4.8.1.2.2. Fase móvel.....	66
4.8.1.2.3. Condições cromatográficas.....	66
4.8.1.3. Determinação da pureza.....	66
4.8.1.4. Concentração das frações.....	67
4.8.1.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	67
<u>4.8.2. Espectrometria de massas (MS)</u>	68
4.8.2.1. Degradação das amostras.....	68
4.8.2.2. Equipamento e condições cromatográficas.....	68
4.8.2.3. Condições da espectrometria de massas - ionização eletrospray.....	69
4.9. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA BIOLÓGICA.....	69
<u>4.9.1. Avaliação da toxicidade aguda com efeito local</u>	69
4.9.1.1. Teste de irritação ocular.....	70
<u>4.9.2. Avaliação <i>in vitro</i></u>	72
4.9.2.1. Avaliação do potencial de citotoxicidade <i>in vitro</i>	72
4.9.2.1.1. Culturas celulares.....	73
4.9.2.1.2. Método de difusão em ágar.....	73

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1. MATÉRIA-PRIMA.....	77
<u>5.1.1. Análise qualitativa da matéria-prima</u>	77
5.1.1.1. Características organolépticas.....	77
5.1.1.2. Determinação do ponto de fusão.....	77
5.1.1.3. Rotação específica.....	78
5.1.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	78
5.1.1.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho.....	79
5.1.1.6. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	82
5.1.1.7. Perda por dessecação.....	83
<u>5.1.2. Análise quantitativa</u>	83
5.1.2.1. Volumetria em meio não-aquoso.....	83
5.2. FORMAS FARMACÊUTICAS.....	84
<u>5.2.1. Xampu de cetoconazol 2 % preparado no laboratório (Xb-Ceto)</u>	84
<u>5.2.2. Xampu comercial de cetoconazol 2% (Form1 e Form2)</u>	87
<u>5.2.3. Solução metanólica 2 % (Sol-ceto)</u>	88
5.3. ANÁLISE DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	88
<u>5.3.1. Análise Qualitativa</u>	88
5.3.1.1. Características organolépticas.....	88
5.3.1.2. Determinação da densidade.....	88
5.3.1.3. Determinação do pH.....	89
5.3.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	89
<u>5.3.2. Análise Quantitativa</u>	91
5.3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	92
5.3.2.1.1. Linearidade.....	97
5.3.2.1.2. Precisão.....	98

5.3.2.1.3. Especificidade.....	100
5.3.2.1.4. Exatidão.....	102
5.3.2.1.5. Robustez.....	103
5.3.2.1.6. Limites de detecção e quantificação.....	105
5.3.2.1.7. Validade do ensaio.....	106
5.3.2.2. Ensaio microbiológico.....	107
5.3.2.2.1. Linearidade.....	109
5.3.2.2.2. Precisão.....	111
5.3.2.2.3. Exatidão.....	112
5.3.2.2.4. Validade do ensaio.....	113
5.3.2.3. Análise comparativa dos métodos.....	114
5.4. ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE.....	115
<u>5.4.1. Avaliação do cetoconazol frente à luz UV-C e luz UV-A.....</u>	117
5.4.1.1. Amostras expostas à luz UV.....	117
A) <i>Matéria-prima</i>	117
B) <i>Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)</i>	119
C) <i>Xampu de cetoconazol 2 % (Xb-ceto)</i>	123
<u>5.4.2. Avaliação do cetoconazol frente à luz natural.....</u>	128
5.4.2.1. Amostras expostas à luz natural.....	128
A) <i>Matéria-prima</i>	128
B) <i>Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)</i>	129
C) <i>Xampu de cetoconazol 2 % (Xb-ceto) e formulações comerciais (Form1 e Form2)</i>	133
5.5. ESTABILIDADE QUÍMICA.....	138
<u>5.5.1. Degradação ácida e alcalina.....</u>	138
<u>5.5.2. Degradação com peróxido de hidrogênio.....</u>	139
5.6. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	142

<u>5.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa</u>	145
<u>5.6.2. Determinação da pureza</u>	145
<u>5.6.3. Análise do cetoconazol</u>	149
<u>5.6.4. Análise do produto de degradação denominado Fr1</u>	156
<u>5.6.5. Análise do produto isolado denominado Fr2</u>	163
5.7. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA BIOLÓGICA	170
<u>5.7.1. Avaliação da toxicidade aguda com efeito local</u>	171
<u>5.7.2. Avaliação <i>in vitro</i></u>	173
6. CONCLUSÕES	177
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187
ANEXO 1	199
ANEXO 2	203
ANEXO 3	213
CURRICULUM VITAE	219

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micoses sistêmicas e fungos causadores.....	11
Tabela 2 – Relação das principais categorias de matérias-primas e respectiva ação predominante em formulações de xampu.....	18
Tabela 3 – Alguns agentes tópicos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas superficiais.....	21
Tabela 4 – Resumos dos métodos utilizados para a determinação do cetoconazol por CLAE em formas farmacêuticas.....	29
Tabela 5 – Parâmetros utilizados para a avaliação de xampu de cetoconazol por ensaio microbiológico.....	51
Tabela 6 – Graduação das reações observadas no teste de irritação ocular de acordo com a escala de Draize.....	71
Tabela 7 – Tabela de graduação da classificação do produto após teste de irritação ocular.....	72
Tabela 8 – Índice de zona e descrição da reatividade para a avaliação do potencial de citotoxicidade <i>in vitro</i> – método de difusão em ágar.....	74
Tabela 9 -Valores obtidos na determinação do ponto de fusão de Ceto1 e Ceto2, através do equipamento, METTLER TOLEDO modelo FP90	78
Tabela 10 – Frequências de absorção das principais bandas do cetoconazol e suas respectivas atribuições, realizado por espectrofotometria na região do infravermelho.....	81
Tabela 11 – Valores obtidos na determinação do teor de Ceto1 e Ceto2 através de método de VMNA.....	84
Tabela 12 - Valores da determinação da densidade de Xb-ceto, Form1 e Form2.....	89
Tabela 13 - Valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão do cetoconazol por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....	97
Tabela 14 – Valores experimentais obtidos na determinação de cetoconazol em xampu (Xb-Ceto) por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....	99

Tabela 15 – Valores experimentais obtidos na determinação de cetoconazol em xampu (Form1) por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....99

Tabela 16 – Valores experimentais obtidos na determinação de cetoconazol em xampu (Form2) por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....100

Tabela 17 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação para amostra Xb-ceto através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....103

Tabela 18 – Valores de áreas absolutas da solução de cetoconazol SQR (300 µg/ml), nos três dias de análise, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....104

Tabela 19 - Valores dos diâmetros dos halos de inibição, no doseamento de xampu de cetoconazol (Xb-ceto), obtidos através de ensaio microbiológico - método de difusão em ágar- cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.....110

Tabela 20 – Valores experimentais obtidos na determinação de xampu de cetoconazol (Xb-ceto) através de ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.....112

Tabela 21 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação através de ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.....113

Tabela 22– Teores obtidos na determinação do xampu de cetoconazol (Xb-ceto), através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placa.....114

Tabela 23 – Valores dos teores de cetoconazol em solução metanólica (Sol-ceto), após exposição às lâmpadas UV-A e UV-C, obtidos através de CLAE.....120

Tabela 24 – Valores dos teores de cetoconazol em xampu (Xb-ceto), após exposição às lâmpadas UV-A e UV-C, obtidos através de CLAE.....124

Tabela 25– Teores obtidos através de ensaio microbiológico e CLAE para amostras de Xb-ceto expostas à lâmpada UV-C por um período de 0, 6 e 22 horas.....126

- Tabela 26** – Valores dos teores de cetoconazol em solução metanólica (Sol-ceto), após exposição à luz natural, obtidos através de CLAE.....130
- Tabela 27** – Valores dos teores de cetoconazol em xampu (Xb-ceto), após exposição à luz natural, obtidos através de CLAE.....134
- Tabela 28** – Valores dos teores das formulações comerciais (Form1 e Form2), após exposição à luz natural, obtidos através de CLAE.....137
- Tabela 29** – Teores obtidos através de ensaio microbiológico e CLAE para amostras de Xb-ceto, expostas à luz natural, por um período de 17 meses.....137
- Tabela 30** – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN-¹H do cetoconazol SQR, obtido em espectrômetro BRUKER (200 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente.....151
- Tabela 31** – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuições dos carbonos para cetoconazol SQR a partir dos espectros de RMN-¹³C, obtido em espectrômetro VARIAN (300 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....153
- Tabela 32** – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN-¹H do Fr1, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....156
- Tabela 33** – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuições dos carbonos para Fr1 a partir dos espectros de RMN-¹³C, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....160
- Tabela 34** – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN-¹H do Fr2, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....164
- Tabela 35** – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuições dos carbonos para Fr2 a partir dos espectros de RMN-¹³C, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....167
- Tabela 36** – Valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize (item 4.9.1.1.), para amostra de Xb-ceto não degradada.....172
- Tabela 37** – Valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize (item 4.9.1.1.), para amostra de Xb-ceto degradada.....172
- Tabela 38** – Valores dos índices de zona obtidos após a leitura das placas de culturas celulares, utilizando método de difusão em ágar e linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1), para as amostras de Xb-ceto e Xb-ceto degradado.....174

Tabela 39 - Análise de variância (ANOVA) das áreas determinadas para a obtenção da curva padrão do cetoconazol por CLAE.....201

Tabela 40 – ANOVA dos dados obtidos no ensaio microbiológico – método de difusão em ágar- cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.....201

Tabela 41 – DPR dos teores encontrados no estudo de fotoestabilidade da solução metanólica (Sol-ceto) e do xampu (Xb-ceto) após exposição à luz natural.....202

Tabela 42 – DPR dos teores encontrados no estudo de fotoestabilidade das formulações comerciais (Form1 e Form2).....202

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do cetoconazol.....	22
Figura 2 - Espectro de absorção na região do IV para cetoconazol SQR.....	80
Figura 3 - Espectro de absorção na região do IV para Ceto1.....	80
Figura 4 - Espectro de absorção na região do IV para Ceto2.....	81
Figura 5 – Espectro de absorção na região do UV para cetoconazol SQR.....	82
Figura 6 – Espectro de absorção na região do UV para Ceto1.....	82
Figura 7 – Espectro de absorção na região do UV para Ceto2.....	83
Figura 8 - Estrutura química do lauril éter sulfato de sódio.....	85
Figura 9 - Estrutura química do metilparabeno.....	86
Figura 10 – Representação do cromatograma em camada delgada, utilizando n-hexano, acetato de etila, metanol, água e ácido acético (42:40:15:2:1 V/V/V/V/V) como eluente. Valor de Rf do cetoconazol de 0,33. <i>Solução padrão</i> (1), <i>Solução padrão diluída</i> (2), <i>Form1</i> (3), <i>Form2</i> (4), <i>Xb-ceto</i> (5) e <i>Sol-ceto</i> (6).....	91
Figura 11 – Estrutura do cetoconazol.....	94
Figura 12 – Cromatograma do cetoconazol SQR (300 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....	95
Figura 13 – Cromatograma da amostra Xb-ceto (320 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....	95
Figura 14 – Cromatograma da amostra Form1 (320 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....	96
Figura 15 – Cromatograma da amostra Form2 (320 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....	96
Figura 16 - Representação gráfica da média das três curvas padrão de cetoconazol e sua respectiva equação da reta, obtidas por CLAE com comprimento de onda de 225 nm,	

utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....98

Figura 17 - Cromatograma do placebo (Xb), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....101

Figura 18 - Curva de pureza apresentada para Form1, indicando a pureza total do pico do cetoconazol de 0,999993, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....101

Figura 19 - Curva de pureza apresentada para Form2, indicando a pureza total do pico do cetoconazol de 0,999997, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....102

Figura 20 - Cromatograma da solução de cetoconazol SQR (300 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e fase móvel com diferente proporção de metanol e água (6,5:3,5 v/v) pH 5,5.....104

Figura 21 - Cromatograma da solução de cetoconazol SQR (300 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 4,5 como fase móvel.....105

Figura 22 – Doseamento microbiológico (método de difusão em ágar- cilindros em placas), utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo teste, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C. Cetoconazol SQR com concentrações de 20 (P1); 100 (P2) e 500 (P3) µg/ml e xampu de cetoconazol (Xb-ceto) com concentrações de 20 (A1); 100 (A2) e 500 (A3) µg/ml.....110

Figura 23 - Representação gráfica da curva padrão de cetoconazol e sua respectiva equação da reta, obtida através de ensaio microbiológico - método de difusão em ágar-cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.....111

Figura 24 – Representação gráfica dos teores de cetoconazol matéria-prima obtidos por CLAE, após exposição à lâmpada UV-C (*Light express LE UV* (254 nm)) por um período de 8 horas.....118

Figura 25 - Cromatograma do cetoconazol matéria-prima (concentração teórica de 400 µg/ml), após exposição à lâmpada UV-C por 8 horas, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V) /acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....119

Figura 26 - Representação gráfica dos teores da solução metanólica de cetoconazol obtidos por CLAE, após exposição à lâmpada UV-C (*Light express LE UV* (254 nm)) e UV-A (*Blacklight blue lamp – Orion* (352 nm)) por um período de 24 horas.....120

Figura 27 - Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol (concentração teórica de 400 µg/ml), após exposição à lâmpada UV-A por 8 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....121

Figura 28 - Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol (concentração teórica de 400 µg/ml), após exposição à lâmpada UV-C por 4 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....122

Figura 29 - Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol (concentração teórica de 400 µg/ml), após exposição à lâmpada UV-C por 24 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....122

Figura 30 - Representação gráfica dos teores de xampu de cetoconazol obtidos por CLAE, após exposição à lâmpada UV-C (*Light express LE UV* (254 nm)) e lâmpada UV-A (*Blacklight blue lamp – Orion* (352 nm)) por um período de 24 horas.....123

Figura 31 -Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 µg/ml), após exposição à lâmpada UV-A por 24 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....125

Figura 32 -Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 µg/ml), após exposição à lâmpada UV-C por 24 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....125

Figura 33– Doseamento microbiológico (método de difusão em ágar- cilindros em placas), utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo teste, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C. Cetoconazol SQR com concentrações de 20 (P1); 100 (P2) e 500 (P3) µg/ml e xampu de cetoconazol (Xb-ceto), após exposição à lâmpada UV-C por 22 horas, com concentrações de 20 (D1); 100 (D2) e 500 (D3) µg/ml.....127

Figura 34 - Representação gráfica dos teores da solução metanólica de cetoconazol obtidos por CLAE. Amostras armazenadas em frasco transparente e em frasco opaco expostas à luz natural por um período de 26 meses.....130

- Figura 35** - Cromatograma da Sol-ceto (concentração teórica 400 µg/ml) armazenada em frasco transparente, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....131
- Figura 36** - Cromatograma da Sol-ceto (concentração teórica 400 µg/ml) armazenada em frasco opaco, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....132
- Figura 37** - Cromatograma com escala ampliada da Sol-ceto (concentração teórica 400 µg/ml) armazenada em frasco opaco, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....132
- Figura 38** - Representação gráfica dos teores do xampu de cetoconazol (Xb-ceto) obtidos por CLAE. Amostras armazenados em frasco transparente e em frasco opaco expostas à luz natural por um período de 26 meses.....134
- Figura 39** - Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 µg/ml) armazenado em frasco transparente, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....135
- Figura 40** - Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 µg/ml) armazenado em frasco opaco, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....135
- Figura 41** - Representação gráfica dos teores do xampu de cetoconazol (Form1 e Form2) obtidos por CLAE. Amostras armazenadas nos frascos de comercialização, expostas à luz natural por um período de 17 meses.....136
- Figura 42**- Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 µg/ml) em presença de HCl M, por 4 horas, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....139
- Figura 43** - Cromatograma do cetoconazol matéria-prima (concentração teórica 320 µg/ml) em presença de peróxido de hidrogênio 30 %, por 30 minutos, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....140

- Figura 44** - Cromatograma do cetoconazol matéria-prima (concentração teórica 320 µg/ml) em presença de peróxido de hidrogênio 30 %, por 4 horas, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....141
- Figura 45** - Cromatograma do peróxido de hidrogênio 30 %, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....141
- Figura 46** – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr1 para amostra de Solceto frente à luz UV-C por 30 horas, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.....143
- Figura 47** – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr1 para amostra de Xbceto frente à luz natural por 26 meses, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.....143
- Figura 48** – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr2 para amostra de Solceto frente à luz UV-C por 30 horas, obtidos com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.....144
- Figura 49** – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr2 para amostra de Xbceto frente à luz natural por 26 meses, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.....144
- Figura 50** – Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol, exposta à luz UV-C por 30 horas, obtido através de CLAE semipreparativa com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.....145
- Figura 51**- Cromatograma de Fr1 isolada (tempo 16,4 min.), obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....146
- Figura 52**- Cromatograma de Fr2 isolada (tempo 19,2 min.), obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....146
- Figura 53** - Curva de pureza apresentada para Fr1, indicando a pureza total do pico de 0,999968, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....147

- Figura 54** - Curva de pureza apresentada para Fr2, indicando a pureza total do pico de 0,999999, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.....147
- Figura 55** – Espectro de absorção na região do UV e Visível do pico relativo ao cetoconazol para amostra de Sol-ceto frente à luz UV-C, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.....148
- Figura 56** – Estrutura química do cetoconazol.....149
- Figura 57** – Espectro de RMN ^1H do cetoconazol SQR obtido em espectrômetro BRUKER (200MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente.....150
- Figura 58** - Espectro de RMN ^{13}C do cetoconazol SQR obtido em espectrômetro VARIAN (300MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....152
- Figura 59** – Cromatograma do cetoconazol, degradado sob ação da luz UV-C, obtido através de CLAE acoplada a espectroscopia de massas – ionização eletrospray.....154
- Figura 60** - Espectro de massas do pico relativo ao cetoconazol, obtido através de sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray acoplado ao sistema de CLAE, utilizando coluna Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e fase móvel conforme descrita no item 4.8.1.2.2.....155
- Figura 61** – Espectro de RMN ^1H da Fr1 obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....158
- Figura 62** – Espectro de RMN ^{13}C da Fr1 obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....159
- Figura 63** – Espectro de massas do pico relativo a Fr1, obtido através de sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray acoplado ao sistema de CLAE, utilizando coluna Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e fase móvel conforme descrita no item 4.8.1.2.2.....162
- Figura 64** – Estrutura proposta para produto de degradação isolado denominado Fr1: cis-1-acetil-4-{4-[2-(2-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil} piperazina.....163
- Figura 65** – Espectro de RMN ^1H da Fr2 obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....165
- Figura 66** – Espectro de RMN ^{13}C da Fr2 obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.....166

Figura 67 – Espectro de massas do pico relativo a Fr2, obtido através de sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray acoplado ao sistema de CLAE, utilizando coluna Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e fase móvel conforme descrita no item 4.8.1.2.2.....168

Figura 68 – Estrutura proposta para produto de degradação isolado denominado Fr2: cis-1-acetil-4-{4-[2-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil} piperazina.....169

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

ATCC – American Type Culture Collection

ATV – associação de tripsina e versene

BHT – butilidroxitolueno

CAS – chemical abstracts service

CCD – cromatografia em camada delgada

Ceto1 – cetoconazol matéria-prima

Ceto2 - cetoconazol matéria-prima

CIM – concentração inibitória mínima

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COLIPA – European Cosmetic, Toiletry and Perfumary Association

DMSO – dimetilsulfóxido

DPR – desvio padrão relativo

FDA – Food and Drug Administration

Form1 – xampu de cetoconazol 2 % comercial

Form2 – xampu de cetoconazol 2 % comercial

Fr1 – produto de degradação isolado com tempo de retenção de 16,4 minutos

Fr2 – produto de degradação isolado com tempo de retenção de 19,2 minutos

GL – graus de liberdade

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MEM - meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 *mM* de aminoácidos não essenciais, 1 *mM* de piruvato de sódio

MS – espectrometria de massas

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NCTC – National Collection for Type Culture

Rf – fator de retenção

RMN – ressonância magnética nuclear

SFB - soro fetal bovino

Sol-ceto – solução metanólica de cetoconazol 2 %

SQR – substância química de referência

UV – ultravioleta

VIH – vírus da imunodeficiência humana

Vis - visível

VMNA – volumetria em meio não-aquoso

Xb – xampu base

Xb-ceto – xampu de cetoconazol 2 % preparado no laboratório

RESUMO

Cetoconazol é um agente antifúngico que possui ação tópica e sistêmica, podendo ser incorporado em diferentes formas farmacêuticas. Como exemplo, pode-se citar o xampu de cetoconazol, que é efetivo no tratamento da dermatite seborréica e pitiríase versicolor. É reconhecido que o cetoconazol, nas formas farmacêuticas xampu e solução, rapidamente altera a coloração se tornando avermelhado. A exposição de fármacos à radiação pode influenciar a estabilidade da formulação, levando a modificações nas propriedades físico-químicas do produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a fotoestabilidade do cetoconazol em xampu e solução. As formulações foram expostas à radiação UV-A (352 nm), UV-C (254 nm) e luz diurna. Métodos foram desenvolvidos e validados para a determinação quantitativa do cetoconazol: cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico utilizando o método de cilindros em placa. Estudos comparativos entre xampu de cetoconazol e xampu de cetoconazol contendo produtos de degradação foram feitos para avaliar a atividade antifúngica e a segurança biológica *in vivo* (teste de Draize) e *in vitro* (teste de citotoxicidade). Os resultados demonstraram diminuição na atividade antifúngica, mas não demonstraram alteração na segurança biológica. Os métodos utilizados para análise do cetoconazol (ensaio microbiológico e CLAE) demonstraram ser lineares, precisos e exatos, sendo úteis no controle de qualidade do fármaco. Os resultados indicam alteração do cetoconazol em presença da luz. Dois produtos de degradação foram isolados e identificados: 1-acetil-4-{4-[2-(2-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina e 1-acetil-4-{4-[2-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina. Conseqüentemente, adequada proteção da luz deve ser adotada durante armazenamento das duas formas farmacêuticas contendo o fármaco.

Palavras-chave: cetoconazol, xampu, cromatografia líquida de alta eficiência, ensaio microbiológico, estudos de fotoestabilidade, segurança biológica.

ABSTRACT

Photostability evaluation of ketoconazole and determination of the antifungal activity and biological reactivity *in vivo* and *in vitro* of ketoconazole shampoo

Ketoconazole is an antifungal agent with topic and systemic action and can be incorporated into several dosage forms. As an example, it could be mentioned ketoconazole shampoo, which is effective against seborrhoeic dermatitis and pityriasis versicolor. It is remarkable that ketoconazole is rapidly altered in shampoo and solution dosage forms, since its colour turns into red. Exposure of a drug to radiation can influence the stability of the formulation, leading to changes in the physicochemical properties of the product. The aim of this work was to assess the photostability of ketoconazole in shampoo and solution. The formulations were exposed to UV-A (352 nm) and UV-C (254 nm) radiations and daylight. Methods were developed and validated for the quantitative determination of ketoconazole: high performance liquid chromatography and microbiological assay using the cylinder-plate method. Comparative studies between ketoconazole shampoo and ketoconazole shampoo containing degradation products were conducted to evaluate the antifungal activity and biological reactivity *in vivo* (Draize test) and *in vitro* (cytotoxicity test). The results showed a decrease in antifungal activity but not an alteration on the biological reactivity. The methods used for ketoconazole analysis (microbiological assay and HPLC) were linear, precise and accurate, providing valuable methods for the quality control of this drug. The results indicate alteration in ketoconazole in presence of light. Two photodegradation products were isolated and identified: 1-acetyl-4-{4-[2-(2-chlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-ylmethoxy]phenyl}piperazine and 1-acetyl-4-{4-[2-(4-chlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-ylmethoxy]phenyl}

piperazine. Consequently, adequate light protection should be adopted for storage of these two dosage forms containing the drug.

Key words: ketoconazole, shampoo, high performance liquid chromatography, microbiological assay, photostability studies, biological reactivity.

INTRODUÇÃO

A introdução dos derivados imidazólicos na terapêutica, na década de 70, representou grande avanço no tratamento das micoses. Foram os primeiros compostos a exercerem atividade contra grande número de leveduras, dermatófitos e fungos dimórficos. Desde seu advento, vários compostos foram desenvolvidos por diversos laboratórios, sendo utilizados no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas.

Em 1981, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o uso do cetoconazol, um derivado imidazólico, desenvolvido e sintetizado pela Janssen Pharmaceutica (ESPINEL-INGROF,1996). O fármaco, que possui ação sistêmica e tópica, pode ser incorporado em diversas formas farmacêuticas, como xampus e cremes.

Durante a preparação de algumas formulações tópicas, contendo cetoconazol, pôde-se observar que o produto apresenta instabilidade, pois adquire coloração avermelhada muito rapidamente (STAUB *et al.*, 2002), sugerindo a formação de produtos de degradação.

Diversos fatores podem alterar um produto farmacêutico com o tempo. Após extensa revisão de literatura, constatou-se que o número de fármacos fotolábeis tem aumentado. Segundo THOMA e KÜBLER (1996c), a investigação comparativa da fotoestabilidade de antimicóticos azólicos mostrou que, apesar de muitas estruturas serem homólogas, existem muitas variâncias entre a estabilidade fotoquímica. Em particular, cetoconazol e terconazol mostraram-se fotolábeis. Por outro lado, clotrimazol, fluconazol e miconazol resistiram à degradação fotolítica.

Segundo TONESSEN (2001), fármacos sensíveis à luz podem ser afetados pela luz solar (especialmente radiação ultravioleta) e por fonte de luz artificial (lâmpada fluorescente). A exposição inadequada à luz pode levar à fotodegradação da substância ativa, podendo formar um produto inativo, mas também pode alterar propriedades físico-químicas como alteração na coloração do produto.

Fármacos sensíveis à luz freqüentemente aumentam os problemas de uma formulação farmacêutica. Reações fotoquímicas são complexas e um bom entendimento do processo de fotodecomposição é necessário a fim de otimizar a estabilidade do produto.

Sendo assim, justifica-se o desenvolvimento, validação e utilização de métodos físico-químicos e microbiológicos para caracterização, identificação e doseamento do fármaco, visando à obtenção de dados para o estudo da estabilidade fotoquímica do cetoconazol em formulações farmacêuticas, em especial o xampu, com avaliação dos possíveis produtos de degradação formados. Apesar do fármaco ter sido sintetizado na década de 70, não foram encontrados estudos publicados sobre seus produtos de degradação.

OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e validação de métodos de análise e avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol matéria-prima e em formulação farmacêutica, verificando a presença de produtos de degradação.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolvimento e validação de método de doseamento do cetoconazol em xampu, através de cromatografia líquida de alta eficiência.
- ✓ Desenvolvimento e validação de método de doseamento do cetoconazol em xampu, através de ensaio microbiológico - método de difusão em ágar – cilindros em placa.
- ✓ Estudo da estabilidade fotoquímica do cetoconazol matéria-prima, em solução e na forma de xampu.
- ✓ Determinação da atividade antifúngica do xampu de cetoconazol contendo os produtos de degradação.
- ✓ Isolamento e identificação dos produtos de degradação majoritários, através de espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio e de carbono e espectrometria de massas.
- ✓ Avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* do xampu de cetoconazol contendo os produtos de degradação.
- ✓ Avaliação da toxicidade aguda com efeito local do xampu de cetoconazol contendo os produtos de degradação, através do teste de irritação ocular.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Infecções fúngicas

As micoses humanas podem ser causadas por fungos patogênicos primários ou por fungos oportunistas. Patogênicos primários são aqueles que têm capacidade de invadir os tecidos de um hospedeiro normal; os oportunistas, no entanto, somente são invasores de tecidos de indivíduos com alterações do sistema imunológico do organismo (VERONESI e FOCACCIA, 1998). Nos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado em função do vírus da imunodeficiência humana (VIH), câncer e transplantes. É importante salientar, que tanto os fungos patogênicos como os oportunistas são conhecidos como causadores de micoses severas e algumas vezes fatais em pacientes imunocomprometidos (ESPINEL-INGROF, 1996).

As doenças por fungos podem ser classificadas em três grupos (FREEDBERG *et al.*, 2003):

✓ *Micoses sistêmicas*

As micoses sistêmicas são caracterizadas por serem adquiridas, geralmente por inalação de fungos patógenos dimórficos, dando origem, na maioria das vezes, a uma lesão pulmonar primária que tem tendência à regressão espontânea. As lesões extrapulmonares resultam da disseminação hematogênica do fungo. As micoses sistêmicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Micoses sistêmicas e fungos causadores.

Micoses	Fungos
Histoplasmose	<i>Histoplasma capsulatum (capsulatum, duboisii)</i>
Blastomicose	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
Coccidioidomicose	<i>Coccidioides immitis</i>
Paracoccidioidomicose	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Peniciliose	<i>Penicillium marneffeii</i>
Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i>

✓ *Micoses subcutâneas*

As micoses subcutâneas são infecções causadas por fungos que penetraram na pele ou tecido subcutâneo. As micoses subcutâneas mais comuns são esporotricose, micetomas e cromoblastomicose.

✓ *Micoses superficiais*

As micoses superficiais são causadas por fungos ou leveduras capazes de invadir a pele, unha, cabelo e membrana mucosa. Pode-se citar as dermatofitoses (ou tinhas) que são infecções causadas por três gêneros de fungos (*Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*), candidíase que é uma infecção causada por *Candida albicans* ou por outra levedura da mesma espécie (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*). Pode-se citar, ainda, tinha nigra, piedra, malassezioses e eventualmente outros fungos não dermatófitos.

Por malassezioses designam-se as três formas clínicas da infecção causada pela levedura *Malassezia*: pitiríase (tinha) versicolor, foliculite por *Malassezia* e alguns autores correlacionam o fungo *Malassezia furfur* no desenvolvimento da dermatite seborréica. Uma forma farmacêutica muito utilizada para o tratamento destas infecções é o xampu pois geralmente o couro cabeludo é acometido.

3.2. Pele e anexos cutâneos

As infecções causadas por fungos estão entre as causas mais comuns de doenças cutâneas. A pele, possui muitas funções essenciais, incluindo proteção, termorregulação, resposta imune, síntese bioquímica, detecção sensorial, entre outras (HARDMAN e LIMBIRD, 1996).

A pele compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas de tecidos: uma camada superior – a epiderme, uma camada intermediária – a derme, e uma camada

profunda - a hipoderme ou tecido celular subcutâneo. A epiderme é constituída por epitélio estratificado cuja espessura apresenta variações topográficas desde 0,04 mm nas pálpebras até 1,6 mm nas regiões palmo-plantares. A segunda camada tissular componente da pele, disposta imediatamente abaixo da epiderme, é a derme, que compreende denso estroma fibro-elástico. A terceira camada da pele, mais profunda, a hipoderme, compõe-se de tecido adiposo (SAMPAIO e RIVITTI, 1998).

Os capilares sangüíneos e as fibras nervosas emergem do tecido adiposo subcutâneo ou hipoderme, atravessam a derme e chegam à epiderme. As glândulas sebáceas presentes no tecido subcutâneo liberam seus produtos através de ductos sudoríparos que atravessam a superfície da pele. As glândulas sebáceas e os folículos pilosos originam-se na derme e nas camadas subcutâneas e atingem a superfície da epiderme na forma de ductos e pêlos, respectivamente (ANSEL *et al.*, 2000).

O cabelo é formado por duas partes distintas: a haste e a raiz. A haste constitui a parte visível do cabelo e é formada por células queratinizadas. Em corte longitudinal distinguem-se três porções diferenciadas designadas por medula, córtex e cutícula. A raiz atravessa toda a zona da epiderme e insere-se profundamente na derme ou hipoderme através do folículo piloso. Junto ao folículo piloso se situa o orifício de excreção da glândula sebácea. O produto de excreção dessa glândula é o sebo que desempenha papel importante na lubrificação do cabelo e impede a sua desidratação. Entretanto, quando a produção de sebo é excessiva o cabelo torna-se oleoso, podendo ser prejudicial (PRISTA *et al.*, 1995). Entre as doenças relacionadas ao aumento da oleosidade pode-se citar a dermatite seborréica, pitiríase versicolor e a caspa, sendo que o cetoconazol é bastante empregado no tratamento destas infecções.

3.3. Pitiríase versicolor e dermatite seborréica

Pitiríase versicolor e dermatite seborréica são doenças da pele muito comuns. Pitiríase versicolor é uma doença fúngica superficial crônica, usualmente localizada na parte superior do tronco e braços, e no pescoço (FAERGEMANN, 2000).

A lesão é caracterizada por uma descamação, entretanto uma lesão extensa pode ser evidenciada como uma mancha hipopigmentada ou hiperpigmentada. É reconhecido que o microrganismo causador da pitiríase versicolor é a *Malassezia* spp, que é um comensal da pele humana normal (GUPTA *et al.*, 2002).

A *Malassezia* apresenta sete espécies da levedura lipofílica: *Malassezia furfur* (*Pityrosporum orbiculare*, *Pityrosporum ovale* e *Malassezia ovalis*), *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* e *M. obtusa*. *M. furfur* há muito tempo tem sido identificada como causador da pitiríase versicolor, entretanto estudos recentes indicam que *M. globosa* pode estar envolvida na patogenia da doença (ERCHIGA *et al.*, 2000).

Fatores endógenos e exógenos estão relacionados ao aparecimento da doença. Entre os fatores exógenos pode-se citar alta temperatura e umidade, por isso é mais comum nos países tropicais. Entre os fatores endógenos pode-se citar hiperidrose, imunodeficiência, fatores hereditários e pele muito oleosa; por isso a doença é mais comum em adolescentes e adultos jovens (FAERGEMANN, 2000).

A dermatite seborréica é uma desordem dermatológica comum. A etiologia da doença é pouco conhecida. Alguns autores focalizam o papel da *Malassezia furfur* no desenvolvimento da dermatite seborréica (GUPTA *et al.*, 2004). Entretanto, muitos fatores têm sido citados como possíveis contribuintes para o desenvolvimento da doença: fatores hormonais (nível de sebo), nutricionais e imunológicos (GUPTA e BLUHM, 2004).

O nome “dermatite seborréica” significa uma inflamação oleosa da pele. No entanto, a doença é muito mais complexa do que o nome sugere, pois estudos

demonstraram que a pele de pacientes com dermatite não é necessariamente mais oleosa do que indivíduos não afetados pela doença. Dermatite seborréica é caracterizada por uma aparência avermelhada, com descamação de áreas da pele mais oleosas, mais comumente no couro cabeludo, orelhas, sobrelhas e tórax. A relação entre dermatite seborréica do couro cabeludo e caspa não é clara, sendo que alguns autores sugerem que a caspa é um termo mais genérico que se refere a uma descamação do couro cabeludo sem considerar a etiologia da doença (GUPTA e BLUHM, 2004). Uma vez que o couro cabeludo geralmente é acometido, o xampu é a forma farmacêutica de escolha para o tratamento destas infecções.

3.4. Xampus

O xampu, como produto de limpeza e higiene do cabelo, surgiu nos anos 20 nas mais diversas formas de apresentação. Decorridos vários anos do seu surgimento, as formas primitivas praticamente desapareceram e deram lugar a produtos mais sofisticados surgindo no mercado xampus com atividades específicas como para o tratamento da caspa e xampus adequados a cabelos secos, oleosos e os aconselhados para bebês, devido às características suavizantes que apresentam (PRISTA *et al.*, 1995).

Os xampus líquidos são preparações fluidas ou levemente viscosas, de fácil aplicação, podendo ser transparentes ou opacos. A diversidade de matérias-primas utilizadas para a produção de xampus contribui para a obtenção de diferentes tipos de produtos. Em geral, nos xampus líquidos, além dos tensoativos que são os agentes de limpeza, são empregadas diferentes matérias-primas para complementar a formulação.

A detergência é uma propriedade dos tensoativos que lhes permite remover a gordura e as sujidades depositadas no cabelo. Os tensoativos apresentam grupos lipofílicos, que apresentam afinidade pelas partículas a serem removidas, e

hidrofílicos que tornam a molécula solúvel em água ajudando a dispersar e remover as sujidades. O balanço entre porção lipofílica e hidrofílica da molécula determina a aplicação do tensoativo (WOLF *et al.*, 2001). Os tensoativos são divididos em quatro categorias principais de acordo com a porção polar que apresentam:

✓ *Tensoativos aniônicos*

A porção polar dos tensoativos aniônicos é carregada negativamente. Em geral, possuem ótimas propriedades detergentes e espumantes e são altamente solúveis em água. Os tensoativos mais utilizados são os sulfatos de alquila e éter sulfatos de alquila e são utilizados como sais de sódio, amônio, monoetanolamina e trietanolamina (BOUILLON, 1996). Além destes, uma grande variedade de tensoativos aniônicos são utilizados como os sulfossuccinatos de alquila, éter carboxilatos de alquila, sarcossinatos de alquila, entre outros, sendo que estes apresentam maior suavidade, sendo recomendados para cabelos sensíveis; entretanto, apresentam propriedades detergentes e espumantes menos eficazes (BOUILLON, 1996, WILKINSON e MOORE, 1982).

✓ *Tensoativos catiônicos*

A porção polar dos tensoativos catiônicos é carregada positivamente. Esses tensoativos apresentam alta afinidade pelas fibras do cabelo transmitindo suavidade ao mesmo; além disso possuem bom poder bactericida (BOUILLON, 1996). Estas substâncias, em geral, apresentam baixas propriedades de limpeza e são incompatíveis com tensoativos aniônicos. Pode-se citar como exemplos de tensoativos catiônicos: os sais de alquiltrimetilamônio, sais de alquildimetilamônio, sais de alquildimetilbenzilamônio, sais de alquilpiridínio, entre outros (WILKINSON e MOORE, 1982).

✓ *Tensoativos anfóteros*

Possuem em sua estrutura grupamento catiônico e aniônico. Em pH ácido comportam-se como tensoativos catiônicos e em pH alcalino como tensoativos

aniônicos. Esses tensoativos, por possuírem baixas propriedades de limpeza e de formação de espuma, em geral, são associados a outros tensoativos para a preparação de xampus suaves, devido ao seu baixo grau de irritação. Os mais utilizados em xampus são as betaínas, sulfobetaínas, derivados imidazolínicos, alquilaminopropionatos, entre outros (BOUILLON, 1996).

✓ *Tensoativos não-iônicos*

Esses tensoativos não possuem porção polar nem carga elétrica na sua estrutura. Geralmente são considerados os tensoativos mais suaves apresentando boa dispersão, emulsificação e propriedade detergente; entretanto seu uso é limitado, pois possuem baixa capacidade de formação de espuma. Devido ao baixo poder de irritação à pele são utilizados em associação com os éter sulfatos de alquila no desenvolvimento de xampus muito suaves. Como tensoativo não-iônico pode-se citar as alcanolamidas e dialcanolamidas de ácidos graxos (monoetanolamida e dietanolamida do ácido láurico, monoetanolamida do ácido esteárico, dietanolamida do ácido oléico, monoetanolamida e dietanolamida dos ácidos graxos de coco), derivados do polietilenoglicol, entre outros (PRISTA *et al.*, 1995, WOLF *et al.*, 2001).

Além dos tensoativos, outras substâncias são incorporadas aos xampus. Estes compostos auxiliam a assegurar a estabilidade do produto acabado e garantem a sua maior aceitabilidade por parte do consumidor, pois melhoram o aspecto estético das formulações. Na Tabela 2 encontra-se a relação dos principais componentes de uma formulação de xampu.

É importante salientar que em formulações de xampu a água é utilizada em alta quantidade, pois é responsável pela diluição do tensoativo, portanto a mesma deve possuir qualidades microbiológica e química adequadas.

Tabela 2 – Relação das principais categorias de matérias-primas e respectiva ação predominante em formulações de xampu.

Categoria	Exemplos	Ação predominante
<i>Estabilizadores de espuma</i>	alcanolamidas de ácido graxo (monoetanolamida e dietanolamida do ácido láurico), polímeros (metilcelulose)	umentar o volume e a qualidade da espuma e estabilizar a mesma
<i>Espessantes</i>	derivados da celulose (metilcelulose), eletrólitos (cloreto de sódio), polímeros carboxivinílicos (carbopol), gomas naturais, alcanolamidas de ácido graxo	alterar a viscosidade
<i>Conservantes</i>	imidazolidiniluréia, metil e propilparabeno, formaldeído, dimetilidantoína	proteger da contaminação microbiológica
<i>Condicionadores</i>	silicone, proteínas hidrolisadas (queratina, colágeno), derivados da lanolina, álcoois graxos (láurico, mirístico e oléico)	doador de maciez e suavidade ao cabelo e redutor da eletricidade estática
<i>Opacificantes e clarificantes</i>	álcoois graxos (cetílico e estearílico), alcanolamidas de ácidos graxos (esteárico), ésteres (monoestearato de glicerila), óxido de zinco ou dióxido de titânio	melhorar a apresentação do produto final
<i>Quelantes</i>	EDTA e seus sais, ácido tartárico	capturar íons presentes na água
<i>Acidulantes</i>	ácido cítrico, ácido clorídrico, ácido láctico	diminuir pH

Fonte: BOUILLON, 1996, WILKINSON e MOORE, 1982.

Produtos aromatizantes e corantes também podem ser adicionados em formulações de xampu. Os aromatizantes auxiliam a mascarar odores dos tensoativos, transmitindo ao produto acabado um aroma agradável. Os corantes são utilizados para melhorar o aspecto de apresentação do produto. Algumas vezes, estes produtos são adicionados para mascarar alguma alteração que o produto sofre com o passar do tempo como precipitação e alteração de cor (FERREIRA, 2002).

Além das matérias-primas já citadas, muitos agentes podem ser adicionados a formulações de xampu por possuírem ação específica, destinados a casos

particulares do cabelo e couro cabeludo. Existem xampus para combater a caspa, dermatite seborréica, pitiríase versicolor, infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus aureus*, psoríase, entre outros. Segundo SHAPIRO e MADDIN (1996), os fármacos antifúngicos, dentre eles o cetoconazol, são amplamente empregados em formulações de xampu, pois esses fármacos possuem mecanismo de ação específico, sendo capazes de controlar alterações no couro cabeludo.

3.5. Antifúngicos

3.5.1. Histórico

Até 1945, terapias não específicas como queratolíticos (ácido salicílico) e anti-sépticos (violeta de genciana) eram a base do tratamento tópico de infecções causadas por fungos. Em 1945, surgiu o ácido undecilênico, um composto insaturado com 11 carbonos, com ação fungistática. Entretanto, esse agente apresentava odor rançoso desagradável e necessidade do uso prolongado (FREEDBERG *et al.*, 2003).

Em 1950, a descoberta dos antibióticos poliênicos (anfotericina B e nistatina) representou um avanço na micologia médica. Apesar da anfotericina B ter rapidamente se tornado o principal suporte na terapia de infecções sistêmicas sérias, o seu uso foi associado a diversos efeitos colaterais como nefrotoxicidade, por exemplo. Um terceiro agente antifúngico, a griseofulvina, foi descoberto em 1958 e desenvolvido a partir do *Penicillium griseofulvum* (ESPINEL-INGROF, 1996).

A flucitosina, análogo pirimidínico, foi sintetizada em 1957 e apresentou limitada atividade contra determinados fungos. O tolnaftato (1964), pertencente à classe dos tiocarbamatos, utilizado topicamente, teve seu uso essencialmente restrito a infecções causadas por dermatófitos (VANDEN-BOSSCHE *et al.*, 2003).

A descoberta da atividade antifúngica da naftidina, protótipo das alilaminas, foi o ponto inicial para os estudos de relação estrutura-atividade resultando no

desenvolvimento da terbinafina, uma alilamina com considerável melhora das propriedades antimicóticas (VANDEN-BOSSCHE *et al.*, 2003).

A procura por novos antifúngicos menos tóxicos conduziu à descoberta dos derivados imidazólicos. Em 1960, três novos compostos de uso tópico foram introduzidos: clotrimazol, desenvolvido pela Bayer (Alemanha), miconazol e econazol, ambos desenvolvidos pela Janssen Pharmaceutica (Bélgica) (MAERTENS, 2004).

Em 1981, o FDA aprovou o cetoconazol, desenvolvido pela Janssen Pharmaceutica, o primeiro composto imidazólico disponível para tratamento oral de infecções fúngicas sistêmicas. Por quase uma década, o cetoconazol foi considerado o fármaco de escolha e único disponível para tratamento oral de infecções sistêmicas (ESPINEL-INGROF, 1996).

A introdução da primeira geração de triazóis (fluconazol e itraconazol) representou o segundo maior avanço no tratamento de infecções fúngicas. Apesar do uso difundido, esses agentes têm importantes limitações clínicas relatadas como o surgimento de resistência e toxicidade. A fim de superar essas limitações, diferentes análogos têm sido desenvolvidos. Pode-se citar a segunda geração de triazóis (voriconazol, pozaconazol e ravuconazol) que possuem grande potência, maior atividade contra resistência e atividade contra *Aspergillus* spp. (LAVERDIERE *et al.*, 2002; MAERTENS, 2004).

Atualmente existem muitos agentes tópicos empregados no tratamento de micoses superficiais. A terapia tópica apresenta grandes vantagens sobre a sistêmica, dentre elas pode-se destacar a falta de efeitos adversos severos e de interações medicamentosas, facilidade do uso e o não monitoramento do paciente com exames laboratoriais. Na Tabela 3 estão apresentados alguns agentes tópicos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas superficiais e o seu mecanismo de ação.

Tabela 3 – Alguns agentes tópicos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas superficiais.

Classe / antifúngico	Mecanismo de ação	Referências	
<i>Derivados imidazólicos</i>	cetoconazol clotrimazol econazol miconazol climbazol bifonazol	inibição da esterol 14- α -desmetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana.	HARDMAN e LIMBIRD, 1996
<i>Alilaminas</i>	terbinafina	inibição da esqualeno-2,3-epoxidase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana.	VANDEN-BOSSCHE <i>et al.</i> , 2003
<i>Hidroxipiridona</i>	ciclopirox olamina rilopirox	inibição do transporte de substratos essenciais para a célula, interferindo na síntese de proteínas.	FREEDBERG <i>et al.</i> , 2003
<i>Antibióticos poliênicos</i>	nistatina	interação com os esteróis da membrana, resultando em um aumento na permeabilidade da membrana.	VANDEN-BOSSCHE <i>et al.</i> , 2003
<i>Tiocarbamatos</i>	tolnaftato	inibição da esqualeno-2,3-epoxidase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana.	FREEDBERG <i>et al.</i> , 2003
<i>Corticosteróides</i>	desonida	redução da inflamação	PIERARD-FRANCHIMON e PIERARD, 2002
<i>Diversos</i>	ácido salicílico	ação queratolítica	HARDMAN e LIMBIRD, 1996
	sulfeto de selênio	antiproliferativo	JACKSON, 1996
	piritona zíncica	antiproliferativo	JACKSON, 1996
	alcatrão mineral	ação queratolítica, antiproliferativo e anti-séptico	JACKSON, 1996

3.5.2. Cetoconazol

O cetoconazol (Figura 1) é um antifúngico, pertencente à classe dos imidazóis, que possui ação sistêmica e tópica, podendo ser incorporado em diversas formas farmacêuticas.

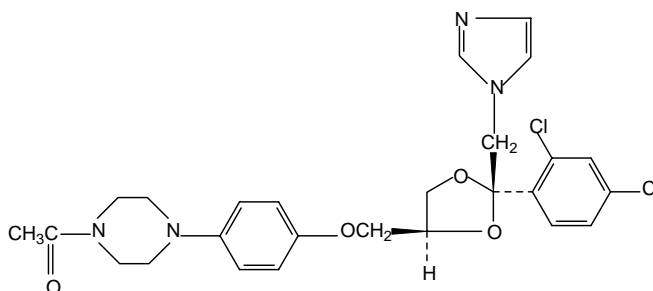


Figura 1- Estrutura química do cetoconazol

O cetoconazol tem atividade contra infecções clínicas causadas por *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* sp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Phialophora* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp., *Microsporum* sp., *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia furfur*) e *Cryptococcus neoformans* (KOROLKOVAS *et al.*, 2003/2004).

O principal efeito dos imidazóis sobre os fungos é a inibição da esteroide 14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450. Portanto, o cetoconazol prejudica a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e conduz ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios e prejudicar as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema do transporte de elétrons, inibindo, conseqüentemente, o crescimento dos fungos (HARDMAN e LIMBIRD, 1996).

Alguns dos efeitos colaterais do cetoconazol são náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, hepatotoxicidade, cefaléia, tontura, exantema, prurido, icterícia, ginecomastia, diminuição da libido, irregularidades menstruais, oligospermia, irritação e ardor no local da aplicação, com a forma tópica (KOROLKOVAS *et al.*, 2003/2004).

3.5.2.1. Uso oral

HEERES e colaboradores (1979) descreveram a síntese e as propriedades antifúngicas do cetoconazol, que em baixas doses orais apresentou alta atividade contra candidíase vaginal em ratas e contra candidíase cutânea em porcos-da-índia.

Após a descoberta do novo antifúngico, a eficácia do mesmo foi avaliada em mulheres, no tratamento da candidíase vaginal. A cura foi obtida em 87,3 % das pacientes e poucos efeitos colaterais foram relatados (BISSCHOP *et al.*, 1979). BORELLI e colaboradores (1979) demonstraram a eficácia do fármaco contra 10 fungos em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas e superficiais.

O cetoconazol também foi avaliado no tratamento da dermatofitose, demonstrando atividade superior à griseofulvina (LEGENDRE e STELTZ, 1980), e no tratamento de histoplasmose e criptococose que em combinação com a anfotericina B apresentou vantagem terapêutica quando comparado à monoterapia (GRAYBILL *et al.*, 1980).

Em 1981 o FDA aprovou o cetoconazol, para tratamento oral de infecções fúngicas sistêmicas (ESPINEL-INGROF, 1996). Depois disso, vários trabalhos foram publicados avaliando a atividade e segurança do fármaco.

VAN CUTSEN (1983) investigou a atividade *in vitro* e *in vivo* do cetoconazol contra 715 fungos pertencentes a 85 espécies. O fármaco demonstrou ser altamente ativo *in vitro* e possuir amplo espectro de atividade. Segundo COX e

colaboradores (1982) o fármaco apresentou grande potencial terapêutico na dermatomicose.

Alguns artigos relataram que o cetoconazol tem atividade sobre outras doenças que não são causadas por fungos. Baixa dose de cetoconazol mostrou ser efetiva no tratamento do hirsutismo, apresentando pequeno número de efeitos colaterais, mas ainda ficando reservado como alternativa de escolha devido à hepatotoxicidade (GOKMEN *et al.*, 1996). O fármaco também mostrou ser efetivo no tratamento de câncer de próstata, pois em altas doses pode diminuir rapidamente o nível de testosterona (TRACHTENBERG *et al.*, 1983).

Estudos que compararam a carga viral do VIH em pacientes tratados com saquinavir isolado ou associado com cetoconazol mostraram que pacientes que receberam o regime combinado apresentaram maior queda na carga viral. Os resultados indicaram que a combinação cetoconazol mais saquinavir requer maiores estudos (JORDAN, 1998).

A adição de baixas doses de cetoconazol à ciclosporina no tratamento de pacientes renais e cardíacos transplantados produziu efeitos favoráveis na função do órgão transplantado, diminuindo o número de infecções cutâneas fúngicas, as taxas de rejeição e as necessidades de ciclosporina. O fármaco interage com ciclosporina através do citocromo P450, conduzindo à inibição do metabolismo de ciclosporina aumentando o seu nível no sangue (KEOGH *et al.*, 1995; SOBH *et al.*, 1995; GERNTHOLTZ *et al.*, 2004).

É importante salientar que, em 1983, HENNING e colaboradores descreveram um caso importante de efeito colateral do cetoconazol, quando o fármaco induziu hepatite em um paciente. Atualmente, recomenda-se que o médico solicite exames clínicos da função hepática durante o tratamento (2 semanas após o início do tratamento e após com intervalos mensais).

3.5.2.2. Uso tópico

Um aumento na produção de sebo pode estar relacionado ao aparecimento de infecções no couro cabeludo. O xampu de cetoconazol é bastante utilizado no tratamento da dermatite seborréica, caspa e pitiríase versicolor sendo que diversos autores avaliaram a eficácia do fármaco.

Para CARR e colaboradores (1987), o cetoconazol tópico mostrou ser uma terapia efetiva e adequada para dermatite seborréica no couro cabeludo, para longo tempo de tratamento, observando uma melhora significativa na descamação e prurido. Segundo FAERGEMANN (1990), trinta e seis pacientes com dermatite seborréica no couro cabeludo e com cultura positiva para *Pityrosporum ovale* foram tratados com xampu de cetoconazol duas vezes por semana durante um mês; 89 % dos pacientes tornaram-se livres das lesões ou melhoraram. Os pacientes acharam o xampu efetivo, fácil de usar e cosmeticamente atrativo.

Pacientes com dermatite seborréica no couro cabeludo foram tratados duas vezes por semana com xampu de cetoconazol a 2 % durante um mês. Avaliações clínicas foram feitas antes e após o tratamento sendo observado uma melhora na severidade da doença (DOBREV e ZISSOVA, 1997).

O xampu de cetoconazol a 2 %, além de ser efetivo no tratamento da dermatite seborréica, demonstrou ser efetivo no tratamento da caspa. GO e colaboradores (1992) realizaram um estudo duplo-cego com 176 pacientes com caspa. O xampu foi aplicado duas vezes por semana obtendo bons resultados em 80 % dos pacientes após quatro semanas. Segundo PETER e RICHARZ (1995), o xampu foi efetivo no tratamento da caspa, bem como na prevenção de recidivas quando, após a remissão, foi usado profilaticamente uma vez por semana.

PIERARD-FRANCHIMONT e colaboradores (2001) compararam xampu de cetoconazol a 1 % e 2 % no tratamento da caspa. O xampu de cetoconazol a 2 %

mostrou superior eficácia, além do que mostrou apresentar menores chances de recaídas.

Alguns trabalhos também relataram a eficácia do cetoconazol no tratamento da pitiríase versicolor. Com o objetivo de avaliar a eficácia do xampu de cetoconazol a 2 %, usado como aplicação única ou diariamente por 3 dias, no tratamento da pitiríase versicolor, foi realizado um estudo em pacientes com a infecção micologicamente confirmada. Observou-se que o xampu foi mais eficaz que o placebo. As respostas clínicas foram 73 %, 69 % e 5 % para aplicação durante 3 dias, 1 dia e placebo, respectivamente. Sendo assim, cetoconazol a 2 % usado como aplicação única ou diariamente por três dias, mostrou-se seguro e efetivo no tratamento da pitiríase versicolor (LANGE *et al.*, 1998).

O xampu de cetoconazol a 2 % foi avaliado como monoterapia no tratamento da *tinha capitis*. Dezesesseis crianças com a infecção causada pelo *Trichophyton tonsurans* foram tratadas diariamente por 8 semanas. O xampu reduziu o número de arthroconídeas reduzindo desta forma a transmissão e o contágio da doença. A cura foi obtida em 33 % das crianças (GREER, 2000).

Após revisão de literatura, foram encontrados diversos trabalhos relatando as comparações das atividades *in vitro* e *in vivo* do cetoconazol com outros antifúngicos amplamente empregados na terapêutica.

Segundo NENOFF e HAUSTEIN (1994) o cetoconazol e o itraconazol apresentaram melhor atividade contra o *Pityrosporum* utilizando técnica de diluição em ágar. A atividade de clotrimazol, cetoconazol, miconazol e sertaconazol foi testada contra *Malassezia furfur* por técnica de diluição em ágar. A eficácia das formulações tópicas foi avaliada na pele de porcos-da-índia infectados com *M. furfur*. O mais potente inibidor *in vitro* foi o cetoconazol, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) de 0,51 µg/ml. Os experimentos envolvendo animais foram realizados por três dias consecutivos de tratamento tópico e demonstraram que o cetoconazol a 2 %, em creme ou xampu, reduziu a lesão severa

causada por *M. furfur* (VANGERVEN e ODDS, 1995). Para SQUIQUERA e colaboradores (1996) o cetoconazol também provou ser o fármaco mais efetivo na inibição do crescimento de *Pityrosporum ovale*.

A atividade *in vitro* do cetoconazol, miconazol, econazol, fenticonazol, itraconazol e fluconazol foi avaliada contra a *Malassezia furfur* isolada de lesões de pitiríase versicolor. Os resultados mostraram que todos os fármacos apresentam boa atividade, e cetoconazol e itraconazol parecem ser os mais ativos (STRIPPOLI *et al.*, 1997). Avaliou-se a atividade *in vitro* de fluconazol, itraconazol e cetoconazol contra 30 isolados clínicos de *S. cerevisiae* por método de microdiluição em caldo, seguindo recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Foram detectados elevadas CIM para os três azóis testados (BARCHIESI *et al.*, 1998).

Foi detectada a concentração inibitória mínima de alguns antifúngicos para várias espécies de *Candida*. Para o cetoconazol foram encontradas concentrações variando de 0,03 a 0,5 µg/ml (DUROVICOVA *et al.*, 2001).

SQUIRE e GOODE (2002) compararam a eficácia terapêutica de xampu contendo ciclopirox olamina 1,5 % e ácido salicílico 3 % e xampu Nizoral® (cetoconazol 2 %). Os xampus foram usados nos pacientes três vezes por semana durante quatro semanas. O estudo demonstrou que ambas as formulações foram eficazes e seguras no tratamento da caspa e dermatite seborréica.

3.5.2.3. Métodos para determinação do cetoconazol

O cetoconazol apresenta monografias na USP 28 (2005) e Ph. Eur. (2002) no que se refere à matéria-prima. A USP 28 (2005) também apresenta monografias do fármaco nas formas comprimidos e suspensão oral. Para a forma farmacêutica xampu não existem metodologias em códigos oficiais.

Segundo a USP 28 (2005), a determinação do teor de cetoconazol matéria-prima é feita através de volumetria em meio não-aquoso com determinação potenciométrica do ponto final. Para comprimidos contendo cetoconazol a determinação é feita através de CLAE com fase móvel diisopropilamina-metanol (1:500) / acetato de amônio (1:200) (7:3) e detector em λ 225 nm. A suspensão oral de cetoconazol é avaliada por CLAE com a seguinte fase móvel: 2,55g de sulfato de tetrabutilamônio em 750 ml de água e 250 ml de acetonitrila.

Diferentes métodos analíticos para quantificação do cetoconazol, principalmente em fluidos biológicos e comprimidos foram citados na literatura.

Métodos espectrofotométricos na região do visível foram descritos para o doseamento do cetoconazol. SADEGHI e SHAMSIPUR (1998) desenvolveram um método para determinação do cetoconazol em comprimidos, creme e amostras de soro. O método consiste na extração do fármaco com ácido pícrico pH 2,5 e clorofórmio, seguido de detecção a 410 nm. Segundo KELANI e colaboradores (1997), a quantificação de derivados piperazínicos, entre eles o cetoconazol na forma de comprimidos, foi aplicada com sucesso. Fez-se reação do fármaco com 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona e determinação da absorvância do produto colorido formado em 588 nm. Os resultados foram comparados com a metodologia oficial.

O doseamento do cetoconazol, através de espectrofotometria na região do ultravioleta, também foi descrito. Os autores desenvolveram, para a determinação do fármaco em comprimidos e cremes, um método onde a amostra foi dissolvida em ácido clorídrico 0,01 M e detectada em comprimentos de onda de 222 nm e 269 nm (KEDOR-HACKMANN *et al.*, 1994). Método baseado na formação de um complexo do fármaco com iodo foi desenvolvido. O produto formado apresentou duas absorções máximas a 290 e a 377 nm. As leituras foram feitas a 290 nm. O método mostrou-se rápido, simples e sensível (EL-SHABOURI *et al.*, 1998).

ABOUNASSIFE e EL-SHZLY (1989) determinaram o cetoconazol (substância ativa) e na forma farmacêutica comprimidos por titulação potenciométrica em meio não-aquoso, e por RMN-¹H. Foram obtidos resultados com boa exatidão, precisão e sensibilidade.

Alguns trabalhos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, foram encontrados. Na Tabela 4 estão apresentados os resumos de algumas técnicas.

Tabela 4 – Resumos dos métodos utilizados para a determinação do cetoconazol por cromatografia líquida de alta eficiência em formas farmacêuticas.

Coluna	Fase Móvel	Deteccão	Forma Farmacêutica	Autor
μBondapak C18 10 μm (10 cm x 8 mm)	metanol : água: ác. acético (67,5:32:0,5)	UV (242 nm)	comprimidos	AL- MESHAL, 1989
LiChrospher 100 C18 5 μm (125 x 4 mm)	diisopropilamina : metanol 1:500 / acetato amônio : água 1:200 (8:2)	UV (225 nm)	comprimidos e creme	KEDOR- HACKMANN <i>et al.</i> , 1994
Bondapak C18 10 μm (25 cm x 4,6 mm)	acetonitrila : tampão fosfato (55:45) pH 7,0	UV (260 nm)	comprimidos e creme	ABDEL- MOETY <i>et al.</i> , 2002
LiChrosorb C18 5μm (250 x 4 mm)	metanol-acetato de amônio 0,5 % (80:20)	UV (225 nm)	comprimidos e creme	VELIKINAC <i>et al.</i> , 2004

Após extensa revisão da literatura, encontraram-se poucos trabalhos para a determinação do fármaco na forma farmacêutica xampu. HEYDEN e colaboradores (2002) desenvolveram e validaram um método de CLAE para a determinação simultânea de cetoconazol e formaldeído em xampu. Foi utilizado coluna Interchrom Nucleosil C8, 5 μm (250 x 4,6 mm) e fase móvel constituída por acetonitrila : tampão fosfato de sódio 0,025 M, (45:55) e pH 4,0. A determinação do

cetoconazol foi feita a 250 nm e o formaldeído foi determinado a 345 nm. Segundo os autores, as duas substâncias em análise puderam ser determinadas com bons resultados.

Um método de CLAE para a determinação simultânea de cetoconazol e formaldeído em xampu, utilizando colunas pequenas, foi desenvolvido. As colunas utilizadas foram Zorbax SB C8 (75 x 4,6 mm) 3,5 μm e Discovery C8 (50 x 4,6 mm) 5 μm . A fase móvel foi constituída por acetonitrila : tampão fosfato de sódio 0,01 M (45:55). O pH final foi ajustado com ácido fosfórico para 4,0. O fluxo empregado foi de 1 ml/min e a detecção foi feita a 250 nm para o cetoconazol e 345 nm para o formaldeído. O método foi validado para as duas colunas pequenas utilizando a coluna original como referência. A redução no tempo de análise é uma vantagem na utilização destas colunas (NGUYET *et al.* 2003).

3.5.2.4. Estabilidade

No produto acabado, a estabilidade pode ser definida como “a capacidade que o produto tem, num determinado período de tempo, do início ao final da sua vida útil, e numa embalagem determinada, de manter as mesmas propriedades e características que tinha no momento em que finalizou a sua preparação” (D’LEÓN, 2001). Os tipos de estabilidade são:

- ✓ química: propriedade de conservar a concentração da substância ativa;
- ✓ física: propriedade de reter as características físicas como odor, cor, consistência;
- ✓ microbiológica: propriedade de conservar, de forma inalterada, suas características microbiológicas;
- ✓ toxicológica: propriedade de não aumentar seu potencial tóxico, além do nível apresentado no momento da sua preparação.

Após a preparação do xampu de cetoconazol, observa-se que o produto sofre algum tipo de alteração, pois o mesmo adquire coloração avermelhada muito rapidamente (STAUB *et al.*, 2002). Essa alteração sugere que o produto não é estável e que o mesmo forma produtos de degradação. Um grande problema da instabilidade de uma formulação é a diminuição no teor da substância ativa e a possível formação de produtos tóxicos de degradação.

Após revisão de literatura sobre a estabilidade do fármaco, foi possível encontrar alguns artigos sugerindo a instabilidade do produto frente à luz.

Segundo KUMMER e colaboradores (1991), soluções etanólicas de cetoconazol (2,5 e 5,0 µg/ml) mostraram-se estáveis por um período de 28 dias. Foram analisadas soluções armazenadas em presença da luz ou ao abrigo da luz assim como a ação da temperatura sobre as soluções (temperatura ambiente e refrigeração a 8 °C). Os resultados apresentados não demonstraram diferença significativa, indicando estabilidade do cetoconazol em solução etanólica.

Entretanto, THOMA e KÜBLER (1996c) compararam a fotoestabilidade de antimicóticos azólicos. Apesar de suas estruturas serem semelhantes, os pesquisadores relataram que existem diferenças na estabilidade fotoquímica. Em particular, cetoconazol e terconazol mostraram-se fotolábeis. A instabilidade fotoquímica foi considerada em solução metanólica e também com o fármaco no estado sólido. Por outro lado, clotrimazol, nitrato de econazol e miconazol resistiram à degradação fotolítica.

ALLEN e ERICKSON (1996) avaliaram a estabilidade do cetoconazol em líquidos orais (20 mg/ml). Seis frascos foram preparados, sendo que três foram armazenados a 5 °C e três a 25 °C, todos no escuro. As amostras foram analisadas por um período de 60 dias, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. O fármaco mostrou ser estável por 60 dias, armazenado ao abrigo da luz, a 5 °C e a 25 °C nos líquidos orais analisados.

O xampu de cetoconazol 2 % foi avaliado após exposição à luz visível. A determinação foi feita através de espectrofotometria na região do ultravioleta, detectando-se alteração do espectro a partir do décimo quinto dia, o que fez pressupor alteração na formulação (HEPP, 1999).

Foi avaliado o emprego de antioxidantes (vitamina E e BHT), e seu desempenho como agente promotor de estabilidade de preparações (creme e xampu), que continham cetoconazol, avaliando-se as características organolépticas (aspecto, cor, odor) e o teor de cetoconazol através de espectrofotometria na região do ultravioleta. As amostras foram armazenadas a 10, 25 ou 50 °C, sendo avaliadas nos tempos 0, 30 e 85 dias. Para as amostras na forma de creme, armazenadas à baixa temperatura, todos os sistemas permaneceram inalterados. Nas amostras à temperatura ambiente ficou evidenciada a importância da presença de antioxidantes para diminuir a queda no teor de cetoconazol. Porém, na análise visual todos os sistemas apresentaram-se normais quanto ao aspecto, cor e odor. Possivelmente, o fato das amostras permanecerem fechadas e ao abrigo da luz tenha propiciado a estabilidade na sua cor durante os 85 dias de teste. Na estufa ocorreram variações na cor, sugerindo que o antioxidante BHT foi mais eficiente (TONON *et al.*, 1999).

A estabilidade do cetoconazol em meio aquoso foi avaliada por SKIBA e colaboradores (2000) em função do pH, antioxidantes e concentração do fármaco. Achou-se que o cetoconazol foi menos estável em pH 1,0 numa faixa de valor avaliada de 1,0 a 9,0. A quantidade de cetoconazol teve pequena influência no mecanismo de degradação, e o aumento de butilidroxitolueno (BHT) de 0,05 a 0,4 % pareceu melhorar a estabilidade do cetoconazol, em formulações aquosas, particularmente em pH 1,0.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO GERAL

Nome genérico: cetoconazol (Figura 1)

Nome químico: 1-acetil-4-{4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina

CAS: 65277-42-1

Fórmula química: $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$

Massa molecular: 531,43

Faixa de fusão: 148 – 152 °C (USP 28, 2005)

Propriedades físico-químicas: pó branco ou quase branco. Praticamente insolúvel em água, parcialmente solúvel em álcool, solúvel em álcool metílico, bastante solúvel em diclorometano (REYNOLDS, 1996).

Categoria: antifúngico

Classe: imidazol

pKa: 2,9 e 6,5 (FOYE et al., 2002)

4.2. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

Foi utilizado cetoconazol, substância química de referência, com teor estimado em 98,8 % e identificado pelo número de lote 0100005564, cedido pelo laboratório Stiefel (São Paulo, Brasil).

4.3. MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizadas duas matérias-primas no desenvolvimento do trabalho. Cetoconazol (Galena) n° de lote 01000029, validade 01/06 denominado Ceto1 e Cetoconazol (DEG) n° de lote 3CGS010, validade 10/05 denominado Ceto2.

4.3.1. Análise qualitativa da matéria-prima

4.3.1.1. Características organolépticas

As duas amostras de cetoconazol e a substância química de referência foram avaliadas visualmente quanto ao aspecto, cor e odor apresentados pelo fármaco.

4.3.1.2. Determinação do ponto de fusão

A faixa de fusão foi determinada nas matérias-primas Ceto1 e Ceto2, utilizando equipamento METTLER TOLEDO modelo FP90.

Uma pequena quantidade de amostra foi transferida para 3 tubos capilares. Os capilares foram introduzidos verticalmente no equipamento, e determinada sua faixa de fusão.

4.3.1.3. Rotação específica

As matérias-primas foram submetidas à avaliação polarimétrica para determinação da rotação específica, de acordo com o preconizado pela USP 28 (2005). Para tanto, foram dissolvidos 400 mg de Ceto1 e de Ceto2 em 10 ml de metanol, respectivamente *Solução teste 1 e 2*. A rotação específica das amostras foi determinada com auxílio de polarímetro PERKIN ELMER 341. Foram feitas cinco medidas e calculou-se a média dos valores obtidos.

Para o cálculo do poder rotatório específico utilizou-se a equação 1:

$$[\alpha]_{20}^D = \alpha / c.l \quad \text{Equação 1}$$

onde: α = ângulo de rotação

c = concentração da amostra em g/ml

l = comprimento do tubo (dm)

4.3.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram dissolvidos 30 mg de Ceto1, Ceto2 e SQR em 3 ml de clorofórmio respectivamente (*Solução teste 1, 2 e Solução padrão*). Diluiu-se uma porção da *Solução padrão* até obter concentração de 1 mg/ml, sendo esta denominada *Solução padrão diluída*.

Foram aplicados, separadamente, 10 μ l das *Soluções padrão, teste 1 e teste 2* e 2 μ l da *Solução padrão diluída*, com auxílio de capilar, em linha horizontal. A aplicação foi feita 1,5 a 2 cm acima do bordo inferior e com distância entre elas de 1 cm. O cromatograma foi desenvolvido até 7 cm acima do ponto de aplicação.

Foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck como fase estacionária e o sistema eluente foi constituído de uma mistura de n-hexano, acetato de etila, metanol, água e ácido acético glacial (42:40:15:2:1 V/V/V/V/V). O cromatograma foi desenvolvido em cuba não saturada com o sistema eluente e revelado através da exposição a vapores de iodo e à luz ultravioleta 254 nm, respectivamente (USP 28, 2005).

4.3.1.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos, com auxílio de espectrofotômetro de infravermelho SHIMADZU FTIR, modelo 8001, pesando 1,5 mg de cetoconazol SQR e cetoconazol matéria-prima (Ceto1 e Ceto2), em pastilhas de 150 mg de brometo de potássio dessecado.

4.3.1.6. Espectrofotometria na região do ultravioleta

Foram traçados espectros de absorção na região de 200-400 nm, utilizando-se equipamento SHIMADZU UV-1601 PC, empregando cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico. As amostras e o padrão foram solubilizados em metanol com concentração final de 10 µg/ml.

4.3.1.7. Perda por dessecação

Foi dessecado 1 g de cada matéria-prima (Ceto1 e Ceto2), em pesa-filtro, em estufa à vácuo, por um período de 4 h e com temperatura de 80 °C (USP 28, 2005).

4.3.2. Análise quantitativa da matéria-prima

4.3.2.1. Volumetria em meio não-aquoso

Ceto1 e Ceto2 foram quantificadas por volumetria em meio não-aquoso, segundo USP 28 (2005). Dissolveram-se exatamente cerca de 200 mg de cetoconazol previamente dessecado, em 40 ml de ácido acético glacial. Titulou-se com ácido perclórico 0,1 M SV e o ponto de equivalência foi determinado potenciométricamente. Cada ml de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 26,57 mg de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$. Procedeu-se ensaio em branco.

Os ensaios para cada matéria-prima foram realizados em triplicata e os desvios padrões relativos (DPR) foram calculados. Para a correção do volume gasto da solução titulante, em função da diferença entre as temperaturas de padronização do ácido perclórico e do doseamento, fez-se uso da equação 2 (KOROLKOVAS, 1984):

$$V_c = V [1 + (t_1 - t_2) \cdot 0,0011]$$

Equação 2

onde V_c = volume corrigido

V = volume gasto

t_1 = temperatura ambiente por ocasião da padronização do titulante

t_2 = temperatura ambiente por ocasião do doseamento

0,0011 = coeficiente de expansão cúbica do ácido acético glacial

4.4 FORMAS FARMACÊUTICAS

Para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos e posterior estudos de fotoestabilidade do fármaco foram utilizadas duas formulações comerciais de xampu, uma formulação de xampu desenvolvida e preparada no laboratório e uma solução metanólica de cetoconazol. Todas as formulações utilizadas apresentavam a mesma concentração de cetoconazol (2 %).

4.4.1. Xampu de cetoconazol 2 % preparado no laboratório (Xb-Ceto)

4.4.1.1. Preparo do xampu base (Xb)

Os constituintes da formulação estão citados abaixo:

- ✓ Lauril éter sulfato de sódio 40%

- ✓ Dietanolamida de ácido graxo de coco 2%
- ✓ Metilparabeno 0,2 %
- ✓ Cloreto de sódio 2%
- ✓ Água qsp

Adicionou-se, mediante agitação, lauril éter sulfato de sódio, dietanolamida de ácido graxo de coco e metilparabeno (solubilizado em álcool etílico) até obtenção de um produto homogêneo. Dissolveu-se o cloreto de sódio na água e adicionou-se à mistura anteriormente obtida. A formulação foi feita com agitação até obter um produto final homogêneo.

4.4.1.2. Preparo do xampu de cetoconazol 2 % (Xb-Ceto)

Pesaram-se 2 g de cetoconazol, seguindo-se a solubilização do fármaco em HCl *M* e adição de 100 ml de xampu base (item 4.4.1.1.). Após, fez-se a homogeneização da formulação, com auxílio de um bastão. O pH final do xampu foi ajustado com NaOH *M* até 5,5, medido em potenciômetro DIGIMED DMPH-2. A formulação foi preparada ao abrigo da luz.

A formulação utilizada para desenvolvimento e validação dos métodos, foi armazenada em frasco plástico opaco, e mantida ao abrigo da luz.

4.4.2. Xampu comercial de cetoconazol 2% (Form1 e Form2)

Foram adquiridas duas formulações de diferentes indústrias farmacêuticas que foram denominadas Form1 e Form2. As amostras foram escolhidas, pois a Form1 é o medicamento de referência e a Form2 é medicamento genérico. Os constituintes das formulações estão descritos abaixo:

Form1

- ✓ Concentração: cetoconazol 20 mg/g
- ✓ Quantidade de xampu no frasco: 100 ml
- ✓ Frasco de comercialização: branco opaco
- ✓ Fabricação: abril/03
- ✓ Validade: abril/05
- ✓ Obs: conservar protegido da luz

- ✓ Composição: sulfato sódico de lauril-poliglicol-éter, lauril-poliglicol-éter sulfosuccinato sódico, dietanolamida de ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oléico, laurdimônio de colágeno hidrolisado, dioleato de macrogol-120 metil glicose, perfume buquê, imiduréia, ácido clorídrico, eritrosina sódica e água purificada.

Form2

- ✓ Concentração: cetoconazol 20 mg/g
- ✓ Quantidade de xampu no frasco: 110 ml
- ✓ Frasco de comercialização: branco opaco
- ✓ Fabricação: agosto/03
- ✓ Validade: agosto/05
- ✓ Obs: conservar protegido da luz

- ✓ Composição: lauril éter sulfato de sódio, lauril éter sulfosuccinato de sódio, dietanolamida do ácido graxo de coco, trioleato de metil glicose, hidroxipropyllaurildiamônio de colágeno hidrolisado, cloreto de sódio, imidazolinidil uréia,

ácido clorídrico, hidróxido de sódio, fragrância, corante vermelho Ponceaux 4R e água deionizada.

4.4.3. Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)

Para a preparação da solução metanólica pesaram-se 2 g de cetoconazol e após adicionaram-se 100 ml de álcool metílico p.a.

4.5. ANÁLISE DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

4.5.1. Análise qualitativa

4.5.1.1. Características organolépticas

As amostras de xampu (Xb-ceto, Form1 e Form2) e solução (Sol-ceto) foram analisadas quanto ao aspecto de cor e odor para posterior comparação durante o estudo de estabilidade.

4.5.1.2. Determinação da densidade

A densidade relativa do Xb-ceto, Form1 e Form2 foi determinada através de picnômetro. Primeiramente, fez-se a calibração do mesmo, para tanto determinou-se a massa do picnômetro vazio e a massa do seu conteúdo com água, recentemente destilada, a 20 °C. Após, colocou-se o xampu no picnômetro, removeu-se o excesso da substância e pesou-se. O peso da amostra, assim como o peso da água, foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, é a densidade relativa. (F. Bras. IV, 1988).

4.5.1.3. Determinação do pH

Fez-se a determinação do pH das formulações comerciais (Form1 e Form2) com auxílio de potenciômetro DIGIMED DMPH-2.

4.5.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para as amostras na forma farmacêutica xampu (Xb-ceto, Form1 e Form2) foi necessária a extração do fármaco com auxílio de solvente, para após ser efetuada a CCD. Para tanto, adicionaram-se em um funil de separação 1,25 ml de xampu e 10 ml de uma solução aquosa contendo NaCl. Após adicionaram-se 10 ml de diclorometano, agitou-se vigorosamente e aguardou-se até a separação total das duas fases. Recolheu-se a camada orgânica (inferior) em um frasco opaco. Após adicionaram-se, novamente, 10 ml e, por fim, 5 ml de diclorometano no funil de separação e procedeu-se como anteriormente. A concentração final obtida para o cetoconazol foi de aproximadamente 1 mg/ml.

A *Solução padrão* foi obtida dissolvendo-se 3 mg de cetoconazol SQR em diclorometano. Após, diluiu-se uma porção da *Solução padrão* até obter concentração de 0,1 mg/ml sendo esta a *Solução padrão diluída*.

Aplicaram-se, separadamente, 10 µl das *Soluções padrão e padrão diluída e* 10 µl das amostras (Xb-ceto, Form1 e Form2) extraídas do xampu, com auxílio de capilar, em linha horizontal.

Para a solução metanólica de cetoconazol a 2 % (Sol-ceto) não foi feita diluição para a aplicação na placa, sendo aplicados 2 µl da amostra diretamente na placa.

A aplicação foi feita 1,5 a 2 cm acima do bordo inferior e com distância entre elas de 1 cm. O cromatograma foi desenvolvido até 7 cm acima do ponto de aplicação em placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck como fase estacionária. O

sistema eluente constituído de uma mistura de n-hexano, acetato de etila, metanol, água e ácido acético glacial (42:40:15:2:1 V/V/V/V/V). O cromatograma foi desenvolvido em cuba não saturada com o sistema eluente e revelado através da exposição a vapores de iodo e à luz ultravioleta 254 nm, respectivamente (USP 28, 2005).

4.5.2. Análise quantitativa

Para posterior estudo da fotoestabilidade do cetoconazol, desenvolveram-se e validaram-se dois métodos para determinação do teor do fármaco nas formulações: cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico.

4.5.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Através de testes preliminares foram determinados os parâmetros ideais para o desenvolvimento e validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação do cetoconazol nas seguintes formulações: Xb-ceto, Form1 e Form2.

4.5.2.1.1. Reagentes

Foram utilizados reagentes grau CLAE e a água foi obtida por sistema Millipore®.

4.5.2.1.2. Equipamento

As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU LC-10AD, detector de UV-Vis SPD-10AV, central de controle SCL-10A, desgaseificador DGU-14A.

4.5.2.1.3. Fase móvel

A fase móvel foi constituída de uma mistura das soluções A e B (7:3, V/V). A solução A contendo monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V) e a solução B acetato de amônio-água (1:200, p/V). O pH final da solução foi ajustado com ácido acético até 5,5, com auxílio de potenciômetro. Após a mistura foi desgaseificada durante 12 minutos, em banho de ultra-som sob vácuo.

4.5.2.1.4. Condições cromatográficas

Os parâmetros utilizados foram:

- ✓ Fluxo: 1ml/min
- ✓ Coluna: LiChrospher® 100 RP-8, 5 µm (150 mm x 4,6 mm)
- ✓ Comprimento de onda: 225 nm
- ✓ Volume de injeção: 20,0 µl
- ✓ Temperatura: 20 °C

4.5.2.1.5. Validação

Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, especificidade, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação (USP 28, 2005; ICH, 1996b).

4.5.2.1.5.1. Linearidade

Fez-se a solubilização do cetoconazol substância química de referência (SQR) em HCl *M* e após completou-se o volume com a fase móvel, de forma a obter solução estoque contendo 600 µg/ml.

A partir desta solução, alíquotas de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 ml foram transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 ml, com auxílio de uma bureta. Completaram-se os volumes com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 60,0; 120,0; 240,0; 360,0; 480,0 µg/ml. Os procedimentos de diluição foram executados ao abrigo da luz.

A curva padrão foi realizada em três dias, sendo que cada ponto da curva foi injetado em triplicata, e com a média das áreas obtidas nos diferentes dias, construiu-se um gráfico plotando-se o resultado da média das áreas versus concentração (µg/ml).

4.5.2.1.5.2. Precisão

A precisão do método foi verificada na amostra da formulação elaborada no laboratório (Xb-ceto), assim como nas formulações comerciais (Form1 e Form2). Foram avaliadas seis amostras de cada formulação, em três dias diferentes, sendo cada amostra injetada em triplicata. A preparação das mesmas e da solução de SQR está descrita abaixo.

A. Preparo da solução de cetoconazol SQR

Foram pesados, analiticamente, 15,0 mg de SQR em balão volumétrico âmbar de 50 ml; adicionaram-se 2 ml de HCl *M* e completou-se o volume com a fase móvel.

B. Preparo das soluções amostra

Para as três formulações avaliadas (Xb-ceto, Form1 e Form2) foram pesados exatamente cerca de 400 mg de xampu (equivalentes a 8,0 mg de cetoconazol) em balão volumétrico âmbar de 25 ml. Após, completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se concentração de 320 µg/ml.

Para a formulação desenvolvida no laboratório (Xb-ceto), foi necessário fazer a correção da densidade, para os cálculos de teor, pois a concentração da mesma era expressa em mg/ml. Para as formulações comerciais, a correção não foi necessária (concentração mg/g).

C. Cálculos

Foram calculadas as áreas médias correspondentes a três injeções, para as amostras Xb-ceto, Form1, Form2 e para a solução de SQR. Após, procedeu-se a quantificação de cetoconazol em cada formulação, utilizando-se a equação 3:

$$\% \text{ cetoconazol} = \frac{A_a \cdot C_p \cdot 100}{A_p \cdot C_a}$$

Equação 3

onde: A_a = área média da amostra

A_p = área média do padrão

C_a = concentração da amostra ($\mu\text{g/ml}$)

C_p = concentração do padrão ($\mu\text{g/ml}$)

4.5.2.1.5.3. Especificidade

Para a formulação desenvolvida no laboratório, a especificidade foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos da solução amostra do Xb-ceto e de uma solução amostra placebo, isto é, contendo somente os excipientes do xampu (Xb) descrito no item 4.4.1.1.

A solução de amostra de Xb-ceto foi preparada conforme descrito no item 4.5.2.1.5.2.B.; a solução do placebo foi preparada pesando-se 400 mg de Xb (item 4.4.1.1.) em balão volumétrico de 25 ml.

A determinação da especificidade nas amostras comerciais (Form1 e Form2) foi realizada através da determinação da pureza dos picos cromatográficos, com auxílio de detector de arranjo de diodos SPD-M10A VP.

4.5.2.1.5.4. Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela adição de quantidades conhecidas da SQR na solução amostra de Xb-ceto.

Para tanto, foram transferidas para balão volumétrico âmbar de 25 ml, alíquotas de 2,5 ml, a partir de solução estoque de amostra, contendo o equivalente

a 2,2 mg/ml. A essas alíquotas foram acrescentados 1,0; 2,0 e 3,0 ml de solução estoque de cetoconazol SQR (1,1 mg/ml); após completou-se o volume com a fase móvel. As concentrações obtidas foram de 264,0; 308,0; 352,0 µg/ml, sendo estas denominadas R1, R2 e R3, respectivamente.

Para quantificar o teor recuperado de cetoconazol SQR, adicionado nas soluções, procedeu-se o cálculo de percentagem recuperada através da equação 4 descrita pelo AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990).

$$R \% = \frac{(C_f - C_a) \cdot 100}{C_{SQR}}$$

Equação 4

onde: C_f = concentração encontrada na amostra adicionada da SQR (µg/ml)

C_a = concentração encontrada na amostra não adicionada da SQR (µg/ml)

C_{SQR} = concentração da SQR adicionada à amostra (µg/ml)

4.5.2.1.5.5. Robustez

Para a determinação da robustez do método foi avaliada a estabilidade da solução e realizados testes com alterações na fase móvel conforme descrito a seguir.

A. Estabilidade da solução

Avaliou-se durante três dias a estabilidade de uma solução SQR. Para tanto, preparou-se a solução, em balão volumétrico âmbar, no diluente contendo 300 µg/ml de cetoconazol. A solução foi armazenada à temperatura ambiente e foi analisada no momento do preparo, no segundo e terceiro dias. Calculou-se o desvio

padrão relativo das médias das áreas obtidas e verificou-se o possível surgimento de outros picos no cromatograma.

B. Modificações na fase móvel

Fez-se modificações na fase móvel original (monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V) / acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5) e após injetou-se a solução de 300 µg/ml de cetoconazol SQR verificando possíveis alterações no cromatograma. Alterou-se a proporção de solvente orgânico (6,5:3,5) e alterou-se o pH (4,5). Calculou-se o desvio padrão relativo das médias das áreas obtidas.

4.5.2.1.5.6. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados matematicamente, a partir dos dados obtidos da equação da reta da curva padrão, pelas equações 5 e 6 (ICH, 1996b):

$$\text{LD} = \frac{\text{DP} \cdot 3,3}{b}$$

Equação 5

$$\text{LQ} = \frac{\text{DP} \cdot 10}{b}$$

Equação 6

onde: DP = desvio padrão do intercepto

b = inclinação da reta

4.5.2.2. Ensaio microbiológico

Foram realizados ensaios preliminares para o desenvolvimento do método de análise do cetoconazol na formulação de Xb-ceto. Para o desenvolvimento deste ensaio foram realizados testes alternando-se alguns parâmetros conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros utilizados para a avaliação de xampu de cetoconazol por ensaio microbiológico – método de difusão em ágar.

Parâmetros	Descrição
<i>Microrganismo</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC2601
<i>Concentração do inóculo</i>	0,25; 0,5; 1,0 %
<i>Solução diluente inicial</i>	HCl M, DMSO, Álcool metílico
<i>Solução diluente final</i>	Água Solução tampão fosfato potássio 1 % pH 4,5 Solução tampão fosfato potássio 1 % pH 6,0
<i>Concentração das soluções</i>	25,0; 100,0; 400,0 µg/ml 30,0; 120,0; 480,0 µg/ml 50,0; 150,0; 450,0 µg/ml 20,0; 100,0; 500 µg/ml
<i>Método</i>	Cilindros em placa Discos de papel
<i>Meios de cultura</i>	Ágar Sabouraud-dextrose 2 % Ágar Sabouraud-dextrose 4 %
<i>Tempo de incubação</i>	16; 18; 24 horas

A partir dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, foi possível estabelecer os parâmetros ideais para a realização do doseamento microbiológico, método de difusão em ágar, que encontram-se descritos abaixo:

- ✓ Microrganismo: *Candida albicans* ATCC 10231
- ✓ Concentração do inóculo: 0,5 %
- ✓ Solução diluente inicial: Álcool metílico
- ✓ Solução diluente final: Solução tampão fosfato potássio 1 % pH 6,0
- ✓ Concentração das soluções: 20,0; 100,0; 500 µg/ml
- ✓ Método: Cilindros em placa
- ✓ Meio de cultura: Ágar Sabouraud-dextrose 2 %
- ✓ Tempo de incubação: 18 horas
- ✓ Temperatura de incubação: 35 ± 2 °C

4.5.2.2.1. Material

Foram empregadas placas de Petri (20 mm x 100 mm) e cilindros de aço inoxidável (8 mm x 6 mm x 10 mm). Esses materiais, assim como vidraria não volumétrica, utilizados no ensaio microbiológico, foram esterilizados em estufa à temperatura de 180 °C, durante duas horas.

Após a execução do ensaio, a medida dos halos de inibição formados foi feita em leitor de placas BIOMATIC com auxílio de paquímetro digital STARRET, com graduação de 0,01 mm.

4.5.2.2.2. Preparo do meio de cultura

No doseamento microbiológico foi utilizado ágar Sabouraud-dextrose 2 % (Merck), para manutenção e repique do microrganismo, assim como para o preparo

da camada base e inóculo. O meio de cultura, Sabouraud-dextrose 2 %, foi preparado através de reconstituição do meio dessecado em água. Fez-se o aquecimento do meio até total dissolução e após esterilizou-se em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

4.5.2.2.3. Preparo da solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0

Dissolveram-se 2 g de fosfato de potássio dibásico e 8 g de fosfato de potássio monobásico em 1000 ml de água. Após procedeu-se a determinação do pH, com auxílio de potenciômetro, e esterilização em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos (USP 28, 2005).

4.5.2.2.4. Preparo da solução salina

Pesou-se 0,9 g de cloreto de sódio e diluiu-se em 100 ml de água. Após, fez-se a esterilização em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

4.5.2.2.5. Preparo do inóculo

O microrganismo foi mantido em refrigerador, em tubo contendo ágar Sabouraud-dextrose 2 % inclinado, e repicado para outro tubo, 48 horas antes do ensaio, permanecendo à temperatura de 25 °C. No momento do ensaio, o microrganismo foi transferido para solução salina, até obter-se uma suspensão a 25 % \pm 2 % de transmitância, a 580 nm. A partir desta suspensão, preparou-se o inóculo a 0,5 % em ágar Sabouraud-dextrose 2 %, mantido em banho-maria a 47 °C \pm 1 °C até ser distribuído nas placas.

4.5.2.2.6. Validação

Para a validação do método alguns parâmetros foram avaliados:

✓ Linearidade: foram desenvolvidas duas curvas padrão, em dias diferentes, com três concentrações cada uma. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram calculados.

✓ Precisão: foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido na repetibilidade (mesmo dia) e na precisão intermediária (diferentes dias) das amostras com a mesma concentração.

✓ Exatidão: avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida de SQR adicionada à amostra.

4.5.2.2.6.1. Preparo das soluções de cetoconazol SQR

Foram transferidos 25,0 mg de cetoconazol substância química de referência, exatamente pesados, para balão volumétrico âmbar de 25 ml. Solubilizou-se em 2 ml de HCl *M*, e após adicionaram-se 1,25 g de xampu base (descrito no item 4.4.1.1.), 0,25 ml de polissorbato 80 e 10 ml de álcool metílico. O balão volumétrico foi agitado durante 20 minutos em agitador mecânico e após completou-se o volume com álcool metílico. Após filtração com papel de filtro comum, foram transferidos, analiticamente, 1,0; 1,0 e 5,0 ml da solução com concentração de 1000 µg/ml, para balões volumétricos âmbar de 50, 10 e 10 ml e adicionados de solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0, obtendo concentrações finais de 20,0; 100,0 e 500,0 µg/ml (P1, P2 e P3).

4.5.2.2.6.2. Preparo das soluções amostra

Foram transferidos 1,25 g de xampu de cetoconazol (descrito no item 4.4.1.2.), exatamente pesados, para balão volumétrico âmbar de 25 ml. Adicionaram-se 0,25 ml de polissorbato 80 e 10 ml de álcool metílico. O balão volumétrico foi agitado durante 20 minutos em agitador mecânico e após completou-se o volume com álcool metílico. Após filtração com papel de filtro comum, foram transferidos, analiticamente, 1,0; 1,0 e 5,0 ml da solução com concentração de 1000 µg/ml, para balões volumétricos âmbar de 50, 10 e 10 ml e adicionados de solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0, obtendo concentrações finais de 20,0; 100,0 e 500,0 µg/ml (A1, A2 e A3).

4.5.2.2.6.3. Ensaio

O teor de cetoconazol presente no xampu (Xb-ceto) foi determinado através do método de difusão em ágar - cilindros em placas, com delineamento 3 x 3. Em capela de fluxo laminar, foram adicionados 20 ml do meio de cultura (ágar Sabouraud-dextrose 2 %) em cada placa, permanecendo as placas abertas até a solidificação do meio. Foram adicionados 5 ml de inóculo 0,5 %. Após a solidificação do inóculo, procedeu-se à distribuição de seis cilindros estéreis por placa, nos quais foram adicionados, em cada cilindro, 200 µl das soluções de cetoconazol SQR (descritas no item 4.5.2.2.6.1.) e das soluções amostra (descritas no item 4.5.2.2.6.2.), resultando na análise de três concentrações de cetoconazol SQR e três concentrações de cetoconazol amostra.

As placas foram incubadas, em estufa a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período de 18 horas. Após, procedeu-se a leitura dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor de cada cilindro, com auxílio de paquímetro digital.

4.5.2.2.6.4. Cálculos

Os ensaios foram realizados em dois dias, sendo que, em cada dia utilizaram-se 24 placas, finalizando 48 placas avaliadas. Para efeito de cálculo, foram realizadas médias de cada 8 placas, totalizando seis resultados médios que foram submetidos à análise estatística.

A reta foi construída plotando no gráfico os valores médios dos halos de inibição versus o logaritmo da concentração. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O ensaio foi avaliado através de análise de variância (ANOVA), conforme preconizado pela F. Bras. IV (1988). A determinação da potência do cetoconazol na amostra foi calculada pela equação de HEWITT (1977).

4.5.2.2.6.5. Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela adição de quantidades conhecidas da SQR na solução amostra.

Para realização do ensaio preparou-se uma solução estoque da SQR, denominada *Solução estoque 1*. Para tanto, foram transferidos 100 mg de cetoconazol SQR, exatamente pesados, para balão volumétrico âmbar de 50 ml. Solubilizou-se em HCl *M*, e após adicionaram-se 5 g de xampu base (descrito no item 4.4.1.1.), 0,5 ml de polissorbato 80 e 10 ml de álcool metílico. O balão volumétrico foi agitado durante 20 minutos em agitador mecânico e após completou-se o volume com metanol. Procedeu-se filtração com papel de filtro comum. A concentração final obtida foi de 2000 µg/ml.

A partir da *Solução estoque 1* fez-se uma nova diluição em metanol, denominada *Solução estoque 2*, obtendo concentração final de 500 µg/ml.

Preparou-se, da mesma forma, uma solução estoque da amostra. Foram transferidos 5,0 g de xampu de cetoconazol (descrito no item 4.4.1.2.), exatamente pesados, para balão volumétrico âmbar de 50 ml. Adicionaram-se 0,5 ml de polissorbato 80 e 10 ml de álcool metílico. O balão volumétrico foi agitado durante 20 minutos em agitador mecânico e após completou-se o volume com metanol. Procedeu-se filtração com papel de filtro comum. A concentração final obtida foi de 2000 µg/ml.

A. Preparo das soluções de cetoconazol SQR

Transferiram-se, analiticamente, 1,0; 1,5 e 1,8 ml da *Solução estoque 1* (2000 µg/ml), para balões volumétricos âmbar de 50, 25 e 10 ml e adicionou-se solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0, obtendo concentrações finais de 40,0; 120,0 e 360,0 µg/ml (P1, P2 e P3).

B. Preparo das soluções amostra

Transferiram-se, analiticamente, 1,0; 1,5 e 1,8 ml da solução estoque amostra (2000 µg/ml), para balões volumétricos âmbar de 50, 25 e 10 ml e adicionou-se solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0, obtendo concentrações finais de 40,0; 120,0 e 360,0 µg/ml (A1, A2 e A3).

C. Preparo das soluções R1, R2 e R3

Transferiram-se, analiticamente, 1,0; 1,5 e 1,8 ml da solução estoque da amostra (2000 µg/ml) e adicionaram-se 1,0; 1,5 e 1,8 ml da *Solução estoque 2* (500 µg/ml), para balões volumétricos âmbar de 50, 25 e 10 ml. Após adicionou-se

solução tampão fosfato de potássio 1 % pH 6,0, obtendo concentrações finais de 50,0; 150,0 e 450,0 µg/ml (R1, R2 e R3).

Para quantificar o teor recuperado de cetoconazol SQR adicionado na solução amostra, procedeu-se à execução do método sendo utilizadas 15 placas de Petri, adicionadas, aleatoriamente com 200 µl das soluções de cetoconazol SQR, soluções amostra e soluções R1, R2 e R3.

Com a média dos valores de halos de inibição obtidos e com a equação da reta foi possível calcular a percentagem recuperada através da equação 4 descrita no item 4.5.2.1.5.4 pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990).

4.6. ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE

4.6.1. Avaliação do cetoconazol frente à luz UV-C e luz UV-A

Para avaliação da fotoestabilidade do cetoconazol, amostras contendo o fármaco foram expostas à lâmpada *Light express LE UV* (254 nm), 30 W (UV-C) e à lâmpada *Blacklight blue lamp – Orion* (352 nm) 30 W, 130 V (UV-A). As lâmpadas foram colocadas em câmara, espelhada internamente, com 100 x 16 x 16 cm.

4.6.1.1. Amostras expostas à luz UV

A. Matéria-prima

Alíquotas de 1,0 ml de uma solução metanólica de cetoconazol 2 % foram transferidas para vidro de relógio. Aguardou-se até a evaporação total do solvente orgânico, obtendo a formação de um filme no vidro. As amostras foram colocadas

na câmara e analisadas nos tempos 0, 2, 6 e 8 horas para amostras expostas à lâmpada UV-C e nos tempos 0 e 48 horas para amostras expostas à lâmpada UV-A.

B. Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)

Retiraram-se alíquotas de 1,0 ml da solução metanólica de cetoconazol 2 % que foram acondicionadas em cubetas de plástico descartáveis Plastibrand®. Fecharam-se as cubetas, com auxílio de Parafilm®, e colocaram-se as amostras na câmara.

Adicionaram-se em cubetas de plástico descartáveis, metanol sem o cetoconazol (*Branco 1*), e amostras da solução metanólica de cetoconazol 2 %, revestidas com papel alumínio para proteção da luz UV (*Branco 2*). A temperatura da câmara foi monitorada durante todo o experimento. As amostras expostas à luz UV-C e UV-A foram avaliadas por 24 horas.

C. Xampu de cetoconazol 2 % (Xb-ceto)

Utilizaram-se cubetas de plástico descartáveis Plastibrand® para acondicionamento das amostras. Para tanto, pesaram-se 1,5 g de Xb-ceto em cada cubeta. Fecharam-se as cubetas, com auxílio de Parafilm®; fez-se determinação do peso total (amostra, cubeta e Parafilm®) e colocaram-se as cubetas na câmara contendo as lâmpadas. Após a retirada das cubetas da câmara, cada uma foi pesada, a fim de verificar alteração na densidade do produto. Juntamente com os testes de degradação do fármaco, avaliou-se a formulação do xampu base (Xb) sem o cetoconazol (*Branco 1*).

Além do *Branco 1*, cubetas de plástico descartáveis contendo amostras do xampu de cetoconazol (Xb-ceto), revestidas com papel alumínio para proteção da luz UV (*Branco 2*) foram avaliadas. A temperatura da câmara foi monitorada durante todo o experimento. As amostras expostas à luz UV-C e UV-A foram avaliadas por 24 horas.

4.6.1.2. Determinação do teor de cetoconazol

As amostras expostas à luz UV (UV-A e UV-C) foram avaliadas através de método desenvolvido e validado por CLAE (item 4.5.2.1.). Para tanto, a matéria-prima contida no vidro de relógio foi transferida quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 50 ml. O Xb-ceto retirado da cubeta foi pesado (400 mg) em balão volumétrico âmbar de 25 ml e as alíquotas da Sol-ceto retirada da câmara, foram transferidas, quantitativamente, para balão volumétrico âmbar de 50 ml. Fez-se a diluição com a fase móvel. O teor do cetoconazol foi determinado, assim como foi verificada a presença de produtos de degradação.

As amostras de Xb-ceto expostas à lâmpada UV-C, por um período de 0, 6 e 22 horas, foram avaliadas através de ensaio microbiológico (item 4.5.2.2.) para determinação da atividade antifúngica do fármaco.

4.6.2. Avaliação do cetoconazol frente à luz natural

Todas as amostras avaliadas ficaram a 50 cm da janela de modo a assegurar luz diurna constante.

4.6.2.1. Amostras expostas à luz natural

A. Matéria-prima

Para verificar a fotoestabilidade da matéria-prima, utilizaram-se pastilhas de brometo de potássio e cetoconazol que foram acondicionadas em cubetas de quartzo. Quando necessário, antes das leituras, as pastilhas eram dessecadas em estufa. Os estudos foram realizados durante 9 meses.

B. Solução metanólica de cetoconazol 2 %

As soluções metanólicas (Sol-ceto) foram acondicionadas em frascos plásticos transparentes ou opacos, contendo aproximadamente 100 ml cada um. O período de análise foi de 26 meses. As amostras foram avaliadas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 22 e 26 meses.

C. Xampu de cetoconazol 2 %

As formulações de xampu (Xb-ceto) foram acondicionadas em frascos plásticos transparentes ou opacos, contendo aproximadamente 100 ml cada um. O período de análise foi de 26 meses. As amostras foram avaliadas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 22 e 26 meses.

D. Formulações comerciais

As formulações comerciais (Form1 e Form2) foram colocadas junto às formulações de Xb-ceto, permanecendo na embalagem de comercialização (frasco opaco). O período de análise foi de 17 meses, a partir da obtenção das mesmas. As amostras foram avaliadas nos tempos 0, 3, 6, 11 e 17 meses.

4.6.2.2. Detecção dos produtos de degradação

As pastilhas de brometo de potássio foram submetidas diretamente à análise por espectroscopia na região do infravermelho. A solução metanólica e as formulações de xampu foram avaliadas por cromatografia em camada delgada (item 4.5.1.4.) e cromatografia líquida de alta eficiência (item 4.5.2.1.).

4.6.2.3. Determinação do teor de cetoconazol

Para a determinação do teor do fármaco as amostras (Sol-ceto, Xb-ceto, Form1 e Form2) foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.). As formulações de Xb-ceto, expostas à luz visível, por um período de 17 meses, foram avaliadas através de ensaio microbiológico (item 4.5.2.2.) para avaliação da atividade antifúngica do fármaco.

4.6.2.4. Determinação da densidade

Durante os estudos de estabilidade das formulações fez-se a determinação da densidade do Xb-ceto, Form1 e Form2, através de picnômetro, para observar possível modificação na massa do produto. Para tanto, utilizou-se metodologia descrita no item 4.5.1.2.

4.6.2.5. Determinação do pH

Durante os estudos de estabilidade das formulações, fez-se a determinação do pH das formulações comerciais (Form1 e Form2) e da Xb-ceto, com auxílio de potenciômetro DIGIMED DMPH-2, para verificar possível alteração no pH das mesmas.

4.7. ESTABILIDADE QUÍMICA

4.7.1. Degradação ácida

A. Matéria-prima

Adicionaram-se a 15,0 mg de cetoconazol (matéria-prima) 4 ml de HCl *M* em balão volumétrico âmbar de 50 ml, aguardou-se por 4 horas e após a solução foi neutralizada com 4 ml de NaOH *M*. Completou-se o volume com a fase móvel. As amostras foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.).

B. Formas farmacêuticas

Para as três formulações avaliadas (Xb-ceto, Form1 e Form2) foram pesados, analiticamente, 400 mg de xampu (equivalentes a 8,0 mg de cetoconazol) em balão volumétrico âmbar de 25 ml. Adicionaram-se 4 ml de HCl *M*, aguardou-se por 4 horas, e após a solução foi neutralizada com 4 ml de NaOH *M*. Completou-se o volume com a fase móvel. As amostras foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.).

4.7.2. Degradação alcalina

A. Matéria-prima

Pesaram-se 15,0 mg de cetoconazol (matéria-prima) em balão volumétrico âmbar de 50 ml, solubilizou-se em álcool metílico e a esta solução foram adicionados 4 ml de NaOH *M*. Aguardou-se por 4 horas e após a solução foi neutralizada com 4 ml de HCl *M*. Completou-se o volume com a fase móvel. As amostras foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.).

B. Formas farmacêuticas

Para as três formulações avaliadas (Xb-ceto, Form1 e Form2) foram pesados, analiticamente, 400 mg de xampu (equivalentes a 8,0 mg de cetoconazol) em balão volumétrico âmbar de 25 ml. Adicionaram-se 4 ml de NaOH *M*, aguardou-se por 4 horas, e após a solução foi neutralizada com 4 ml de HCl *M*. Completou-se o volume com a fase móvel. As amostras foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.).

4.7.3. Degradação com peróxido de hidrogênio

A. Matéria-prima

Pesaram-se 200,0 mg de cetoconazol (matéria-prima) em balão volumétrico âmbar de 50 ml, solubilizou-se em álcool metílico e a estes foram adicionados 30 ml de peróxido de hidrogênio 30 %. Agitou-se durante 30 minutos, e após completou-se o volume com peróxido de hidrogênio. Alíquota de 2,0 ml foi transferida para balão volumétrico âmbar de 25 ml e completou-se o volume com a fase móvel. Fez-se um branco. As amostras foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.), logo após a preparação e após 4 horas sob repouso.

B. Formas farmacêuticas

Para as três formulações avaliadas (Xb-ceto, Form1 e Form2) foram pesados, analiticamente, 5 g de xampu (equivalentes a 200 mg de cetoconazol) em balão volumétrico âmbar de 50 ml e a estes foram adicionados 30 ml de peróxido de hidrogênio 30 %. Agitou-se durante 30 minutos, e após completou-se o volume com peróxido de hidrogênio. Alíquotas de 2,0 ml foram transferidas para balão volumétrico âmbar de 25 ml e completou-se o volume com a fase móvel. Fez-se um

branco. As amostras foram avaliadas através de CLAE (item 4.5.2.1.), logo após a preparação.

4.8. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Para a identificação dos produtos de degradação foram empregadas duas técnicas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS).

4.8.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

4.8.1.1. Degradação das amostras

Alíquotas de 1,0 ml da solução metanólica de cetoconazol 2 % foram acondicionadas em cubetas de plástico descartáveis Plastibrand®. Fecharam-se as cubetas, com auxílio de Parafilm® e colocaram-se as amostras na câmara. O tempo de exposição à lâmpada UV-C foi de 30 horas.

4.8.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa

Os produtos de degradação formados, após exposição à luz, foram isolados através de cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa, para posterior realização de espectroscopia de RMN. Através de testes preliminares foram determinados os parâmetros ideais para o desenvolvimento do método por CLAE semipreparativa.

4.8.1.2.1. Equipamento

O isolamento dos produtos foi realizado em cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU LC-10AD, detector de UV-Vis SPD-10AV, central de controle SCL-10A, degaseificador DGU-14A.

4.8.1.2.2. Fase móvel

A fase móvel foi constituída de metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025, V/V/p). Após, a mistura foi degaseificada durante 12 minutos, em banho de ultrassom sob vácuo.

4.8.1.2.3. Condições cromatográficas

Os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- ✓ Fluxo: 2 ml/min
- ✓ Coluna: Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm)
- ✓ Comprimento de onda: 225 nm
- ✓ Volume de injeção: 200,0 µl
- ✓ Temperatura: 20 °C

4.8.1.3. Determinação da pureza

Com o objetivo de verificar a pureza dos dois produtos de degradação isolados, fez-se avaliação da pureza do pico das frações coletadas. Para tanto, foi utilizado cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU LC-10AD, detector

de arranjo de diodos SPD-M10A VP, central de controle SCL-10A, desgaseificador DGU-14A. A fase móvel e as condições cromatográficas utilizadas na determinação da pureza das amostras foram as mesmas descritas nos itens 4.5.2.1.3. e 4.5.2.1.4., respectivamente.

4.8.1.4. Concentração das frações

As frações foram levadas à secura em evaporador rotatório com temperatura inferior a 50 °C sob pressão reduzida. Primeiramente, aguardou-se a evaporação do metanol e após fez-se extração do produto de degradação, em funil de separação, com auxílio de clorofórmio. O produto de degradação, em maior concentração na fase orgânica, foi novamente colocado em evaporador rotatório para evaporação do solvente.

Após, as amostras foram colocadas em dessecador sob vácuo, protegidas da luz.

4.8.1.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

O espectro de RMN de ^1H do cetoconazol SQR foi obtido em espectrômetro BRUKER (200 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente. A análise foi feita no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. O espectro de ^{13}C do cetoconazol SQR foi obtido em espectrômetro VARIAN (300 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. A análise foi feita no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os dois produtos de degradação isolados foram enviados para *Faculté de Pharmacie, Université Picardie Jules Verne* (Amiens - França) onde foi realizada a

espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros dos produtos isolados (Fr1 e Fr2) foram obtidos em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.

4.8.2. Espectrometria de massas (MS)

Para obtenção dos espectros de massas de Fr1, Fr2 e cetoconazol foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

4.8.2.1. Degradação das amostras

Alíquotas de 1,0 ml da solução metanólica de cetoconazol 2 % foram acondicionadas em cubetas de plástico descartáveis Plastibrand®. Fecharam-se as cubetas, com auxílio de Parafilm® e colocaram-se as amostras na câmara. O tempo de exposição à lâmpada UV-C foi de 30 horas.

4.8.2.2. Equipamento e condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU LC-10AD VP, detector de UV SPD-10AV VP e desgaseificador DGU-14A. A fase móvel foi constituída de metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025, V/V/p). Após a mistura foi desgaseificada durante 12 minutos, em banho de ultra-som sob vácuo.

Os parâmetros utilizados foram os seguintes: fluxo: 2 ml/min, coluna: Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e comprimento de onda: 225 nm.

4.8.2.3. Condições da espectrometria de massas - ionização eletrospray

O sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray utilizado no estudo foi Micromass Quattro LC, acoplado ao sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

As condições otimizadas do detector MS foram as seguintes: fluxo de nitrogênio de 430 l/h, capilaridade e voltagem do cone foram de 3,2 kV e 30 V, respectivamente e as temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 80 e 200 °C, respectivamente. Foram traçados todos os espectros de massas para íons positivos, variando m/z de 50 a 700.

4.9. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA BIOLÓGICA

Visando a investigar o grau de irritação das formulações contendo os produtos de degradação, as amostras foram avaliadas através de teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*.

4.9.1. Avaliação da toxicidade aguda com efeito local

Os experimentos foram realizados em coelhos albinos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia com peso corpóreo de 2 a 2,5 kg. Antes de iniciar o teste, os animais foram examinados pelo veterinário responsável e selecionados. Os animais saudáveis foram escolhidos aleatoriamente, mantidos em gaiolas individuais identificadas, com fornecimento de ração e água, em sala a temperatura de 20 °C ± 2 °C e umidade relativa entre 30 e 70 %. Durante todo o período de execução do ensaio, desde a aplicação da amostra até a leitura, o animal foi tratado e manuseado adequadamente.

Os ensaios foram realizados em São Paulo, em laboratório conveniado com a Fundação Instituto de Pesquisas Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), sendo o laboratório habilitado para trabalhar com animais.

O procedimento, a seguir descrito, foi baseado no trabalho desenvolvido por DRAIZE e colaboradores (1944).

4.9.1.1. Teste de irritação ocular

Este método foi utilizado para avaliar as amostras de xampu (Xb-ceto) contendo os produtos de degradação. Para tanto avaliaram-se uma formulação com teor de 103,3 % (amostra não degradada) e uma formulação com teor de 41,4 % (amostra degradada após exposição à lâmpada UV-C).

Utilizaram-se cinco coelhos albinos para cada amostra e as amostras de xampu foram utilizadas sem diluição.

Para aplicação da amostra a pálpebra inferior do olho direito foi cuidadosamente tracionada, formando o saco conjuntival, onde, com auxílio de uma seringa, foi aplicado 0,1 ml do xampu. Em seguida as pálpebras foram mantidas unidas por 30 segundos, massageando-se o olho do animal para permitir o contato uniforme com o produto. O olho esquerdo serviu de controle.

Os efeitos causados à conjuntiva, córnea e íris foram observados depois de decorridas 24, 48, 72 horas e no final do sétimo dia, após aplicação do produto. As avaliações das reações oculares foram baseadas na escala de Draize, onde estão discriminadas as graduações atribuídas às reações oculares, como: hiperemia (superabundância de sangue), quemose (edema), secreção, irite e opacidade (Tabela 6) (DRAIZE *et al.*, 1944).

Após as leituras, o valor total de cada animal foi obtido e a média dos cinco coelhos, por período de leitura, foi calculada, resultando no índice de irritação

ocular. Para verificar o grau da irritação utilizou-se uma tabela de graduação (Tabela 7) (INCQS, 2002).

Tabela 6 – Graduação das reações observadas no teste de irritação ocular de acordo com a escala de Draize.

Córnea	
A. Opacidade - grau de densidade	
Sem opacidade	0
Área difusa ou disseminada da íris visíveis (perda do brilho)	1
Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	2
Área opalescente, nenhum detalhe da íris visível e tamanho da pupila pouco discernível	3
Opaca, íris invisível	4
B. Área da córnea envolvida	
Um quarto ou menos, mas não zero	1
Maior de um quarto e menor do que a metade	2
Maior que a metade e menor do que três quartos	3
Maior do que três quartos até a área total	4
Graduação TOTAL = (A x B) x 5	
C. Íris	
Normal	0
Dobras marcadamente profundas, congestão, inchaço, íris ainda reativa à luz	1
Não reação à luz, hemorragia, destruição grosseira	2
Graduação TOTAL = C x 5	
Conjuntiva	
D. Hiperemia	
Vasos normais	0
Vasos definitivamente injetados acima do normal	1
Vermelho intenso mais difuso e vasos não facilmente discerníveis	2
Vermelho escuro difuso	3
E. Quemose	
Ausência de edema	0
Algum edema acima do normal	1
Edema óbvio com eversão parcial das pálpebras	2
Edema com pálpebras pouco fechadas	3
Edema com pálpebras mais que metade fechadas	4
F. Secreção	
Ausência de secreção	0
Alguma secreção	1
Secreção com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes a estas	2
Secreção com umedecimento das pálpebras, pêlos e área considerável ao redor do olho	3
Graduação TOTAL = (D + E + F) x 2	

Fonte: DRAIZE *et al.*, 1944.

Tabela 7 – Tabela de graduação da classificação do produto após teste de irritação ocular.

Classe	Índice de irritação ocular	Classificação	Observações
I	0 – 14,9	não irritante	M24h<2,4 = Classe I; se M24h>2,4 ir p/ Classe II
II	15 – 24,9	irritante leve	1)M48h<2,4=Classe II, se M48h>2,4 ir p/ item 2 2)M72h<2,4=Classe II, se M72h>2,4 ir p/ Classe III
III	25 – 49,9	irritante moderado	1)M7d<20 ir p/ item 2, se M7d>20 ir p/ Classe IV 2)L7d<10 em pelo menos 3 animais = Classe III, se L7d>30 em pelo menos 1 animal = Classe IV
IV	50 – 79,9	irritante severo	1)M7d<40 ir p/ item 2, se M7d>40 ir p/ Classe V 2)L7d<30 em pelo menos 3 animais = Classe IV, se L7d >80 em pelo menos 1 animal = Classe V
V	80 - 110	irritante máximo	1)M7d>40 ir p/ item 2 2)L7d>60 em pelo menos 1 animal = Classe V

L: leitura de cada coelho

M: média das leituras

Fonte: INCQS, 2002

4.9.2. Avaliação *in vitro*

As avaliações *in vitro* foram feitas através de análise da citotoxicidade ou reatividade biológica em culturas celulares. O método utilizado foi difusão em ágar (USP 28, 2005).

4.9.2.1. Avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*

Avaliaram-se duas amostras de xampu de cetoconazol: Xb-ceto com teor de 103,3 % (amostra não degradada) e Xb-ceto com teor de 41,4 % (amostra degradada após exposição à lâmpada UV-C). As amostras foram avaliadas sem diluição.

Os ensaios foram realizados na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em capela de fluxo laminar vertical, alojada em sala limpa, com

sistema de filtro absoluto e pressão positiva. Todo trabalho foi desenvolvido empregando material esterilizado e técnicas assépticas.

4.9.2.1.1. Culturas celulares

Foi utilizada a seguinte linhagem celular: NCTC Clone 929, célula de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1). A linhagem foi cultivada em meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 10 % de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM com 10 % SFB).

A manutenção da linhagem foi feita a 36 °C, em garrafa de 250 ml e repiques com intervalos médios de 72 horas. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,2 % e versene 0,02 % (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas no meio de cultura e distribuídas, na garrafa destinada à manutenção e nas placas de Petri que foram utilizadas para a realização dos ensaios.

4.9.2.1.2. Método de difusão em ágar

As células foram semeadas em volumes de 5 ml em placas de Petri (60 x 15 mm), na concentração de 3×10^5 céls/ml. A incubação foi realizada por 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após este período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 5 ml de *overlay*, em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (BBL-Becton Dickinson) a 1,8 % contendo 0,01 % de vermelho neutro (Merck), como corante vital. No momento do uso o ágar foi fundido e misturado com o MEM, ambos à temperatura de 44 ± 1 °C. Discos de 0,5 cm de diâmetro, de papel de filtro atóxico, foram embebidos na

amostra e posicionados sobre a camada de ágar, antes da solidificação completa. As placas foram incubadas novamente em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂ por 24 horas.

Foram utilizados fragmentos de látex como controle positivo e discos de papel atóxico como controle negativo. Para a determinação de cada amostra utilizaram-se quatro placas.

As placas foram observadas macroscópica e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de halo claro ao redor da amostra testada. Fez-se a determinação do tamanho do halo formado, com auxílio de paquímetro. A média das leituras das quatro placas foi calculada.

A partir das medidas dos halos formados, os índices de zona (IZ) foram graduados segundo a USP 28 (2005) (Tabela 8).

Tabela 8 – Índice de zona e descrição da reatividade para a avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro* – método de difusão em ágar.

Índice de zona (IZ)	Descrição da reatividade	Classificação
0	ausência de efeito sob a amostra	nenhuma
1	alteração ou degeneração celular sob a amostra	fraca
2	halo claro somente sob a amostra	leve
3	halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra	moderada
4	halo claro maior que 1,0 cm	severa

Fonte: USP 28, (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MATÉRIA-PRIMA

As matérias-primas e a SQR utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, foram armazenadas em recipientes ao abrigo da luz. A manipulação das mesmas sempre foi realizada em ambiente escuro.

5.1.1. Análise qualitativa da matéria-prima

5.1.1.1. Características organolépticas

As duas amostras de cetoconazol foram comparadas com a substância química de referência. Ambas apresentaram-se como pó branco.

5.1.1.2. Determinação do ponto de fusão

Determinou-se o ponto de fusão de Ceto1 e Ceto2, e após fez-se a comparação com os dados da literatura.

Para a determinação do ponto de fusão, o equipamento, METTLER TOLEDO modelo FP90, utiliza três capilares contendo as amostras. Estes são aquecidos com faixa de aquecimento definida enquanto os capilares são iluminados, por uma lâmpada, via um tubo de luz. Três fotossensores medem continuamente a intensidade da luz transmitida através das amostras. Os sensores ficam situados na parede exterior e transformam a luz transmitida em um sinal elétrico proporcional.

Os valores encontrados para as matérias-primas e a especificação farmacopéica encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 -Valores obtidos na determinação do ponto de fusão de Ceto1 e Ceto2, através do equipamento METTLER TOLEDO modelo FP90 .

Especificação Farmacopéica (°C) (USP 28)	Ponto de Fusão (°C) Ceto1	Ponto de Fusão (°C) Ceto2
	150,0	151,4
148-152	150,1	151,5
	150,2	151,3
<i>Média</i>	150,1	151,4
<i>DPR</i>	0,1	0,1

5.1.1.3. Rotação específica

A atividade óptica é função da estrutura química da substância e de sua concentração. A determinação do poder rotatório serve para estabelecer tanto a identidade quanto a pureza da substância (F. Bras IV, 1988).

O poder rotatório específico $[\alpha]_{20}^D$ de uma substância sólida é o ângulo de rotação, medido no comprimento de onda da raia D de sódio, $\lambda = 589,3$ nm, à temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, calculado em função de uma camada de 1 dm de espessura de uma solução que contém a substância.

Os valores encontrados para Ceto1 e Ceto2 foram de $-0,090^\circ$ e $0,156^\circ$, respectivamente. Sendo assim os resultados estão de acordo com o preconizado pela USP 28 (2005) que indica valores entre -1° e $+1^\circ$.

5.1.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (COLLINS *et al.*, 1997). Para o cetoconazol, o eluente escolhido, preconizado na USP 28 (2005), foi constituído de n-hexano, acetato de etila, metanol, água e ácido acético glacial (42:40:15:2:1 V/V/V/V/V).

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram secas e reveladas. As manchas nas placas (extinção de fluorescência) foram visualizadas através de luz ultravioleta (254 nm), pois o adsorvente da placa estava impregnado com reagentes fluorescentes. Além disso, as placas foram expostas a vapores de iodo em recipiente fechado, onde os compostos orgânicos se tornaram visíveis (manchas marrons).

O resultado obtido demonstrou similaridade das manchas entre amostra e SQR. O valor de Rf encontrado para *Solução teste 1 e 2*, *Solução padrão* e *Solução padrão diluída* foi de 0,33. Nenhuma mancha secundária foi observada.

5.1.1.5. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

A radiação no infravermelho corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. Embora o espectro no infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos que permite, através de simples exame do espectro e consulta a tabelas, a identificação de estruturas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

As matérias-primas e a SQR apresentaram as mesmas bandas de absorção na região do infravermelho, como pode ser observado na Tabela 10, com suas devidas atribuições. O espectro na região do infravermelho para o cetoconazol SQR, Ceto1 e Ceto2 encontram-se representados nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

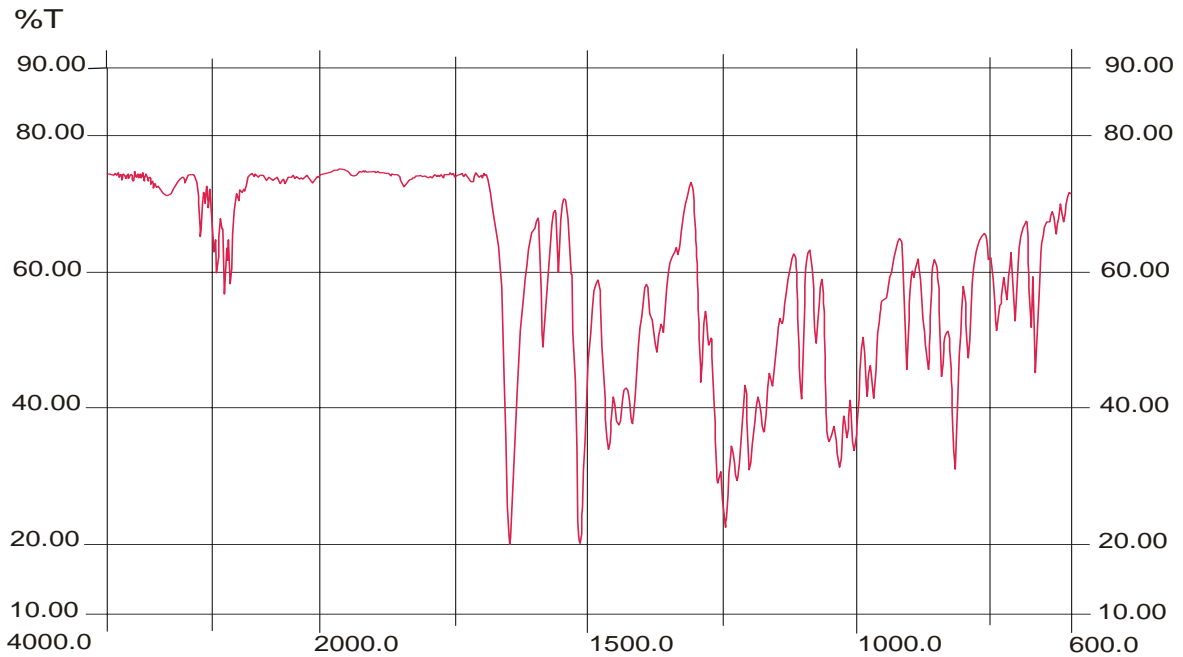


Figura 2 - Espectro na região do infravermelho do cetoconazol SQR.

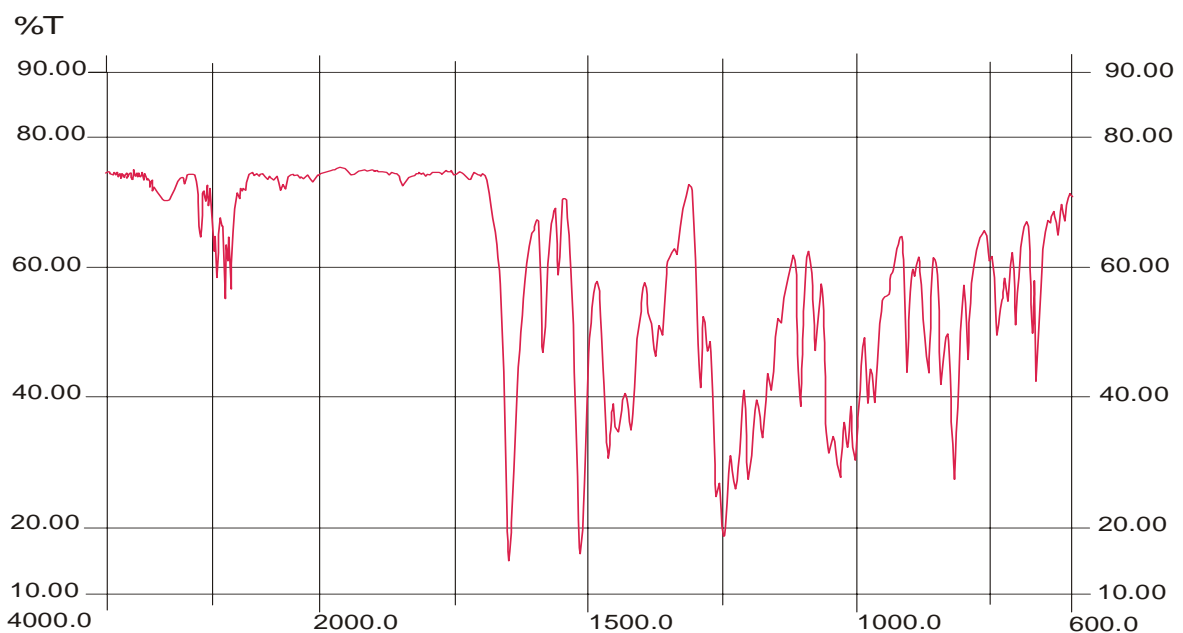


Figura 3 - Espectro na região do infravermelho da matéria-prima denominada Ceto1.

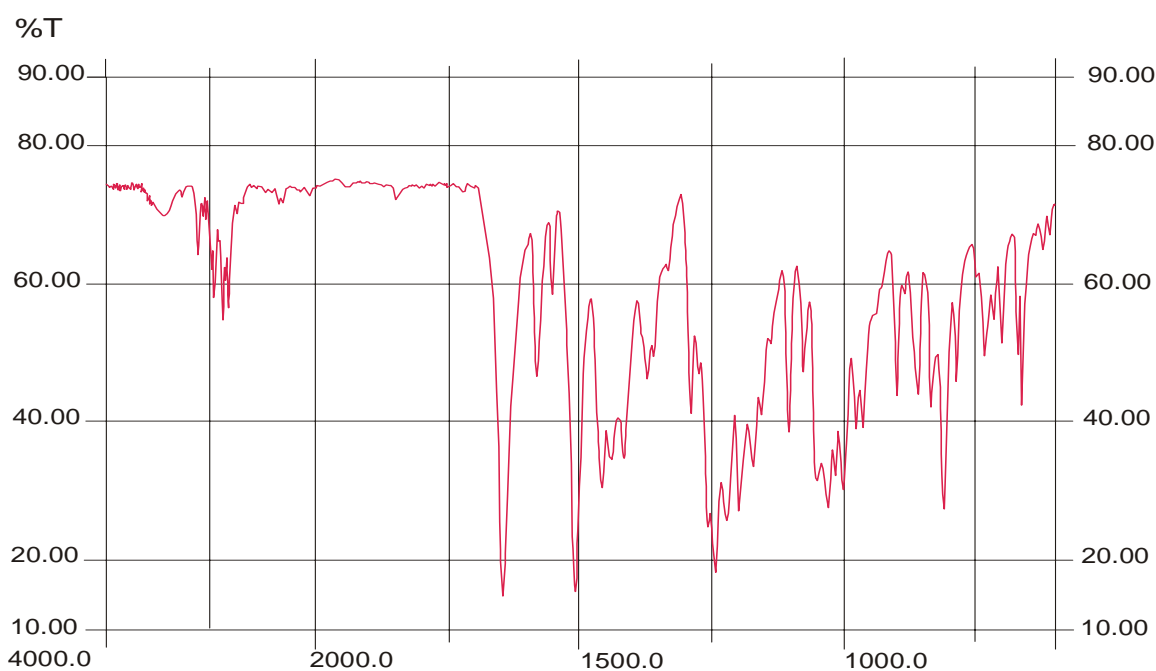


Figura 4 - Espectro na região do infravermelho da matéria-prima denominada Ceto2.

Tabela 10 – Frequências de absorção das principais bandas do cetoconazol e suas respectivas atribuições, na região do infravermelho.

Banda (cm ⁻¹)	Atribuições
3119,3	Deformação axial do C-H do anel aromático
2883,9 e 2831,8	Deformação axial do C-H de grupamentos metila e metileno
1647,4	Deformação axial do C=O de grupamento amida
1512,4	Deformação axial do C=C do anel aromático
1458,4	Deformação angular do C-H de grupamentos metila e metileno
1259,7	Deformação axial de C-N do anel imidazólico
1244,2	Deformação axial de C-O-C de grupamento éter
1051,3	Deformação axial de C-Cl do anel aromático
814,1 e 673,2	Deformação angular fora do plano de C-H de anel aromático

5.1.1.6. Espectrofotometria na região do ultravioleta

Após a obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta para SQR (Figura 5), Ceto1 (Figura 6) e Ceto2 (Figura 7), pôde-se observar que as matérias-primas apresentaram os máximos de absorção nos mesmos comprimentos de onda que a SQR. Além disso os espectros obtidos apresentaram o mesmo perfil de absorção.

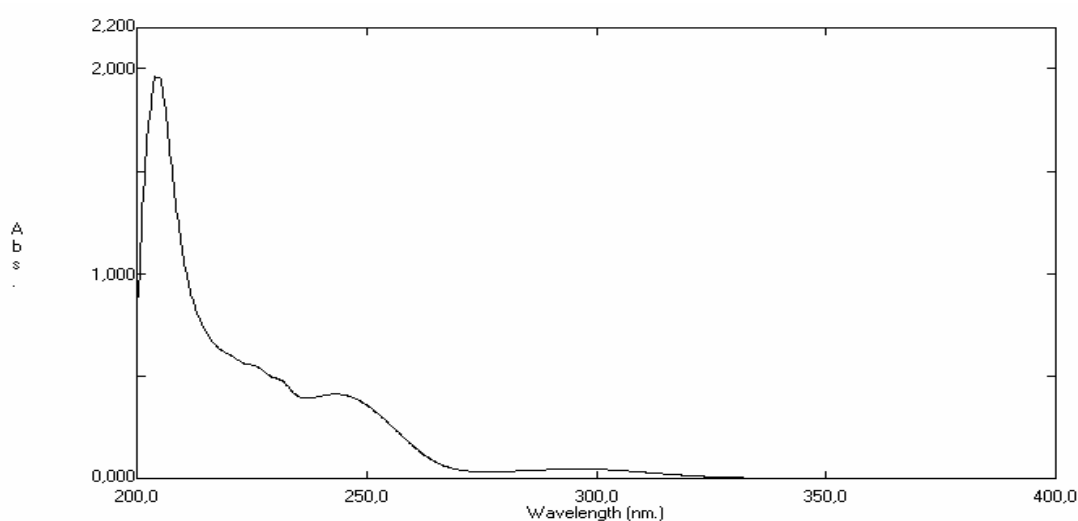


Figura 5 – Espectro de absorção na região do ultravioleta para SQR, utilizando equipamento SHIMADZU UV-1601 PC e cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

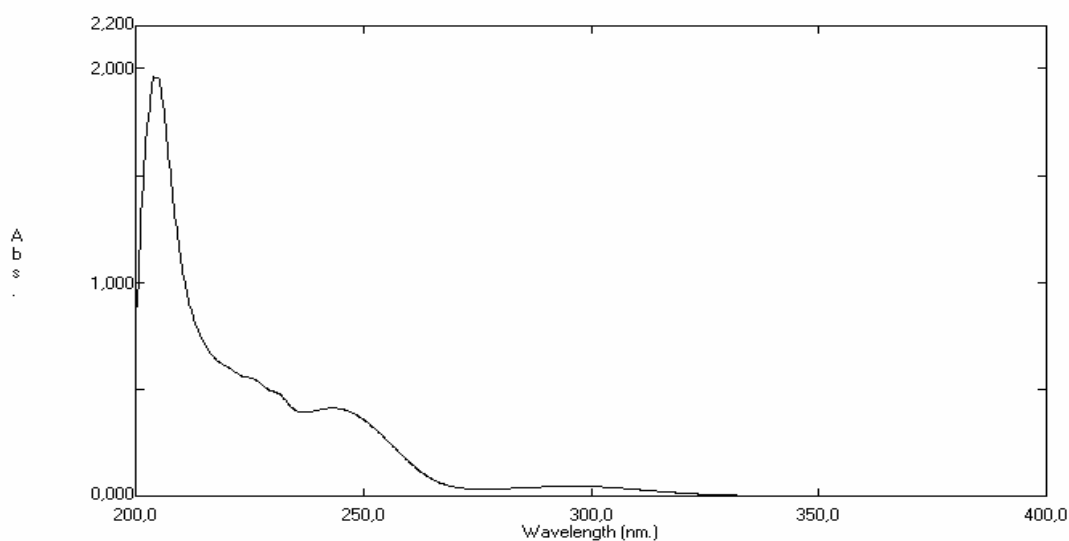


Figura 6 – Espectro de absorção na região do ultravioleta para Ceto1, utilizando equipamento SHIMADZU UV-1601 PC e cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

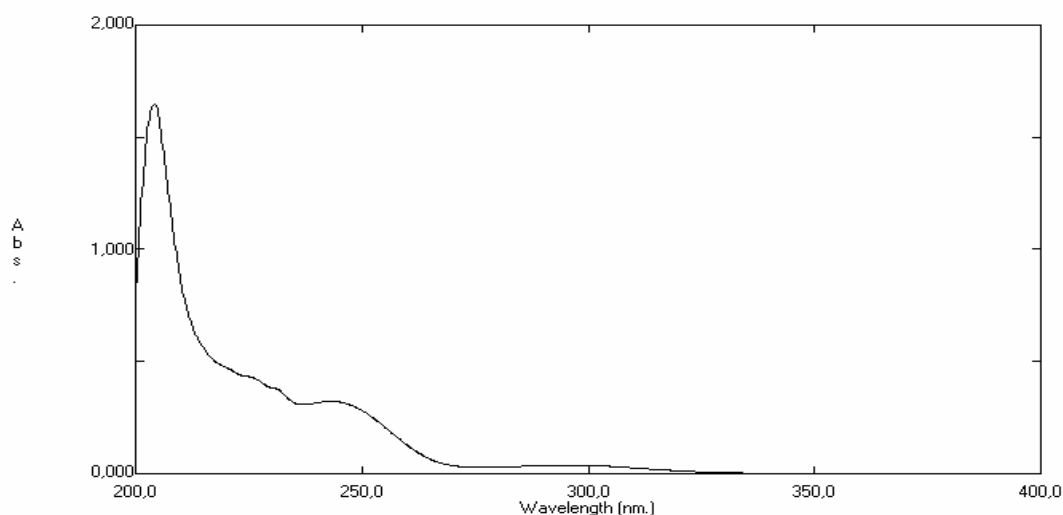


Figura 7 – Espectro de absorção na região do ultravioleta para Ceto2, utilizando equipamento SHIMADZU UV-1601 PC e cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

5.1.1.7. Perda por dessecação

Os valores de umidade encontrados foram de 0,008 % para Ceto1 e 0 % para Ceto2. Os valores encontram-se dentro da faixa especificada pela USP 28 (2005) que deve ser inferior a 0,5 % de umidade.

5.1.2. Análise quantitativa

5.1.2.1. Volumetria em meio não-aquoso (VMNA)

Ceto1 e Ceto2 foram quantificados por volumetria em meio não-aquoso, segundo USP 28 (2005). Foram feitas três determinações de cada matéria-prima. Na Tabela 11 encontram-se os teores e a especificação farmacopéica.

Tabela 11 – Valores obtidos na determinação do teor de Ceto1 e Ceto2 através de método de VMNA descrito no item 4.3.2.1.

Especificação Farmacopéica (%) (USP 28)	Teor (%) Ceto1	Teor (%) Ceto2
	99,9	101,1
98,0-102,0	99,9	99,0
	100,1	99,7
<i>Média</i>	100,0	99,9
<i>DPR</i>	0,1	1,1

Após as análises qualitativas e quantitativas das matérias-primas (Ceto1 e 2) concluiu-se que as mesmas encontravam-se de acordo com as especificações farmacopéicas (USP 28, 2005).

A matéria-prima denominada Ceto1 foi utilizada para o preparo da formulação (Xb-ceto) que foi utilizada para o desenvolvimento e validação dos dois métodos de análise quantitativa: cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico. A matéria-prima Ceto2 foi empregada nos estudos de estabilidade do fármaco e avaliação da segurança biológica do xampu de cetoconazol.

5.2. FORMAS FARMACÊUTICAS

5.2.1. Xampu de cetoconazol 2 % preparado no laboratório (Xb-Ceto)

Segundo THOMA e KÜBLER (1997), os excipientes podem influenciar fortemente a fotoestabilidade de substâncias, portanto a escolha da formulação de Xb-ceto foi feita tentando utilizar o menor número de excipientes possíveis, para diminuir a possível interferência dos mesmos. Adicionou-se à formulação os excipientes necessários para o desenvolvimento do xampu.

Como tensoativo para o Xb-ceto, optou-se pelo lauril éter sulfato de sódio (Figura 8) que é um tensoativo aniônico. Os mecanismos físico-químicos que caracterizam a detergência são (WOLF *et al.*, 2001):

- ✓ diminuição da força de ligação entre a queratina e as sujidades através da diminuição da tensão superficial, de modo a facilitar a remoção das partículas,
- ✓ transferência da oleosidade para o veículo aquoso,
- ✓ dispersão/suspensão do óleo e das partículas de sujidades na espuma.

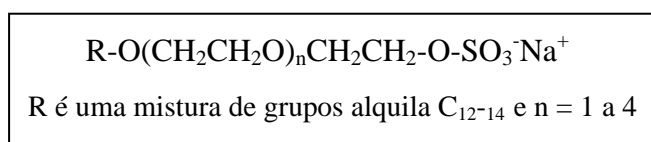


Figura 8 - Estrutura química do lauril éter sulfato de sódio

Como agente estabilizador de espuma foi empregada a dietanolamida de ácido graxo de coco. Algumas vezes estes compostos também contribuem para aumentar a viscosidade do produto final. Para a preparação de xampus é comum a adição de estabilizadores de espuma, pois é freqüente a associação da detergência ao poder de espuma, entretanto estas propriedades nem sempre são concomitantes, já que existem tensoativos eficazes na detergência e que possuem fraco poder de espuma (BOUILLON, 1996).

A viscosidade do Xb-ceto 2 % foi aumentada através da adição de cloreto de sódio, que teve como consequência um aumento na resistência ao movimento. Adicionou-se, também, à formulação, metilparabeno que é um conservante da classe dos hidroxibenzoatos. Sua estrutura química está representada na Figura 9.

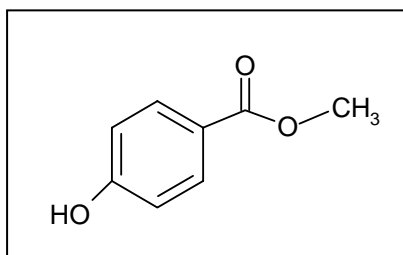


Figura 9 - Estrutura química do metilparabeno

O controle apropriado do pH desempenha papel fundamental na obtenção de formulações farmacêuticas eficazes e com as características mais adequadas para os fins a que se destinam (PRISTA *et al.*, 1995). Na realidade, o valor apropriado de pH é importante, pois este pode alterar a solubilidade e a estabilidade do fármaco na formulação, causar irritação ao paciente e, ainda, pode alterar o efeito terapêutico.

Em geral, o pH ideal para os xampus está na faixa de 5,5 a 6,5, sendo que desta forma não ocorre irritação ao usuário (FERREIRA, 2002). Considerando que o cetoconazol é solúvel em meio ácido, optou-se pela solubilização do fármaco em HCl *M* e após ajuste do pH final com NaOH *M* para 5,5. Utilizou-se o HCl, pois em trabalhos anteriores (STAUB *et al.*, 2002) verificou-se a baixa solubilidade do cetoconazol em soluções diluídas de ácido cítrico pela formação de precipitado no fundo do frasco. Com HCl, o fármaco permaneceu solúvel, isto é, não se observou precipitado no fundo do frasco. Entretanto, todas as formulações avaliadas, em HCl ou ácido cítrico, desenvolveram coloração avermelhada.

A água, responsável pela diluição do tensoativo, é uma matéria-prima utilizada em alta concentração nas formulações de xampu. Para o Xb-ceto, as qualidades da mesma foram asseguradas.

5.2.2. Xampu comercial de cetoconazol 2% (Form1 e Form2)

As formulações comerciais são muito mais complexas que o xampu preparado no laboratório, por possuírem vários excipientes. A Form1 utiliza como tensoativos o lauril poliglicol-éter sulfosuccinato sódico e o sulfato sódico de lauril poliglicol-éter.

Foram utilizadas as alcanolamidas de ácidos graxos (dietanolamida de ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oléico) como função de formadores de espuma. Laurdimônio de colágeno hidrolisado foi utilizado para obtenção de um cabelo mais suave e macio, pois apresenta propriedades condicionantes. Dioleato de macrogol-120 metil glicose apresenta propriedades espessantes. Como conservante foi utilizada a imiduréia.

O HCl foi utilizado como agente de solubilização do cetoconazol e, provavelmente, a eritrosina sódica, empregada como corante, tenha sido adicionada devido à modificação de cor que o produto sofre com o passar do tempo.

A Form2 contém, como tensoativos, lauril éter sulfato de sódio e lauril éter sulfosuccinato de sódio. A dietanolamina de ácido graxo de coco foi empregada, pois é agente estabilizador da espuma. Como conservante foi utilizada a imidazolidinil uréia.

Para solubilização do fármaco e ajuste do pH foram utilizados HCl e NaOH, respectivamente. O cloreto de sódio e o trioleato de metil glicose foram empregados como agentes espessantes. Provavelmente o corante vermelho Ponceaux 4R foi adicionado, pois o produto adquire coloração avermelhada.

5.2.3. Solução metanólica 2 % (Sol-ceto)

Com o objetivo de avaliar o fármaco sem a interferência dos excipientes do xampu, preparou-se uma solução metanólica de cetoconazol a 2 %. Utilizou-se a mesma concentração da substância ativa que é utilizada para o xampu, pois segundo TONNESEN (2001) a concentração do fármaco influencia o processo de fotodegradação.

5.3. ANÁLISE DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

5.3.1. Análise qualitativa

5.3.1.1. Características organolépticas

A amostra de xampu (Xb-ceto) adquiriu coloração avermelhada 1 dia após a preparação da mesma. A solução (Sol-ceto) levou mais tempo para adquirir coloração avermelhada (duas semanas). É importante salientar que as amostras utilizadas para a validação dos métodos foram armazenadas protegidas da luz. Para as amostras comerciais (Form1 e Form2), não foi possível fazer a análise quanto à formação de cor devido à presença de corante.

O Xb-ceto e a Sol-ceto não apresentaram odor forte. As amostras comerciais continham fragrâncias.

5.3.1.2. Determinação da densidade

A determinação da densidade relativa das formulações de xampu foi realizada logo após a preparação do Xb-ceto e no momento da aquisição das formulações comerciais. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores da determinação da densidade de Xb-ceto, Form1 e Form2.

Amostra	Densidade relativa
Xb-ceto	1,028
Form1	1,062
Form2	1,030

É importante salientar que a concentração do cetoconazol no Xb-ceto foi expressa em g/ml. Portanto, para a determinação do teor do fármaco no xampu, através dos métodos desenvolvidos e validados, a pesagem da amostra era realizada, sendo necessária a correção da massa. Para as formulações comerciais a concentração foi expressa em g/g.

5.3.1.3. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada logo após a aquisição das formulações comerciais. Para a Form1 o valor encontrado foi de 6,58 e para a Form2 foi de 6,72. Para a amostra Xb-ceto o pH de 5,5 foi ajustado no momento da preparação da formulação.

5.3.1.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A extração com solvente é uma técnica muito utilizada para separar um composto orgânico de soluções ou suspensões aquosas onde se encontra.

A extração do cetoconazol do xampu fundamentou-se no fato de que o fármaco é solúvel em solvente orgânico e pouco solúvel em água. Após a adição do

diclorometano e agitação ocorreu a formação de duas fases, sendo que a substância passou em maior parte da fase aquosa para o solvente.

Optou-se pela extração com três porções de solvente, apesar de K (coeficiente de partição) ser grande, uma porção significativa do soluto ficaria presente em ambas as fases após uma extração simples. Sendo assim, fez-se a extração do soluto com três porções de diclorometano; desta forma a extração foi praticamente total.

Para as amostras de cetoconazol extraídas do xampu, optou-se pelo mesmo eluente escolhido para a matéria-prima (item 4.3.1.4.), pois, após várias tentativas, o melhor resultado foi encontrado com o mesmo.

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas foram secas e reveladas. Da mesma forma que para a matéria-prima, as manchas nas placas foram visualizadas através de luz ultravioleta (254 nm) e expostas a vapores de iodo em recipiente fechado.

O resultado obtido (Figura 10) demonstra a similaridade das manchas entre amostras e padrão. O valor de Rf encontrado foi de 0,33. Observou-se uma mancha secundária na amostra Xb-ceto com Rf de 0,75, sendo a mancha atribuída ao conservante -metilparabeno- constituinte da formulação, uma vez que foi feito um branco (formulação sem o cetoconazol) e observou-se a presença da mancha. Para as outras amostras não foram observadas manchas secundárias.

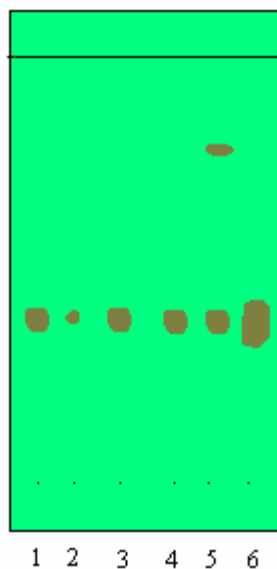


Figura 10 – Representação do cromatograma em camada delgada, utilizando n-hexano, acetato de etila, metanol, água e ácido acético (42:40:15:2:1 V/V/V/V/V) como eluente. Valor de Rf do cetoconazol de 0,33. *Solução padrão* (1), *Solução padrão diluída* (2), *Form1* (3), *Form2* (4), *Xb-ceto* (5) e *Sol-ceto* (6)

5.3.2. Análise quantitativa

Não existem metodologias oficiais para o doseamento de cetoconazol em xampu. Para o desenvolvimento deste trabalho, foi necessário o desenvolvimento e a validação de métodos que tornassem possível a determinação do teor do fármaco nas formulações, para posterior estudo da estabilidade do mesmo. Para tanto, dois métodos foram desenvolvidos e validados: a cromatografia líquida de alta eficiência e o ensaio microbiológico.

5.3.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica frequentemente empregada na quantificação de fármacos em formulações farmacêuticas (WATSON, 1999).

As condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento e validação do método por CLAE foram adaptadas de trabalhos descritos na literatura. Algumas modificações foram realizadas com o objetivo de otimizar a quantificação do fármaco na forma farmacêutica xampu. A proposta foi desenvolver um método rápido e sensível, validando os parâmetros que dão confiabilidade ao mesmo.

Para a análise de muitos fármacos empregam-se detectores UV/Vis, fornecendo assim um método de análise exato, preciso e robusto. A cromatografia juntamente com a detecção UV/Vis é capaz de monitorar a estabilidade de fármacos e formulações, detectando produtos de degradação. Portanto, o método foi escolhido para determinar o teor do cetoconazol durante o estudo de estabilidade, assim como a detecção de produtos de degradação formados.

Segundo a USP 28 (2005) para a quantificação do fármaco em suspensão oral e comprimidos, os comprimentos de onda empregados são 223 e 225 nm, respectivamente. Optou-se em desenvolver o método em λ de 225 nm, onde o fármaco apresenta uma boa absorção.

A partir dos dados relatados na literatura, foram experimentalmente testadas diferentes composições de fases móveis, variando-se, basicamente, a proporção da fase orgânica. Sendo assim, optou-se pela seguinte fase móvel: monoisopropilamina-metanol 2:500 / acetato de amônio-água 1:200 (7:3).

O acetato de amônio foi utilizado, pois melhorou os parâmetros cromatográficos do pico relativo ao cetoconazol. O íon amônio comporta-se como ácido fraco e a dissolução de seus sais resulta em soluções ácidas ou neutras (DISCHER, 1966).

A monoisopropilamina foi adicionada à fase móvel com o objetivo de reduzir a assimetria do pico. Segundo WATSON (1999), a amina fica adsorvida aos grupamentos silanóis livres presentes nas colunas de fase reversa, impedindo que as substâncias com características básicas interajam com estes grupamentos, aumentando a cauda do pico.

Considerando que a coluna empregada (LiChrospher® 100 RP-8, 5 µm (150 mm x 4,6 mm)) é à base de sílica, optou-se por acidificar a fase móvel, devido à presença da monoisopropilamina que eleva o pH, pois essas colunas não suportam pHs muito alcalinos. Sendo assim, o pH final da solução foi ajustado para 5,5 com ácido acético.

O cetoconazol é uma base fraca e apresenta dois valores de pKa. A molécula (Figura 11) possui quatro nitrogênios na estrutura, sendo que somente dois apresentam caráter ácido-base. Os nitrogênios “B” e “D” são neutros, pois os pares de elétrons contribuem para a aromaticidade do anel imidazólico e ressonância com o grupo carbonila adjacente, respectivamente. Provavelmente o nitrogênio “A” do anel imidazólico seja o nitrogênio mais básico da molécula, apresentando o maior valor de pKa (6,5). O nitrogênio “C”, conjugado com o anel aromático, apresenta o valor de pKa menor (2,9), pois o par de elétrons está em ressonância, levando a uma diminuição da sua disponibilidade para protonação (CURRIE *et al.*, 1996).

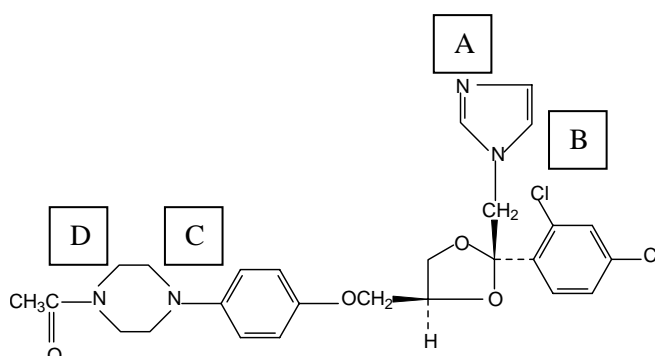


Figura 11 – Estrutura do cetoconazol.

Utilizando a equação 7 (WATSON, 1999) pode-se dizer que no pH de 5,5, considerando o pKa de 6,5, cerca de 90 % do fármaco estará ionizado. Sendo assim, nesse pH ocorre uma diminuição no tempo de retenção e na assimetria do pico, pois a molécula estando ionizada apresenta maior afinidade pela fase móvel que é polar.

$$\text{Base: \% ionizada} = \frac{10^{\text{pKa} - \text{pH}}}{1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}} \times 100$$

Equação 7

As Figuras 12, 13, 14 e 15 apresentam os cromatogramas do cetoconazol SQR, Xb-ceto, Form1 e Form2, respectivamente. Os parâmetros cromatográficos relativos ao pico do fármaco foram os seguintes: tempo de retenção de 4,1 minutos, fator de capacidade de 25,8, resolução de 3,19, fator de cauda de 1,38 e número de pratos teóricos de 1800. Para a amostra de Xb-ceto o pico com tempo de retenção de 1,8 minutos é relativo ao conservante – metilparabeno – presente na formulação. No cromatograma da Form1 também aparece pico no tempo de retenção de 1,8 minutos que foi atribuído a um dos constituintes da formulação.

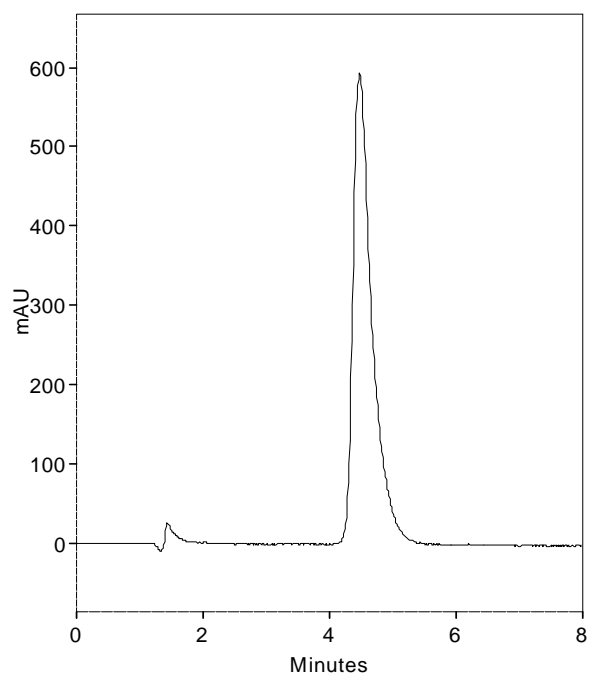


Figura 12 – Cromatograma do cetoconazol SQR (300 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

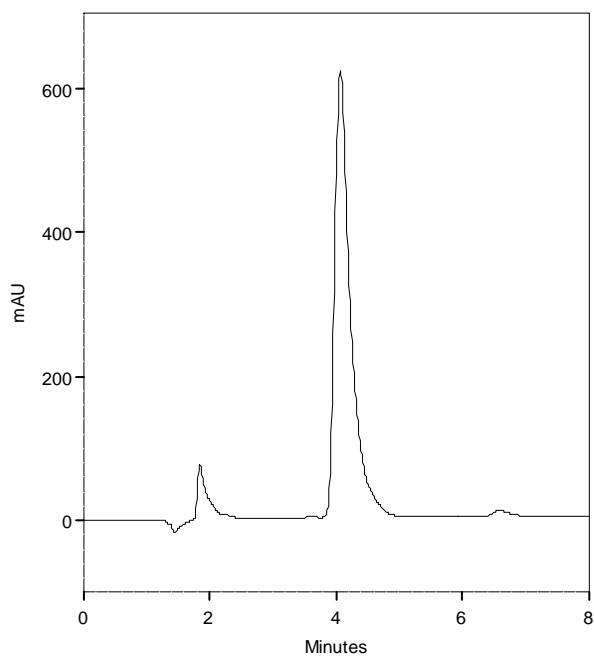


Figura 13 - Cromatograma da amostra Xb-ceto (320 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

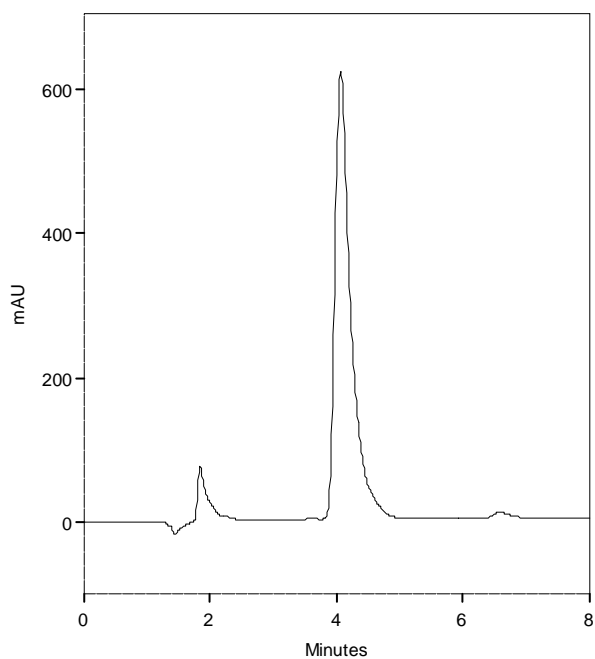


Figura 14 - Cromatograma da amostra Form1 (320 $\mu\text{g/ml}$), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

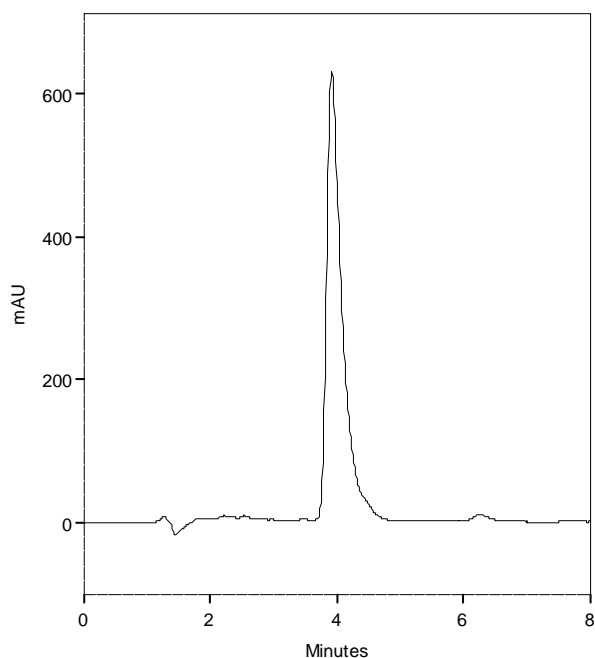


Figura 15 - Cromatograma da amostra Form2 (320 $\mu\text{g/ml}$), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

5.3.2.1.1. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise. A linearidade pode ser determinada através da elaboração de curvas padrão com no mínimo cinco níveis de concentração (ICH, 1996b).

Na Tabela 13 estão apresentados os valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 13 - Valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão do cetoconazol por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Concentração SQR ($\mu\text{g/ml}$)	Dia 1*	Dia 2*	Dia 3*	Média	DPR
60,0	3605365	3490946	3566009	3554107	1,6
120,0	7095180	6914808	6936409	6982132	1,4
240,0	13754679	13729973	13816348	13767000	0,3
360,0	20659315	20930560	20603896	20731257	0,8
480,0	27409143	27319381	27139266	27289263	0,5

*cada valor representa a média de três injeções

A Figura 16 indica a representação gráfica da curva padrão com a sua respectiva equação da reta, obtida por regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

A Tabela 39 (Anexo 1) apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores das áreas encontradas na obtenção da curva padrão por cromatografia líquida de alta eficiência.

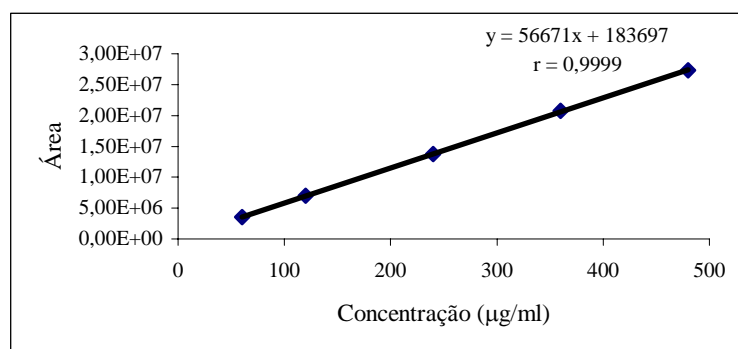


Figura 16 - Representação gráfica da média das três curvas padrão de cetoconazol e sua respectiva equação da reta, obtidas por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

5.3.2.1.2. Precisão

A precisão do método analítico representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma amostra homogênea (ICH, 1996b).

Os valores experimentais encontrados na determinação das amostras Xb-ceto, Form1 e Form2 pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência estão apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16, respectivamente.

Tabela 14 – Valores experimentais obtidos na determinação de cetoconazol em xampu (Xb-Ceto) por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Dias	Teor (mg/ml)*	Teor (%)*	Média (%)	DPR
1	20,1; 19,9	100,4; 99,3	100,6	0,8
	20,3; 20,0	101,5; 100,1		
	20,3; 20,1	101,3; 100,7		
2	20,5; 20,6	102,6; 102,8	102,6	1,0
	20,6; 20,7	102,9; 103,3		
	20,1; 20,7	100,6; 103,3		
3	20,6; 20,9	103,0; 104,6	104,7	0,9
	20,9; 21,1	104,5; 105,3		
	21,1; 21,1	105,3; 105,4		
<i>Média entre dias</i>			102,6	
<i>DPR entre dias</i>				0,4

*cada valor representa a média de três injeções

Tabela 15 – Valores experimentais obtidos na determinação de cetoconazol em xampu (Form1) por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Dias	Teor (mg/ml)*	Teor (%)*	Média (%)	DPR
1	19,8; 20,1	99,1; 100,3	100,1	0,5
	20,1; 20,1	100,7; 100,5		
	20,0; 20,0	100,1; 100,0		
2	19,3; 19,6	96,3; 97,9	97,5	0,6
	19,5; 19,5	97,7; 97,6		
	19,6; 19,6	97,9; 97,8		
3	20,0; 20,1	100,2; 100,5	99,9	0,5
	19,9; 19,9	99,3; 99,6		
	20,0; 19,9	100,2; 99,5		
<i>Média entre dias</i>			99,2	
<i>DPR entre dias</i>				0,3

* cada valor representa a média de três injeções

Tabela 16 – Valores experimentais obtidos na determinação de cetoconazol em xampu (Form2) por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Dias	Teor (mg/ml)*	Teor (%)*	Média (%)	DPR
1	20,4; 20,4	101,8; 102,0	101,4	1,0
	20,0; 20,3	99,8; 101,7		
	20,1; 20,5	100,6; 102,5		
2	20,0; 20,1	100,2; 100,6	100,5	0,5
	20,1; 20,0	100,5; 99,8		
	20,3; 20,1	101,4; 100,4		
3	20,3; 20,5	101,7; 102,5	101,3	0,7
	20,2; 20,1	100,8; 100,6		
	20,2; 20,2	101,0; 101,2		
<i>Média entre dias</i>			101,1	
<i>DPR entre dias</i>				0,5

* cada valor representa a média de três injeções

5.3.2.1.3. Especificidade

A especificidade de um método é definida como a habilidade de avaliar de forma inequívoca a substância de interesse na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação numa mistura complexa. Após a análise do cromatograma do Xb (item 4.4.1.1.) verificou-se que os excipientes não interferem no pico relativo ao cetoconazol, pois o tempo de retenção dos excipientes foi de 1,8 minutos (Figura 17).

A especificidade de um método analítico dentre outras formas, pode ser avaliada através da determinação da pureza do pico cromatográfico, utilizando detector de arranjo de diodos (ANVISA, 2003), o qual mostra gráfica e numericamente, a similaridade do espectro do pico da substância de interesse. Sendo assim, a pureza do pico do cetoconazol em Form1 e Form2 foi determinada através da pureza total do pico (Figuras 18 e 19).

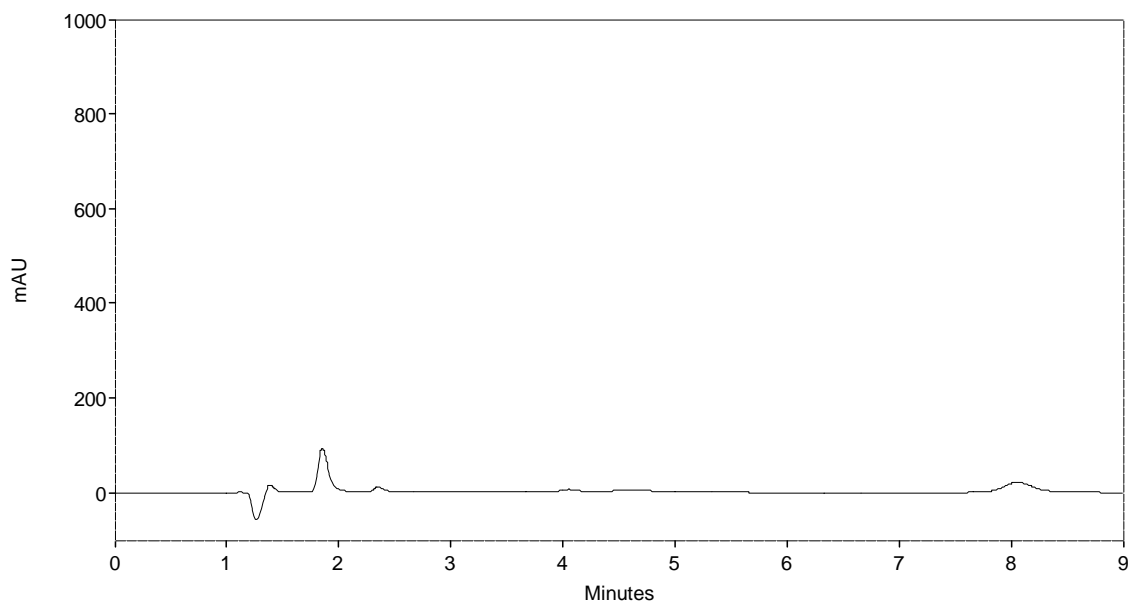


Figura 17 - Cromatograma do placebo (Xb), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

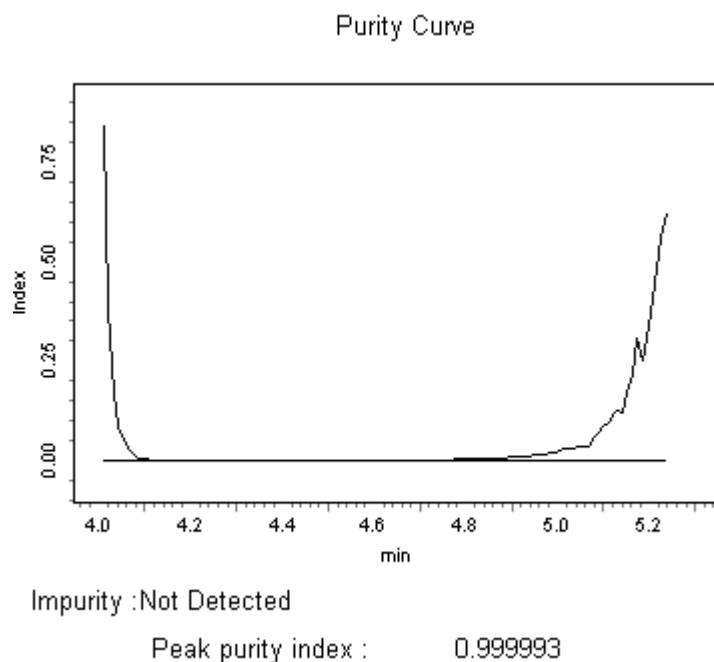


Figura 18 - Curva de pureza apresentada para Form1, indicando a pureza total do pico do cetoconazol de 0,999993, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

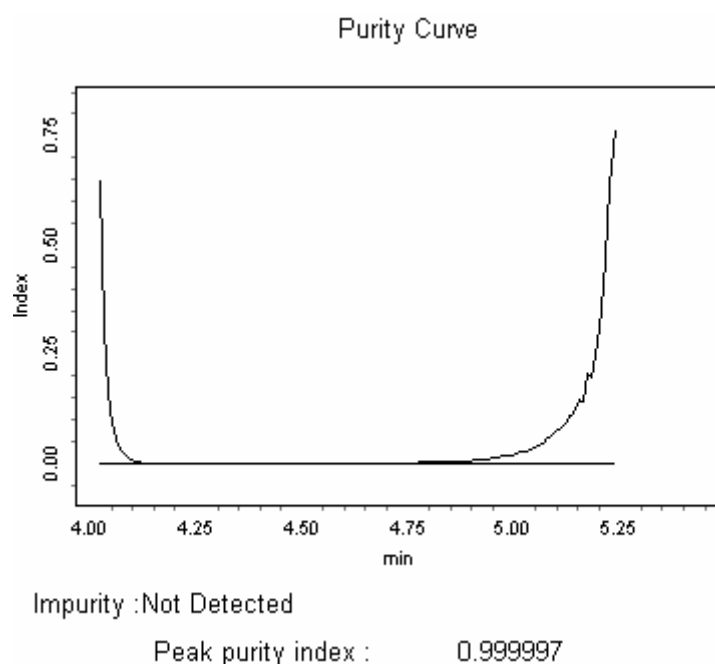


Figura 19 - Curva de pureza apresentada para Form2, indicando a pureza total do pico do cetoconazol de 0,999997, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

A pureza total do pico é calculada através da comparação de todos os espectros de um pico cromatográfico com o espectro de referência, sendo que o espectro do ápice do pico é utilizado como referência. Quanto mais próximo de 1,0 for o índice de similaridade, mais similar ou mais puro é o pico cromatográfico (SHIMADZU, 2001).

5.3.2.1.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação para a amostra Xb-ceto, cujos resultados podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação para amostra Xb-ceto através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Amostra	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)*	Recuperação (%)
<i>R1</i>	44,0	43,3	98,4
<i>R2</i>	88,0	85,5	97,1
<i>R3</i>	132,0	126,8	96,0
<i>Média</i>			97,2
<i>DPR</i>			1,2

*cada valor representa a média de três dias de análise, sendo a amostra injetada em triplicata

A exatidão também pode ser inferida desde que a linearidade, precisão e especificidade tenham sido estabelecidas. Assim pode-se inferir que o método utilizado é exato, também, para as formulações comerciais (Form1 e Form2), visto que esses parâmetros foram avaliados (ICH, 1996b).

5.3.2.1.5. Robustez

A robustez indica a capacidade do método de fornecer resultados confiáveis mesmo quando alguns parâmetros são modificados. Para a CLAE algumas modificações que podem ser feitas são variações no pH ou na composição da fase móvel e avaliação da estabilidade da solução SQR.

A solução de cetoconazol SQR demonstrou-se estável durante os três dias de análise. A Tabela 18 mostra os valores de áreas absolutas obtidas durante os dias de análise. Este ensaio visa a avaliar se as soluções utilizadas na validação do método permanecerão estáveis durante o período de execução dos ensaios.

Tabela 18 – Valores de áreas absolutas da solução de cetoconazol SQR (300 µg/ml), nos três dias de análise, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Tempo (dias)	Áreas
1	16016133
2	16214461
3	16153803
<i>DPR</i>	0,6

As modificações feitas na fase móvel alteraram sensivelmente o tempo de retenção do fármaco, entretanto as áreas absolutas obtidas não variaram. A diminuição da fase orgânica aumentou o tempo de retenção do fármaco (Figura 20), que passou de 4,1 para 5,7 minutos; no entanto, os demais parâmetros não sofreram alteração. Não se observou a formação de picos secundários.

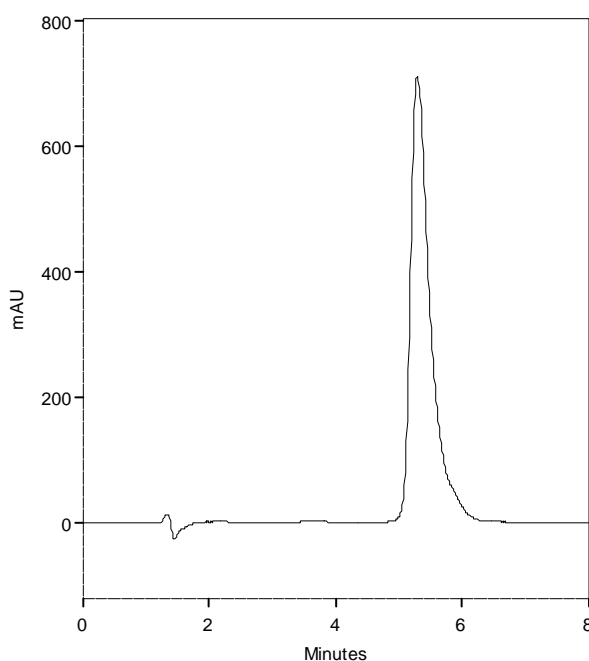


Figura 20 - Cromatograma da solução de cetoconazol SQR (300 µg/ml), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e fase móvel com diferente proporção de metanol e água (6,5:3,5 v/v) pH 5,5.

A diminuição do pH diminuiu o tempo de retenção (Figura 21). No pH de 4,5 o fármaco está totalmente ionizado tendo menor afinidade pela coluna. Entretanto, o tempo de retenção (2,5 minutos) obtido com o menor valor de pH não teria uma boa resolução do pico do fármaco, considerando que nos cromatogramas das amostras de xampu, os excipientes apresentam um tempo de retenção de 1,8 minutos.

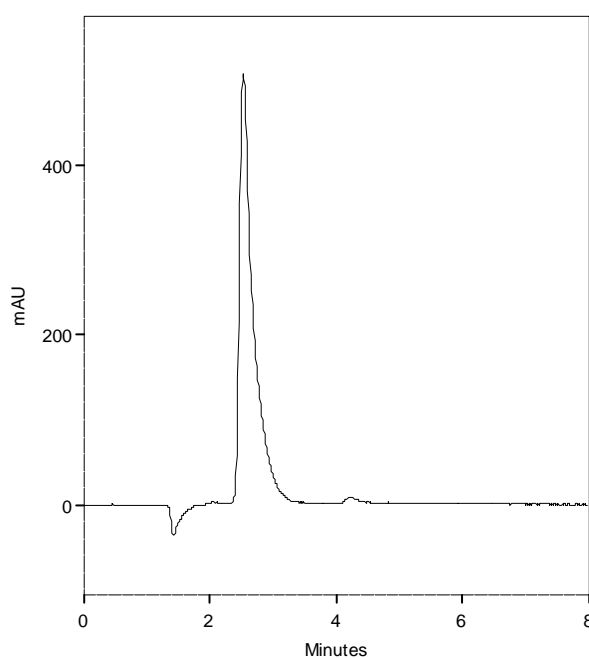


Figura 21 - Cromatograma da solução de cetoconazol SQR (300 $\mu\text{g/ml}$), obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 4,5 como fase móvel.

5.3.2.1.6. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção é a menor quantidade da substância ativa que pode ser detectada. O valor encontrado a partir das curvas padrão do cetoconazol foi de 0,076 $\mu\text{g/ml}$.

O limite de quantificação é a quantidade mínima de amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas. A partir das curvas padrão do

cetoconazol o limite de quantificação encontrado para a substância ativa foi de 0,23 µg/ml.

5.3.2.1.7. Validade do ensaio

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de três curvas padrão. A análise de regressão linear forneceu a equação da reta $y = 56671x + 183697$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A regressão linear foi significativa para $p < 0,05$ e desvio da linearidade não significativo.

A precisão do método foi determinada, através do desvio padrão relativo, entre os teores obtidos nas amostras de Xb-ceto, Form1 e Form2. O DPR de cada amostra variou entre 0,8 e 1,0 % para Xb-ceto, 0,5 e 0,6 % para Form1 e 0,5 e 1,0 % para Form2.

O método mostrou-se específico e no teste de recuperação, determinado na amostra Xb-ceto, o valor médio observado foi de 97,2 %, com DPR de 1,2 %. Para as amostras comerciais a exatidão do método pôde ser inferida, pois foi determinada a linearidade, a precisão e a especificidade do mesmo.

Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,076 µg/ml e 0,23 µg/ml, respectivamente.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência foi validado mostrando-se linear, preciso, específico, exato e robusto (STAUB e BERGOLD, 2004).

5.3.2.2. Ensaio microbiológico

A atividade (potência) de quimioterápicos pode ser demonstrada, com condições adequadas, através do efeito de inibição do crescimento de microrganismos. Uma diminuição da atividade microbiana pode revelar modificações sutis na atividade dos fármacos, não demonstradas por métodos químicos (USP 28, 2005).

Foi desenvolvido o delineamento 3 x 3 de acordo com a Farmacopéia Brasileira (F. Bras IV, 1988) e Farmacopéia Européia (Ph. Eur., 2002), isto é, em cada placa de Petri foram distribuídas três concentrações do padrão e três concentrações da amostra. No delineamento 3 x 3, a diferença dos halos de inibição obtidos entre padrão e amostra é menor, pois todos estando na mesma placa, encontram-se nas mesmas condições, uma vez que o crescimento do microrganismo é o mesmo em toda placa. Sendo assim, a variação que pode vir a ocorrer entre padrão e amostra é menor, facilitando o desenvolvimento e validação do método.

Vários parâmetros podem influenciar o desempenho do ensaio microbiológico; alguns fatores foram avaliados antes da validação do método.

O primeiro passo, foi a avaliação da resposta da amostra frente ao padrão. Observou-se que a SQR, quando adicionada na placa sem a presença dos excipientes do xampu, formava halos muito maiores que os halos formados pela amostra. Isso ocorre, pois os constituintes da formulação interferem na difusão do fármaco na placa. Como a difusão da substância no ágar é determinante do tamanho da zona de inibição de crescimento, optou-se por adicionar o xampu base ao balão volumétrico, após a pesagem da SQR e solubilização da mesma em ácido, no preparo das soluções de cetoconazol SQR.

Além disso, é importante ressaltar que, tanto no preparo das soluções de cetoconazol SQR quanto das soluções amostras, foi adicionado polissorbato 80. Como se tratava de uma formulação contendo conservante (metilparabeno), foi necessária a inibição do mesmo, para que esse não atuasse sobre o microrganismo.

Foi adicionado 1 % de polissorbato 80 na diluição inicial, pois esse é capaz de inibir fenóis e derivados (PINTO *et al.*, 2000). Para tanto, durante o desenvolvimento do método, foi avaliado um branco, isto é, todos constituintes da formulação na ausência do fármaco em análise, adicionado, da mesma forma que padrão e amostra, de polissorbato 80. Pode-se observar que, no cilindro que continha o branco, não ocorreu formação de halo de inibição.

Optou-se por trabalhar com a *Candida albicans*, pois o cetoconazol é bastante ativo contra esse microrganismo, sendo um dos fármacos de escolha no tratamento de candidíase. Além disso, o crescimento do microrganismo foi homogêneo e os halos de inibição formados apresentaram-se bem definidos.

Ao se iniciar a aplicação de uma metodologia, deve ser feita a padronização do inóculo, a partir de testes preliminares. A concentração do inóculo empregada deve ser suficiente para apresentar crescimento homogêneo do microrganismo, propiciando um contraste com a zona de inibição de crescimento, sem apresentar colônias isoladas. Os melhores resultados e o crescimento mais uniforme foram obtidos com o inóculo com concentração de 0,5 %.

Utilizou-se álcool metílico como diluente inicial para uma melhor extração do fármaco, uma vez que o cetoconazol é solúvel nesse solvente. A diluição final não pode ser feita em solvente orgânico, no método de cilindros em placas, pois o microrganismo seria também inibido pelo solvente além do antifúngico. Sendo assim, avaliou-se soluções tampão em diferentes pH como diluente final. Observou-se que, em solução tampão pH 6,0, os halos de inibição formados foram maiores e mais uniformes. É importante ressaltar que o pH do sistema deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a estabilidade e atividade das substâncias testadas.

As concentrações utilizadas na curva de dosagem devem estar em progressão geométrica, uma vez que existe relação linear entre o logaritmo da concentração e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento. As concentrações de 20,0; 100,0 e

500 µg/ml foram empregadas, pois apresentaram excelentes resultados, através de análise estatística. A razão entre doses escolhida foi de 5, pois os halos formados, tiveram maior diferença no tamanho entre as três concentrações utilizadas, tanto para amostra quanto para padrão, facilitando a análise dos resultados.

A tentativa de trabalhar com discos de papel, como reservatório da solução contendo o fármaco, foi avaliada, pois o disco permite a aplicação de amostras diluídas em solvente orgânico além de facilitar a manipulação das placas. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois os halos formados não foram uniformes. Optou-se, então, pelo método de cilindros em placas.

A velocidade de crescimento do microrganismo é afetada diretamente pela composição do meio. Dois meios de cultura com pequenas diferenças entre si foram avaliados, e observou-se que com o ágar Sabouraud dextrose 2 %, o crescimento do microrganismo na placa com um inóculo de 0,5 %, foi melhor.

Em relação à incubação, deve haver uma combinação entre tempo e temperatura. Com tempo de 16 horas de incubação o microrganismo cresceu, mas o crescimento não ficou uniforme. Com 24 horas de incubação, os halos formados ficaram pequenos. Portanto, os melhores resultados foram com 18 horas de incubação com temperatura de 35 ± 2 °C.

5.3.2.2.1. Linearidade

Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do microrganismo, obtidos para as soluções em diferentes concentrações de padrão de cetoconazol e amostra de xampu de cetoconazol (Xb-ceto), encontram-se na Tabela 19. A Figura 22 representa a placa com os halos de inibição formados pelo cetoconazol amostra e pelo cetoconazol SQR.

Tabela 19 - Valores dos diâmetros dos halos de inibição, no doseamento de xampu de cetoconazol (Xb-ceto), obtidos através de ensaio microbiológico - método de difusão em ágar- cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.

	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)*	Diâmetro médio	DPR
P1	20,0	13,73; 13,82	13,67	4,0
		14,04; 13,98		
		13,86; 12,56		
		17,37; 17,54		
P2	100,0	17,50; 17,58	17,45	2,2
		17,91; 16,77		
		20,34; 20,57		
P3	500,0	20,37; 20,39	20,71	2,3
		21,09; 21,52		
		13,91; 13,72		
A1	20,0	13,64; 13,69	13,57	3,5
		13,84; 12,62		
		17,47; 17,84		
A2	100,0	17,85; 17,77	17,61	3,0
		18,08; 16,62		
		20,55; 20,64		
A3	500,0	20,56; 20,65	20,87	2,1
		21,18; 21,62		

*cada valor representa a média de oito halos de inibição

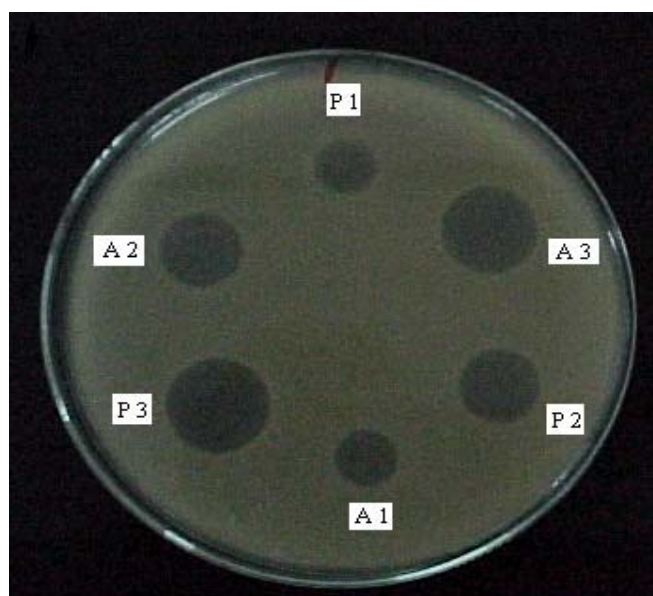


Figura 22 – Doseamento microbiológico (método de difusão em ágar- cilindros em placas), utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo teste, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C. Cetoconazol SQR com concentrações de 20 (P1); 100 (P2) e 500 (P3) $\mu\text{g/ml}$ e xampu de cetoconazol (Xb-ceto) com concentrações de 20 (A1); 100 (A2) e 500 (A3) $\mu\text{g/ml}$.

A representação gráfica da curva padrão e a equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, estão representados na Figura 23.

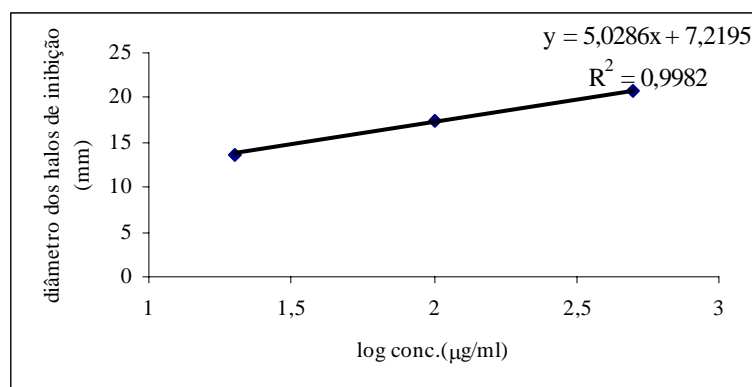


Figura 23 - Representação gráfica da curva padrão de cetoconazol e sua respectiva equação da reta, obtida através de ensaio microbiológico - método de difusão em ágar- cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.

5.3.2.2.2. Precisão

A precisão do ensaio microbiológico foi determinada através da avaliação de 24 placas no mesmo dia de análise, e para a precisão intermediária avaliou-se, em dias diferentes, um total de 48 placas. Os valores experimentais obtidos na determinação quantitativa de cetoconazol em xampu estão descritos na Tabela 20, e a validade do ensaio foi comprovada pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 40, Anexo 1).

Tabela 20 – Valores experimentais obtidos na determinação de xampu de cetoconazol (Xb-ceto) através de ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.

	Amostra	Teor (mg/ml)*	Teor (%)*	Média	DPR
	1	21,6	108,1		
<i>Dia 1</i>	2	20,7	103,5	103,9	3,8
	3	20,0	100,2		
	4	20,8	104,1		
<i>Dia 2</i>	5	20,4	102,2	103,0	1,0
	6	20,5	102,6		
	<i>Média entre dias</i>			103,5	
	<i>DPR entre dias</i>				2,6

* cada valor representa a média de oito halos de inibição

5.3.2.2.3. Exatidão

A exatidão do método foi demonstrada através do teste de recuperação da SQR adicionada nas diferentes concentrações testadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Após a análise dos resultados obtidos, verificou-se que uma das concentrações testadas apresentou teor mais elevado (105,7 %), que pode ser explicado, pois o ensaio microbiológico apresenta maior variação quando comparado a métodos instrumentais.

Tabela 21 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação através de ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.

	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração recuperada (µg/ml)*	Recuperação (%)
R1	10,0	9,9	99,4
R2	30,0	31,7	105,7
R3	90,0	90,5	100,5
Média			101,9
DPR			3,3

*cada valor representa a média de 10 halos de inibição

5.3.2.2.4. Validade do ensaio

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de duas curvas padrão, em dois dias. A análise de regressão linear forneceu a equação da reta $y = 5,0286x + 7,2195$, com coeficiente de correlação de 0,9982.

A precisão do método foi determinada avaliando o coeficiente de variação percentual entre os teores obtidos nas amostras de xampu de cetoconazol. Observou-se um teor médio no primeiro dia de 103,9 % (DPR = 3,8 %) e no segundo dia de 103,0 % (DPR = 1,0 %); o teor obtido ao final dos dois dias de análise foi de 103,5 % (DPR = 2,6 %).

Para avaliação do método foi realizada a análise de variância (ANOVA). A partir dos resultados observou-se que não há desvio de paralelismo (quadrático e diferença de quadrático) bem como não existe diferença significativa entre placas. Observou-se diferença significativa na regressão e nos valores entre doses, estando o método de acordo com as especificações estabelecidas pela F. Bras. IV (1988).

No teste de recuperação, o valor médio observado foi de 101,9 %, com DPR de 3,3 %.

O ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas desenvolvido, foi validado, mostrando-se linear, preciso e exato (STAUB *et al.*, 2005).

5.3.2.3. Análise comparativa dos métodos

Os resultados das determinações do teor de cetoconazol em xampu (Xb-ceto), através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placa, estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22– Teores obtidos na determinação do xampu de cetoconazol (Xb-ceto), através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placa.

Teores CLAE		Teores Microbiológico	
(mg/ml)	(%)	(mg/ml)	(%)
20,4	102,2	21,6	108,1
20,6	102,9	20,7	103,5
20,6	102,9	20,0	100,2
20,5	102,4	20,8	104,1
20,6	103,1	20,4	102,2
20,4	102,0	20,5	102,6
<i>Média</i>	102,6 %	<i>Média</i>	103,5 %
<i>DPR</i>	0,4 %	<i>DPR</i>	2,6 %

A análise estatística empregada, para a comparação dos dois métodos utilizados para a quantificação do cetoconazol na forma farmacêutica xampu (Xb-ceto), foi a distribuição de “t” de “Student”. Emprega-se esta distribuição para análise de pequenas amostras.

Na comparação dos métodos desenvolvidos e validados, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaio microbiológico - método de difusão em ágar – cilindros em placa, o valor de “t”_{calc} foi de 0,494 e o valor de “t”_{0,05;10} é de 2,228. Sendo assim, não se observou diferença significativa entre os métodos propostos para a quantificação de cetoconazol na forma farmacêutica xampu, pois “t”_{calc} foi menor que “t”_{tab}. As médias dos valores experimentais obtidos pelos métodos CLAE e microbiológico foram 102,6 % e 103,5 %, respectivamente.

Os métodos mostraram-se adequados para a quantificação de cetoconazol na forma farmacêutica.

5.4. ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE

Os fatores que podem alterar um produto farmacêutico com o tempo são: temperatura, radiações, umidade, oxigênio, solventes, variações no pH, interações e contaminações microbianas, entre outros.

Recentemente a decomposição de fármacos, como resultado da absorção da energia da radiação luminosa, tem recebido maior atenção devido à estrutura química complexa de muitos compostos. Diferentes tipos de reações podem ser desencadeadas por ação da luz, como redução, oxidação, hidrólise, isomerização, alteração no anel, remoção de vários substituintes (LACHMAN *et al.*, 2001).

A reação fotoquímica é um processo complexo que ocorre em dois estágios. A primeira reação é devido à absorção de fótons, isto é, envolve um estado de excitação da molécula, produzindo produtos intermediários (radicais). Estes

produtos intermediários podem reagir formando um produto final estável sendo esta a reação secundária (TONESSEN, 2001).

Geralmente, os processos de degradação são reações químicas que consomem energia e que podem acelerar-se pelo aumento da temperatura. A maioria dos métodos de envelhecimento acelerado se fundamentam em medições da velocidade de degradação em temperaturas superiores à ambiente. Entretanto, se a degradação é provocada por uma reação fotolítica, esta não pode ser acelerada pelo aumento da temperatura, pois a energia de ativação é muito baixa. A velocidade do processo pode ser incrementada por irradiação com fontes luminosas de intensidade relativamente alta (NUDELMAN, 1975).

O estudo de degradação de fármacos sob ação da luz UV/Visível é relevante para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, pois a exposição à luz pode influenciar a estabilidade, levando a modificações físico-químicas como coloração ou descoloração do produto e a exposição inapropriada do fármaco à luz pode originar produtos tóxicos de fotodegradação.

Os testes para avaliação da fotoestabilidade de um produto consistem em duas etapas: teste de degradação forçada e testes confirmatórios (ICH, 1996a). O objetivo da degradação forçada é avaliar a fotossensibilidade total do produto e elucidar o caminho da degradação. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para propiciar informações necessárias sobre a manipulação e embalagem do produto. Para tanto, fez-se avaliação das formulações de cetoconazol frente à luz UV-A, UV-C e luz natural.

Após os testes de degradação do cetoconazol, a determinação do teor das amostras foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Atualmente, quase todos os ensaios de estabilidade de fármacos recorrem à CLAE como método de análise, pois esta consegue separar e quantificar a substância ativa juntamente com seus produtos de degradação.

Além da CLAE, utilizou-se o doseamento microbiológico, para avaliação da formulação Xb-ceto, pois este método esclarece dúvidas a respeito da possível perda de atividade da substância em análise (USP 28, 2005).

5.4.1. Avaliação do cetoconazol frente à luz UV-C e luz UV-A

Segundo o ICH (1996a), uma das opções de fonte luminosa para ser utilizada em testes de fotoestabilidade é uma lâmpada fluorescente UV tendo distribuição espectral de 320 a 400 nm com máximos de emissão entre 350 e 370 nm. Para obtenção da degradação do cetoconazol utilizaram-se duas fontes de radiação UV. Uma radiação UV-A (lâmpada *Blacklight blue lamp – Orion* (352 nm) 30 W, 130 V), com máximo de emissão conforme preconizado pelo ICH e outra radiação UV-C (lâmpada *Light express LE UV* (254 nm), 30 W) com o objetivo de uma maior degradação do produto, pois quanto menor o comprimento de onda (λ) da radiação, mais energia é absorvida. Conseqüentemente, as radiações absorvidas na gama do ultravioleta contribuem mais facilmente para o início de reações químicas do que aquelas absorvidas a partir de outras com comprimento de onda maior.

5.4.1.1. Amostras expostas à luz UV

A. Matéria-prima

A degradação forçada pode ser realizada em estado sólido e em solução. Na forma sólida os estudos podem ser realizados na matéria-prima pura e, também, em pastilhas contendo o fármaco e brometo de potássio (MARCINIEC *et al.*, 1997). Sendo assim, a matéria-prima de cetoconazol foi colocada em vidro de relógio na câmara contendo as lâmpadas. Observou-se que a parte superior do pó se tornava vermelha e a parte inferior (não exposta à luz) não alterava a cor. Concluiu-se que não seria possível avaliar a matéria-prima desta forma. Optou-se, então, pela transferência de alíquotas de 1 ml de uma solução metanólica de cetoconazol, para

vidro de relógio, com posterior evaporação do solvente até a obtenção de um filme homogêneo da matéria-prima. O teor obtido no tempo zero foi de 101,4 % e após 48 horas de exposição da matéria-prima à lâmpada UV-A o teor obtido foi de 49,5 %.

Para a matéria-prima exposta à lâmpada UV-C, o período de exposição foi menor, pois como explicado acima, a degradação nessa região do ultravioleta é maior. Sendo assim os tempos de análise foram de 0, 2, 6 e 8 horas. Pode-se observar na Figura 24 uma diminuição no teor do fármaco, sendo que em 8 horas a concentração obtida foi de 77,5 %.

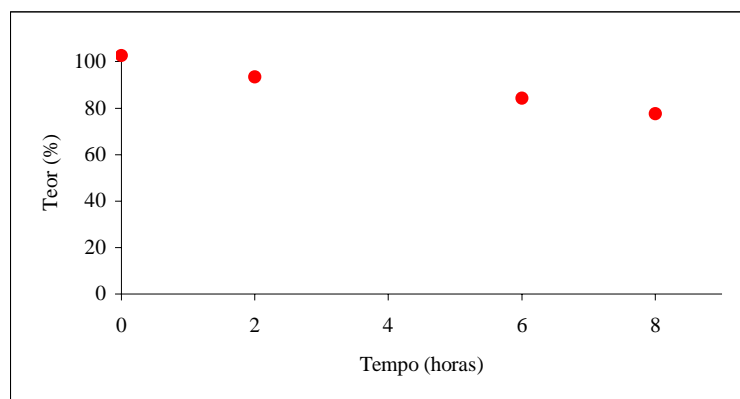


Figura 24 – Representação gráfica dos teores de cetozonazol matéria-prima obtidos por CLAE, após exposição à lâmpada UV-C (*Light express LE UV (254 nm)*) por um período de 8 horas.

É importante salientar que foi possível detectar a presença de produtos de degradação nos cromatogramas no tempo de retenção de 3,4 minutos (Figura 25) tanto para as amostras expostas à lâmpada UV-C como à UV-A. Além disso, com o aumento da exposição à luz, a matéria-prima foi se tornando mais avermelhada.

THOMA e KÜBLER (1996c) avaliaram a fotodegradação de alguns antifúngicos. O cetozonazol (matéria-prima e em solução metanólica), após exposição à luz, apresentou a formação de vários produtos de degradação que foram detectados através de CLAE. Entretanto, os produtos formados não foram identificados.

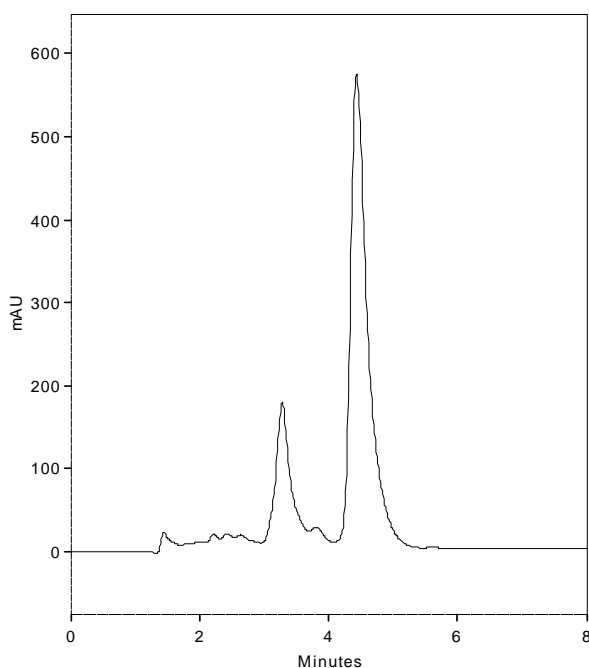


Figura 25 - Cromatograma do cetoconazol matéria-prima (concentração teórica de 400 $\mu\text{g/ml}$), após exposição à lâmpada UV-C por 8 horas, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V) /acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

B. Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)

Segundo THOMA e KÜBLER (1996b), para o estudo de degradação do fármaco em solução, pode-se utilizar como solvente o álcool metílico. Para tanto, 1 ml da solução metanólica de cetoconazol foi acondicionada em cubeta de plástico. Utilizaram-se cubetas para os testes, pois estes recipientes deixam passar radiações na região do ultravioleta. Os recipientes de vidro são transparentes somente a partir de 300 nm.

Os resultados encontrados para amostras expostas à lâmpada UV-A e UV-C estão representados na Figura 26 e Tabela 23.

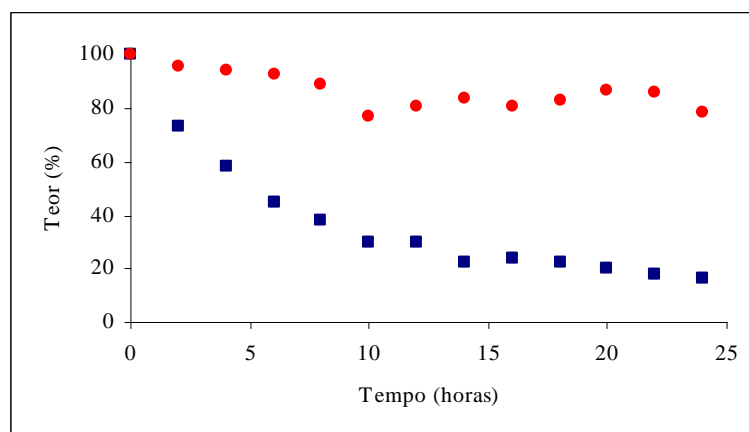


Figura 26 - Representação gráfica dos teores da solução metanólica de cetoconazol obtidos por CLAE, após exposição à lâmpada UV-C [■] (*Light express LE UV* (254 nm)) e UV-A [●] (*Blacklight blue lamp – Orion* (352 nm)) por um período de 24 horas.

Tabela 23 – Valores dos teores de cetoconazol em solução metanólica (Sol-ceto), após exposição às lâmpadas UV-A e UV-C, obtidos através de CLAE.

Tempo (horas)	Teores solução metanólica (lâmpada UV-A)		Teores solução metanólica (lâmpada UV-C)	
	mg/ml	(%)	mg/ml	(%)
0	20,0	100,0	20,0	100,0
2	19,1	95,5	14,7	73,4
4	18,8	94,2	11,7	58,5
6	18,6	93,0	9,1	45,3
8	17,7	88,7	7,6	37,8
10	15,4	76,8	5,9	29,6
12	16,1	80,7	6,1	30,3
14	16,8	83,9	4,5	22,7
16	16,1	80,7	4,7	23,6
18	16,6	82,8	4,6	22,8
20	17,4	86,8	4,1	20,5
22	17,3	86,4	3,6	18,2
24	15,6	78,2	3,3	16,3

Verificou-se que a solução metanólica (Sol-ceto) submetida à lâmpada UV-A, por um período de 24 horas, apresentou teor de cetoconazol de 78,2 % e a Sol-ceto exposta por 24 horas à luz UV-C apresentou teor de 16,3 % de cetoconazol. Com os resultados obtidos constatou-se que o fármaco sofreu degradação por ação das lâmpadas UV-A e UV-C.

Assim como na matéria-prima, foi possível detectar nas soluções metanólicas a presença de produtos de degradação nos cromatogramas no tempo de retenção de 3,4 minutos (Figuras 27, 28 e 29) e a alteração na cor do produto, tanto para as amostras expostas à lâmpada UV-C como à UV-A. Os cromatogramas das amostras expostas à lâmpada UV-C apresentaram o surgimento de vários outros picos secundários, além do produto no tempo 3,4 minutos.

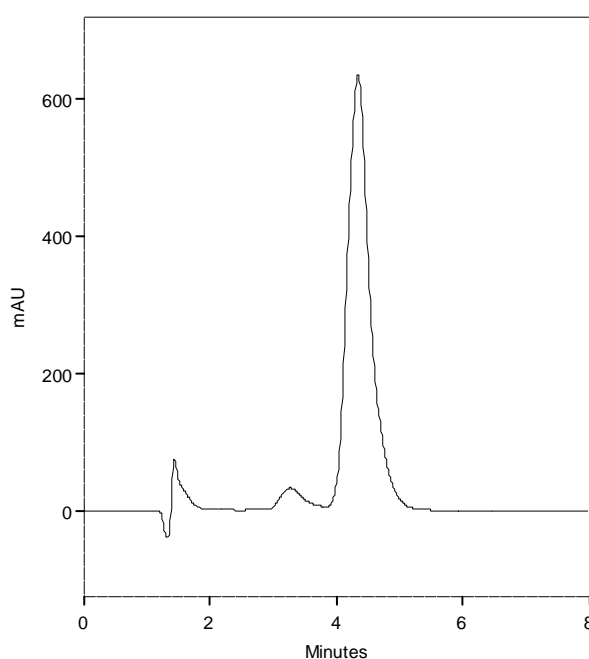


Figura 27 - Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol (concentração teórica de 400 $\mu\text{g/ml}$), após exposição à lâmpada UV-A por 8 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

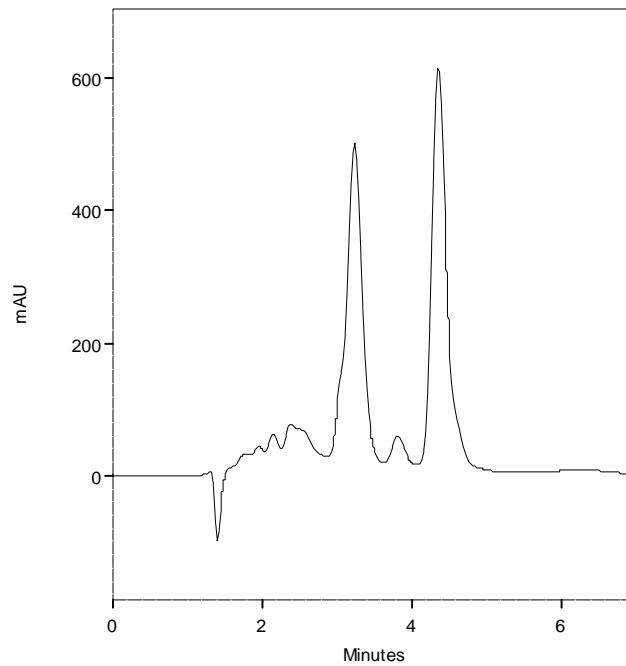


Figura 28 - Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol (concentração teórica de 400 $\mu\text{g/ml}$), após exposição à lâmpada UV-C por 4 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

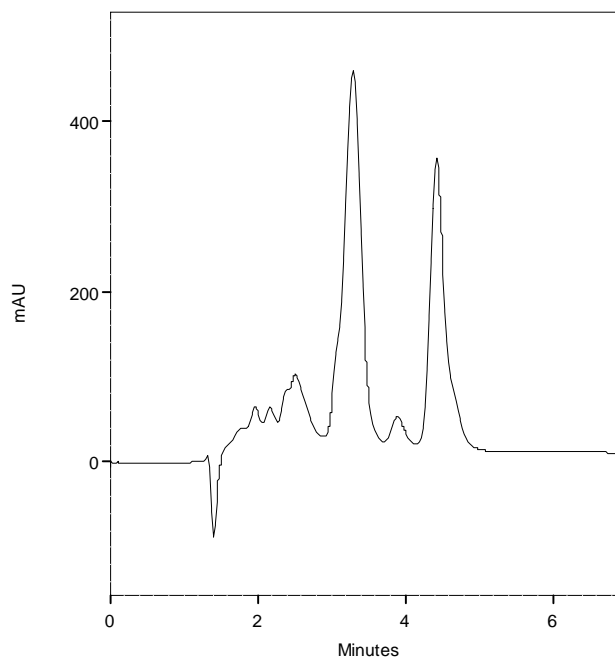


Figura 29 - Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol (concentração teórica de 400 $\mu\text{g/ml}$), após exposição à lâmpada UV-C por 24 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Os produtos de degradação aparecem com maior intensidade após exposição à lâmpada UV-C. O produto de degradação majoritário aparece no tempo de 3,4 minutos para ambas as lâmpadas.

C. Xampu de cetoconazol 2 % (Xb-ceto)

A fim de verificar alteração no peso do produto, as amostras foram pesadas antes e após exposição à luz. No entanto, não se observaram variações.

Os resultados obtidos para a formulação após exposição às lâmpadas UV-C e UV-A, por um período de 24 horas, foram de 57,1 e 93,4 %, respectivamente. Na Figura 30 e Tabela 24 estão representados os valores encontrados durante o estudo de estabilidade da formulação.

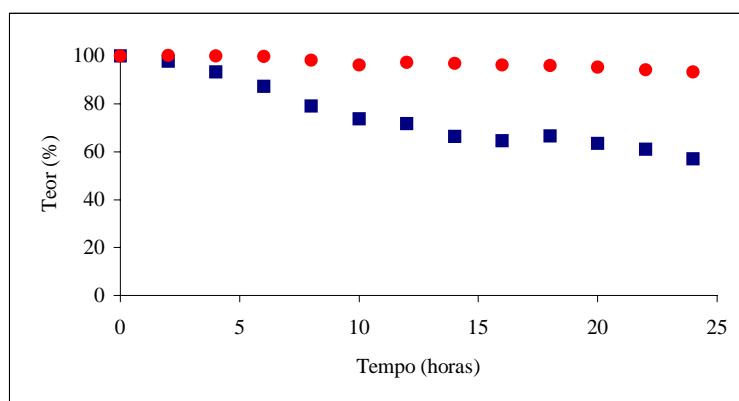


Figura 30 - Representação gráfica dos teores de xampu de cetoconazol obtidos por CLAE, após exposição à lâmpada UV-C [■] (*Light express LE UV* (254 nm)) e lâmpada UV-A [●] (*Blacklight blue lamp – Orion* (352 nm)) por um período de 24 horas.

Tabela 24 – Valores dos teores de cetoconazol em xampu (Xb-ceto), após exposição às lâmpadas UV-A e UV-C, obtidos através de CLAE.

Tempo (horas)	Teores xampu (lâmpada UV-A)		Teores xampu (lâmpada UV-C)	
	mg/ml	(%)	mg/ml	(%)
0	20,0	100,0	20,0	100,0
2	20,0	100,2	19,6	97,9
4	20,0	100,1	18,7	93,4
6	20,0	99,9	17,5	87,4
8	19,7	98,3	15,8	79,2
10	19,3	96,4	14,8	73,8
12	19,5	97,4	14,3	71,7
14	19,4	97,0	13,3	66,4
16	19,3	96,3	12,9	64,7
18	19,2	96,1	13,3	66,7
20	19,1	95,5	12,7	63,6
22	18,9	94,3	12,2	61,0
24	18,7	93,4	11,4	57,1

Para a formulação Xb-ceto também foi possível verificar que o produto sofreu degradação após exposição às lâmpadas. Além disso, observou-se a presença do produto de degradação majoritário no tempo 3,4 minutos (Figuras 31 e 32). No tempo 1,6 minutos é possível observar alguma alteração indicando a presença de produtos de degradação, apesar de os mesmos apresentarem tempo de retenção similar aos excipientes (1,8 minutos).

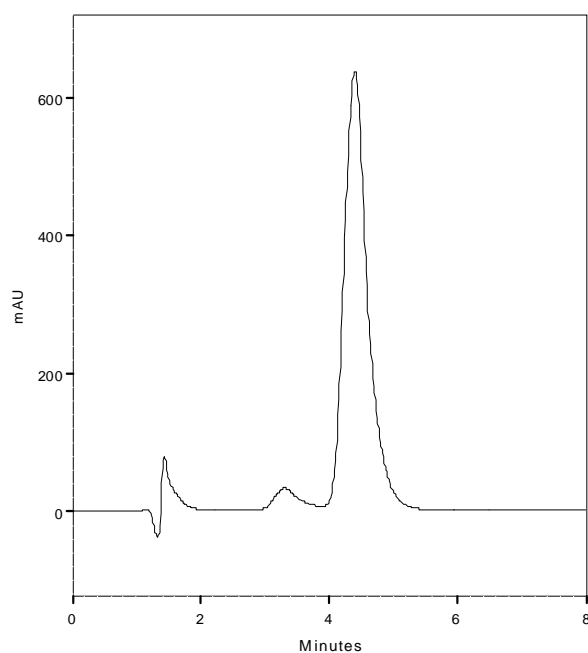


Figura 31 -Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 $\mu\text{g/ml}$), após exposição à lâmpada UV-A por 24 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

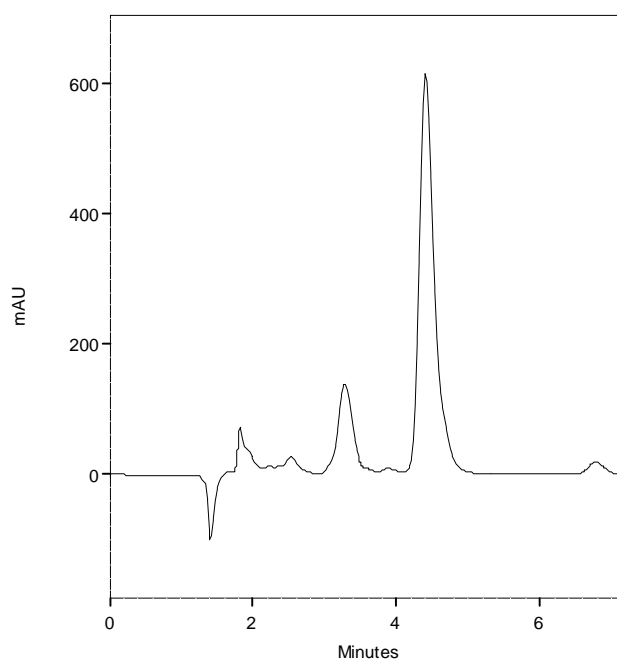


Figura 32 -Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 $\mu\text{g/ml}$), após exposição à lâmpada UV-C por 24 horas, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Com o objetivo de verificar a atividade do cetoconazol em xampu, após exposição à luz e detecção dos seus produtos de degradação através de CLAE, procedeu-se o ensaio microbiológico descrito no item 4.5.2.2. Para tanto, amostras de Xb-ceto expostas à lâmpada UV-C por 0, 6 e 22 horas foram avaliadas através de ensaio microbiológico–método de difusão em ágar–cilindros em placa, e os teores obtidos foram comparados com método de CLAE. Os resultados estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25– Teores obtidos através de ensaio microbiológico e CLAE para amostras de Xb-ceto expostas à lâmpada UV-C por um período de 0, 6 e 22 horas.

Tempo (horas)	Teores (%) Microbiológico	Teores (%) CLAE
0	97,6	100,0
6	78,4	87,4
22	57,4	61,0

Após avaliação dos teores obtidos, verifica-se a diminuição na atividade do cetoconazol em xampu, exposto à lâmpada UV-C, frente ao microrganismo teste (*Candida albicans*). No cromatograma das amostras avaliadas nos tempos 6 e 22 horas foi possível verificar a presença dos produtos de degradação majoritários nos tempos 3,4 e 1,6 minutos. Na Figura 33 estão representados os halos de inibição formados, onde pode-se observar uma diminuição significativa no tamanho dos halos da amostra degradada.

A comparação entre as placas da amostra íntegra e amostra degradada (Figuras 22 e 33) demonstrou que o produto diminuiu a atividade, pois os halos formados, após exposição do produto à luz, foram menores.

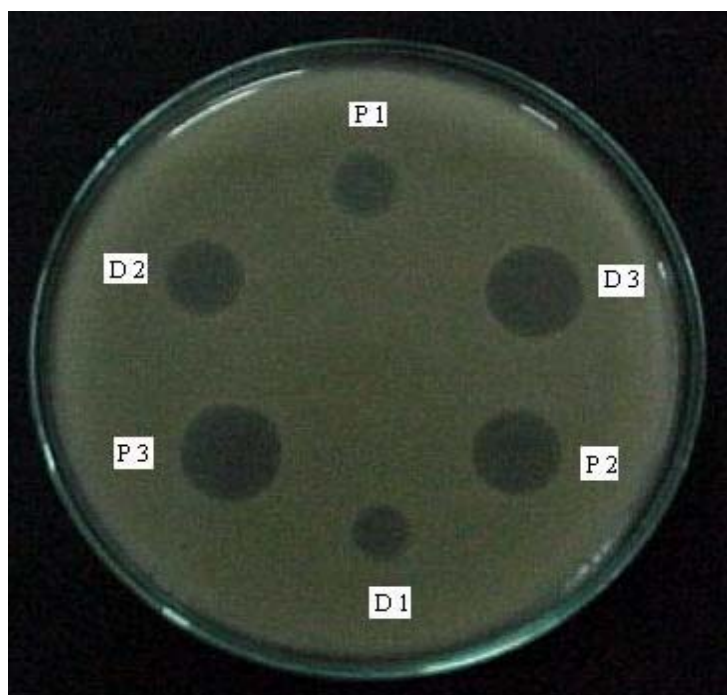


Figura 33– Doseamento microbiológico (método de difusão em ágar- cilindros em placas), utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo teste, meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C. Cetoconazol SQR com concentrações de 20 (P1); 100 (P2) e 500 (P3) µg/ml e xampu de cetoconazol (Xb-ceto), após exposição à lâmpada UV-C por 22 horas, com concentrações de 20 (D1); 100 (D2) e 500 (D3) µg/ml.

A temperatura da lâmpada foi monitorada durante todos os experimentos. Para a lâmpada UV-C a temperatura máxima atingida foi de 31 °C e para a lâmpada UV-A foi de 27 °C. Para minimizar o efeito da temperatura utilizou-se um branco, isto é, a amostra era colocada na câmara nas mesmas condições, envolta com papel alumínio para proteção da luz. Observou-se que o teor do fármaco continuou o mesmo, durante todo o tempo que ficou na câmara; além disso o cromatograma não apresentou picos secundários (cromatogramas não apresentados).

Todas as formulações estudadas e a própria matéria-prima de cetoconazol apresentaram coloração avermelhada quando expostas à luz (UV-A e UV-C), sendo que com o aumento do tempo de exposição do fármaco à radiação, a coloração se intensificava. Além disso, observou-se, que com ambas as lâmpadas o teor do fármaco diminuiu e que na lâmpada UV-C a diminuição foi mais acentuada, devido

à radiação mais energética. Os resultados indicaram a instabilidade do cetoconazol frente à luz, sofrendo maior degradação na forma de solução ou como matéria-prima.

5.4.2. Avaliação do cetoconazol frente à luz natural

Optou-se por armazenar as formulações de xampu, produzidas no laboratório, em frascos plásticos transparentes para uma maior incidência da luz na formulação, e em frascos plásticos opacos para observar se os mesmos protegem das radiações, uma vez que em farmácias magistrais o xampu de cetoconazol é comercializado em frascos plásticos opacos. As formulações adquiridas de indústrias farmacêuticas ficaram armazenadas no frasco de comercialização (plástico opaco).

As soluções metanólicas foram armazenadas da mesma forma que o xampu. Todas as amostras ficaram próximo da janela, simulando as condições do produto após serem adquiridas pelo consumidor.

5.4.2.1. Amostras expostas à luz natural

A. Matéria-prima

Para verificar a fotoestabilidade da matéria-prima, utilizaram-se pastilhas de brometo de potássio e cetoconazol. As pastilhas foram submetidas diretamente à análise por espectrofotometria na região do infravermelho. A correlação pico a pico constitui boa prova de identidade, visto ser muito pouco provável que dois compostos diferentes tenham o mesmo espectro no infravermelho, à exceção de pares de enantiômeros (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Após nove meses de exposição à luz natural não foi possível detectar alteração no espectro. Entretanto, a pastilha adquiriu uma coloração avermelhada logo nas primeiras semanas.

B. Solução metanólica de cetoconazol 2 % (Sol-ceto)

As soluções metanólicas (Sol-ceto) foram analisadas por um período de 26 meses. A solução armazenada em frasco transparente desenvolveu cor na primeira semana após o armazenamento. A solução armazenada em frasco opaco apresentou leve coloração avermelhada somente após duas semanas.

Observou-se que as amostras acondicionadas em frascos transparentes tiveram diminuição no teor do fármaco (75,8 %) e para as amostras acondicionadas em frascos opacos pôde-se observar aumento nos teores de cetoconazol (121,8 %) (Figura 34 e Tabela 26).

Devido a este aumento nos teores de cetoconazol foi feita a determinação da pureza do pico cromatográfico relativo ao fármaco, com auxílio de detector de arranjo de diodos. A pureza obtida foi de 0,99998 indicando que o pico apresentava-se puro. Considerando o longo período de análise das amostras, verificou-se que, provavelmente, tenha ocorrido evaporação do metanol, pois o solvente é muito volátil, aumentando a concentração do fármaco nas soluções.

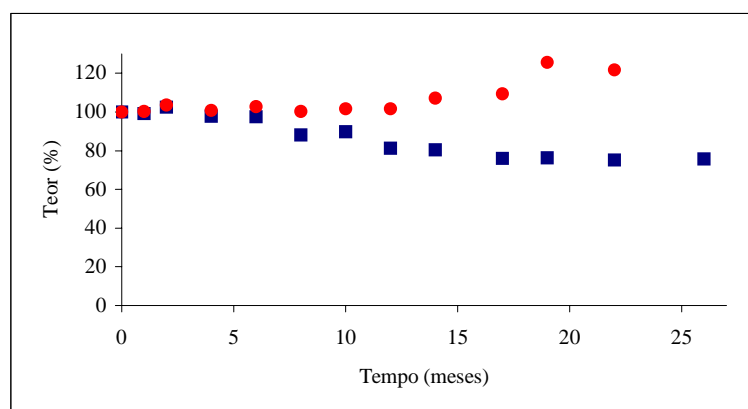


Figura 34 - Representação gráfica dos teores da solução metanólica de cetoconazol obtidos por CLAE. Amostras armazenadas em frasco transparente [■] e em frasco opaco [●] expostas à luz natural por um período de 26 meses.

Tabela 26 – Valores dos teores da solução metanólica de cetoconazol (Sol-ceto), após exposição à luz natural, obtidos através de CLAE.

Tempo (meses)	Teores solução metanólica (frasco transparente)		Teores solução metanólica (frasco opaco)	
	mg/ml	(%)	mg/ml	(%)
0	20,0	100,0	20,0	100,0
1	19,8	99,1	20,0	100,1
2	20,5	102,4	20,7	103,6
4	19,5	97,7	20,2	100,9
6	19,5	97,4	20,5	102,7
8	17,6	88,1	20,0	100,1
10	18,0	89,9	20,3	101,6
12	16,2	81,2	20,3	101,6
14	16,1	80,5	21,4	107,2
17	15,2	76,0	21,9	109,3
19	15,2	76,2	25,1	125,5
22	15,0	75,1	24,4	121,8
26	15,2	75,8	-	-

Os desvios padrões relativos (DPR) obtidos no estudo da fotoestabilidade da Sol-ceto, exposta à luz natural, estão apresentados na Tabela 41 (Anexo 1).

Foi possível detectar, além da intensa mudança de cor das formulações, a presença de produtos de degradação (em torno de 3,4 minutos) nos cromatogramas (Figura 35) das amostras expostas à luz natural. As formulações armazenadas em frascos opacos apresentaram leve coloração avermelhada e após análise dos cromatogramas (Figura 36) não foi possível visualizar a presença de produtos

formados. Entretanto, ampliando a escala pôde-se detectar que o tempo de retenção de 3,4 minutos apresenta alteração (Figura 37). Não se observou diminuição do teor do fármaco, pois o mesmo estava ao abrigo da luz, no entanto a alteração de cor da formulação indica que o produto formado, mesmo em pequenas quantidades, produz forte coloração.

Segundo KUMMER e colaboradores (1991), soluções etanólicas de cetoconazol (2,5 e 5,0 $\mu\text{g/ml}$) mostraram-se estáveis, por um período de 28 dias, em presença da luz natural. Provavelmente, estes resultados foram encontrados devido à baixa concentração de cetoconazol empregada e ao curto período de avaliação das amostras frente à luz.

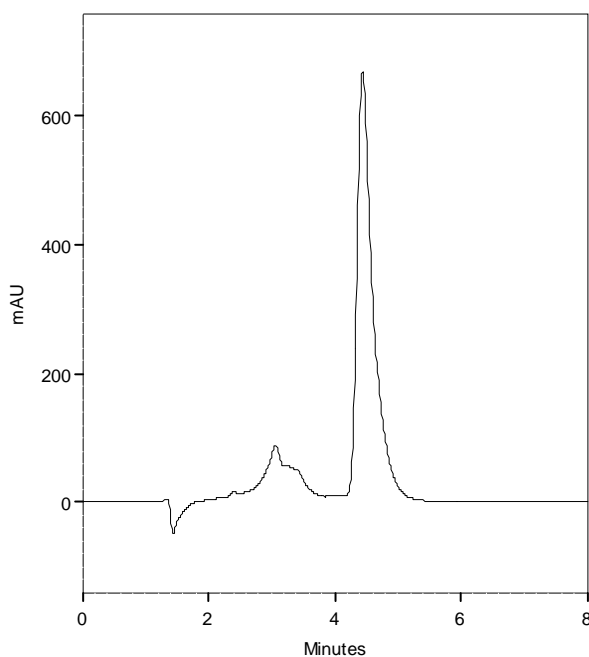


Figura 35 - Cromatograma da Sol-ceto (concentração teórica 400 $\mu\text{g/ml}$) armazenada em frasco transparente, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

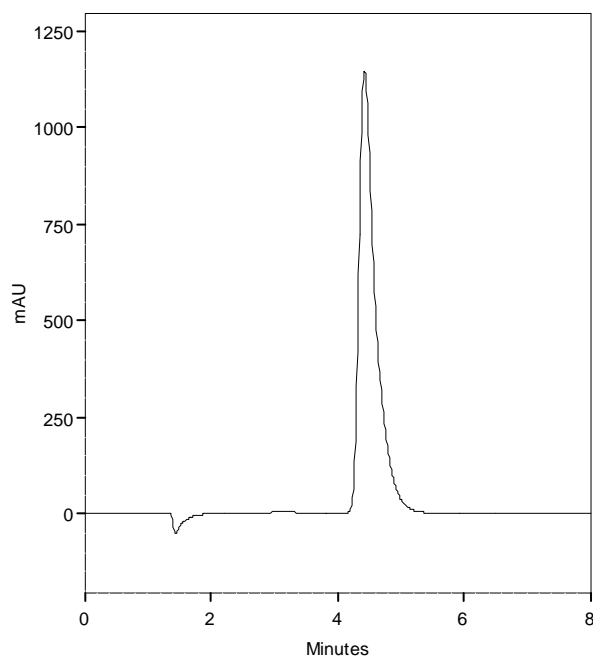


Figura 36 - Cromatograma da Sol-ceto (concentração teórica 400 $\mu\text{g/ml}$) armazenada em frasco opaco, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

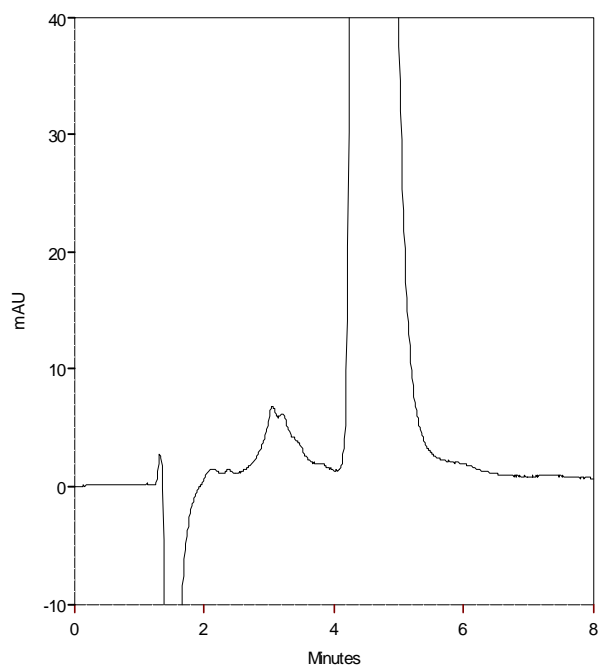


Figura 37 - Cromatograma com escala ampliada da Sol-ceto (concentração teórica 400 $\mu\text{g/ml}$) armazenada em frasco opaco, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Além da CLAE, a CCD permite identificar o fármaco quando este é cromatografado juntamente com a substância de referência, bem como, verificar a presença de impurezas e produtos de degradação. Através da CCD foi possível detectar a presença de produtos de degradação (manchas secundárias) na solução metanólica armazenada em frasco transparente, entretanto, não foi possível fazer uma separação dos produtos visualizados. O cetoconazol continuou com o mesmo Rf e as manchas secundárias tiveram um Rf com valor menor, isto é, os produtos de degradação têm polaridade maior que o cetoconazol. Para a solução armazenada em frasco opaco não foram visualizadas manchas secundárias.

C. Xampu de cetoconazol 2 % (Xb-ceto) e formulações comerciais (Form1 e Form2)

As formulações de xampu (Xb-ceto) e as formulações comerciais (Form1 e Form2) ficaram expostas à luz natural por um período de 26 e 17 meses, respectivamente. Para a avaliação das formulações comerciais, procurou-se obter as mesmas com o menor tempo de fabricação, isto é, que tivessem sido recentemente produzidas. A Form1 foi adquirida após cinco meses da data de fabricação e a Form2 após um mês da fabricação.

Durante a realização dos estudos de fotoestabilidade, foi feita a avaliação da densidade e do pH de todas as formulações de xampu (Xb-ceto, Form1 e Form2), os quais permaneceram estáveis.

Após a análise da Figura 38 e da Tabela 27 pode-se constatar que houve diminuição no teor do cetoconazol nas formulações Xb-ceto armazenadas em frasco transparente (78,1 %) e em frasco opaco (94,8 %). Além disso, nos cromatogramas foi possível detectar os produtos de degradação formados (Figuras 39 e 40). Através de CCD foi possível visualizar manchas secundárias. Segundo HEPP (1999), após análise do xampu de cetoconazol frente à luz natural, determinado através de

espectrofotometria na região do UV, também foi possível verificar alteração no espectro, indicando a formação de produtos de degradação.

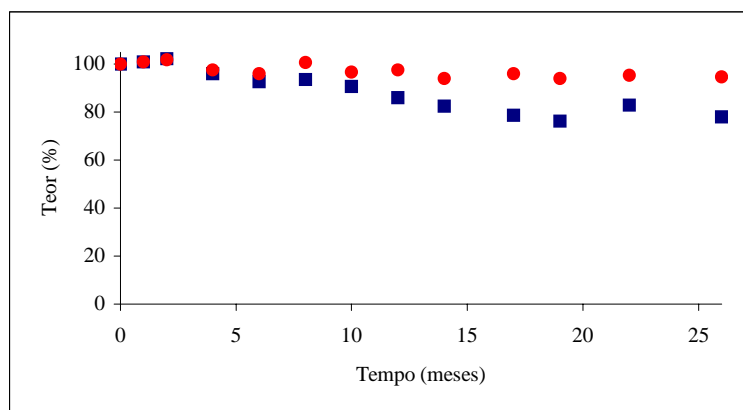


Figura 38 - Representação gráfica dos teores do xampu de cetoconazol (Xb-ceto) obtidos por CLAE. Amostras armazenadas em frasco transparente [■] e em frasco opaco [●] expostas à luz natural por um período de 26 meses.

Tabela 27 – Valores dos teores do xampu de cetoconazol (Xb-ceto), após exposição à luz natural, obtidos através de CLAE.

Tempo (meses)	Teores xampu (frasco transparente)		Teores xampu (frasco opaco)	
	mg/ml	(%)	mg/ml	(%)
0	20,0	100,0	20,0	100,0
1	20,2	101,0	20,2	101,0
2	20,5	102,4	20,4	101,9
4	19,2	96,2	19,5	97,7
6	18,6	92,8	19,2	96,0
8	18,7	93,7	20,2	100,8
10	18,1	90,7	19,3	96,7
12	17,2	86,2	19,5	97,7
14	16,5	82,5	18,8	94,2
17	15,7	78,7	19,2	96,2
19	15,2	76,2	18,8	94,0
22	16,6	82,9	19,1	95,3
26	15,6	78,1	19,0	94,8

Os desvios padrões relativos (DPR) obtidos no estudo da fotoestabilidade do Xb-ceto, exposto à luz natural, estão apresentados na Tabela 41 (Anexo 1).

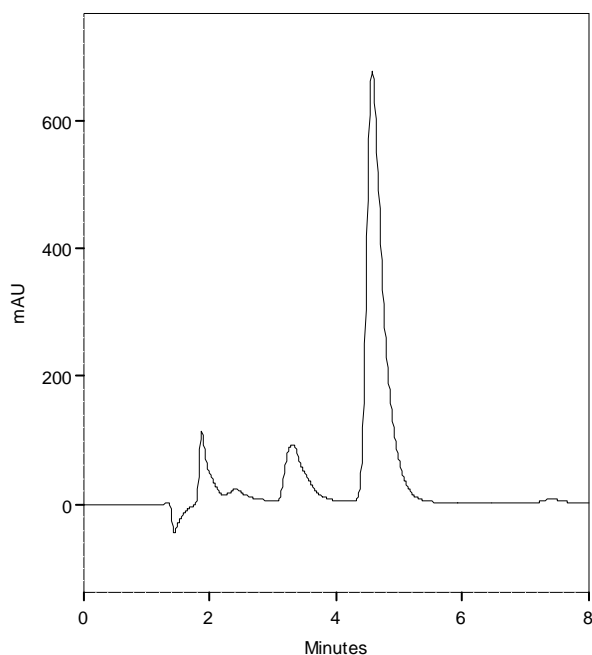


Figura 39 - Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 $\mu\text{g/ml}$) armazenado em frasco transparente, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

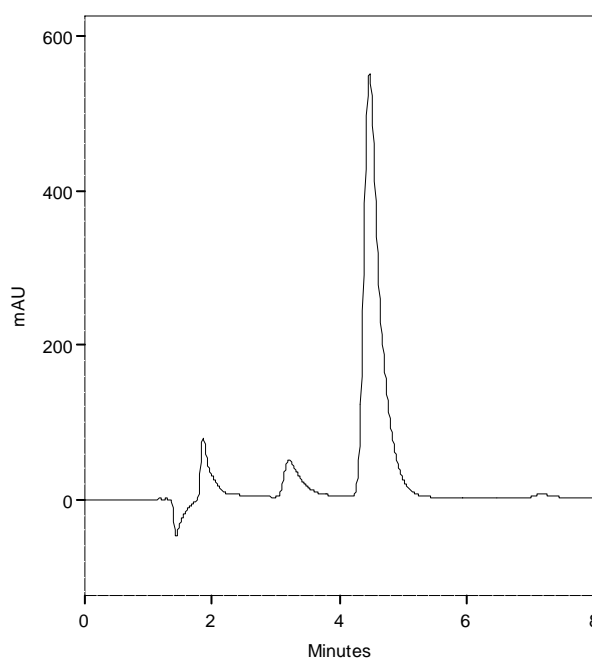


Figura 40 - Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 $\mu\text{g/ml}$) armazenado em frasco opaco, após exposição à luz natural por 26 meses, obtidos através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

No entanto, mesmo uma formulação simples como Xb-ceto manteve teores não inferiores a 90 % por um período de 10 meses, independente do tipo de frasco em que foi armazenada.

Para o Xb-ceto e a Sol-ceto, armazenados em frascos transparentes, as primeiras alterações no cromatograma ocorreram em torno de 6 e 8 meses de exposição à luz natural, respectivamente. O Xb-ceto armazenado em frasco opaco apresentou a formação de produtos de degradação somente a partir de 14 meses, e para a Sol-ceto em frasco opaco não se observou a formação de produtos de degradação. Assim sendo, os resultados indicam que a presença da luz favorece a instabilidade do fármaco.

Para as formulações comerciais não se observou diminuição do teor do fármaco (Figura 41 e Tabela 28) durante o período de análise. Além disso, não foi detectada a presença de produtos de degradação.

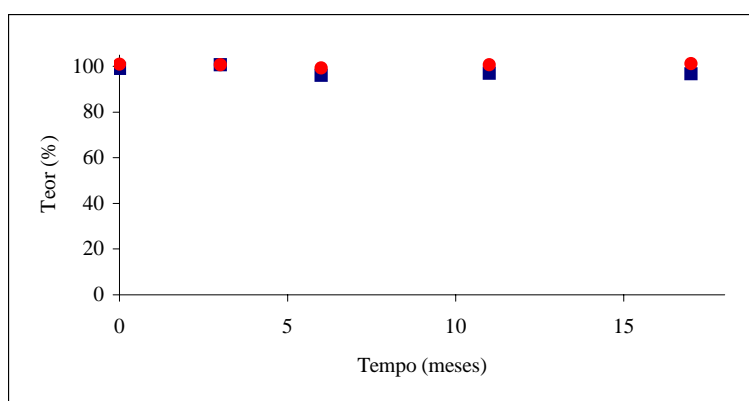


Figura 41 - Representação gráfica dos teores do xampu de cetoconazol (Form1 [■] e Form2 [●]) obtidos por CLAE. Amostras armazenadas nos frascos de comercialização, expostas à luz natural por um período de 17 meses.

Tabela 28 – Valores dos teores das formulações comerciais (Form1 e Form2), após exposição à luz natural, obtidos através de CLAE.

Tempo (meses)	Teores Form1		Teores Form2	
	mg/g	(%)	mg/g	(%)
0	19,8	99,2	20,2	101,1
3	20,2	100,8	20,2	100,9
6	19,2	96,1	19,9	99,5
11	19,4	97,2	20,2	100,8
17	19,3	96,7	20,3	101,4

Os desvios padrões relativos (DPR) obtidos no estudo da fotoestabilidade das formulações comerciais, expostas à luz natural, estão apresentados na Tabela 42 (Anexo 1).

Da mesma forma que amostras de Xb-ceto expostas à lâmpada UV-C foram avaliadas através de ensaio microbiológico, fez-se a determinação da atividade do antifúngico frente ao microrganismo *Candida albicans*, de amostras Xb-ceto expostas à luz natural por 17 meses. Observou-se uma diminuição significativa nos teores da amostra armazenada em frasco transparente. Os teores obtidos estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Teores obtidos através de ensaio microbiológico e CLAE para amostras de Xb-ceto, expostas à luz natural, por um período de 17 meses.

Amostras	Teores (%) Microbiológico	Teores (%) CLAE
<i>Xb-ceto em frasco transparente</i>	74,9	78,7
<i>Xb-ceto em frasco opaco</i>	95,1	96,2

Pôde-se constatar que o pH ácido do xampu, mesmo na ausência de luz, propiciou maior instabilidade do fármaco, pois o Xb-ceto, armazenado protegido da luz, apresentou diminuição no teor, e a Sol-ceto, armazenada em frasco opaco, não apresentou alteração. Os resultados encontrados estão de acordo com SKIBA e colaboradores (2000) que demonstraram que o cetoconazol é mais instável em pH ácido.

Segundo THOMA e KÜBLER (1997) e TONNESEN (2001), os excipientes podem influenciar a fotodecomposição da substância ativa. Podem iniciar, propagar ou participar da reação fotoquímica. Entretanto, para o xampu de cetoconazol constatou-se que os excipientes atuaram dando proteção ao fármaco, uma vez que comparando os teores obtidos nas formulações de xampu e nas soluções metanólicas de cetoconazol, expostas à luz (UV ou Visível), observou-se que a diminuição do teor do fármaco geralmente foi maior em solução. A matéria-prima também apresentou rápida degradação quando em presença de luz.

5.5. ESTABILIDADE QUÍMICA

5.5.1. Degradação ácida e alcalina

Considerando os resultados obtidos no estudo de fotoestabilidade em meio ácido (Xb-ceto), procedeu-se à avaliação do cetoconazol frente a ácido e base. Constatou-se que o teor do cetoconazol (matéria-prima), após 4 horas em HCl *M*, foi de 95,6 % e os teores obtidos para as formas farmacêuticas Xb-ceto, Form1 e Form2 foram 94,3, 93,9 e 94,7 %, respectivamente. Durante a avaliação dos produtos frente a ácido foi possível verificar a formação de produtos de degradação, em todos os cromatogramas, no tempo de retenção de 3,4 minutos (Figura 42).

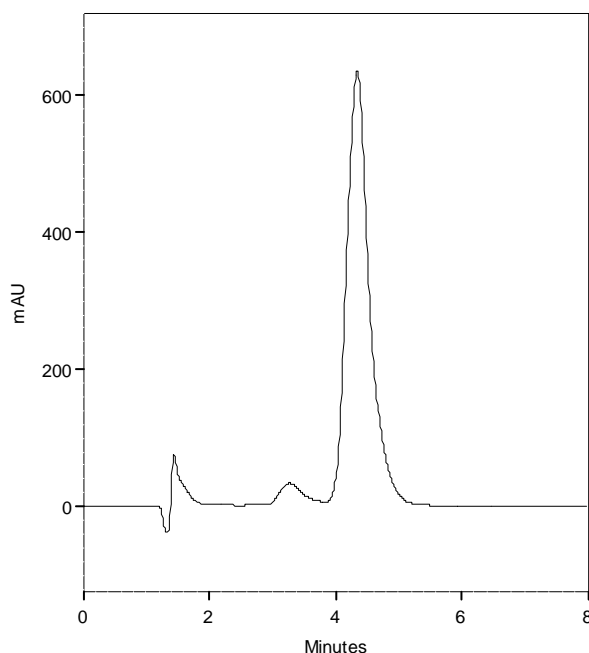


Figura 42- Cromatograma do Xb-ceto (concentração teórica 320 µg/ml) em presença de HCl *M*, por 4 horas, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Os teores obtidos para as amostras frente ao NaOH *M* por 4 horas foram 101,7, 99,1, 99,3 e 99,7 % para matéria-prima, Xb-ceto, Form1 e Form2, respectivamente. Não foi possível verificar alteração no cromatograma, indicando maior estabilidade do fármaco em meio alcalino. A partir dos resultados encontrados comprova-se a maior instabilidade do cetoconazol em pHs muito ácidos.

5.5.2. Degradação com peróxido de hidrogênio

A fim de verificar se ocorria oxidação do fármaco, o cetoconazol matéria-prima e em formas farmacêuticas foi exposto ao peróxido de hidrogênio 30 %, por 30 minutos, sob agitação. Os teores obtidos do fármaco foram de 30,4, 68,8, 74,8 e 75,4 % para a matéria-prima, Xb-ceto, Form1 e Form2, respectivamente. Deixou-se a matéria-prima em repouso por 4 horas, tornando a avaliá-la após este período,

encontrando teor de 7,7 %. Foi possível verificar, em todos os cromatogramas, a presença do produto de degradação em torno do tempo 3,4 minutos (Figuras 43 e 44). O pico do peróxido de hidrogênio aparece em 1,8 minutos (Figura 45).

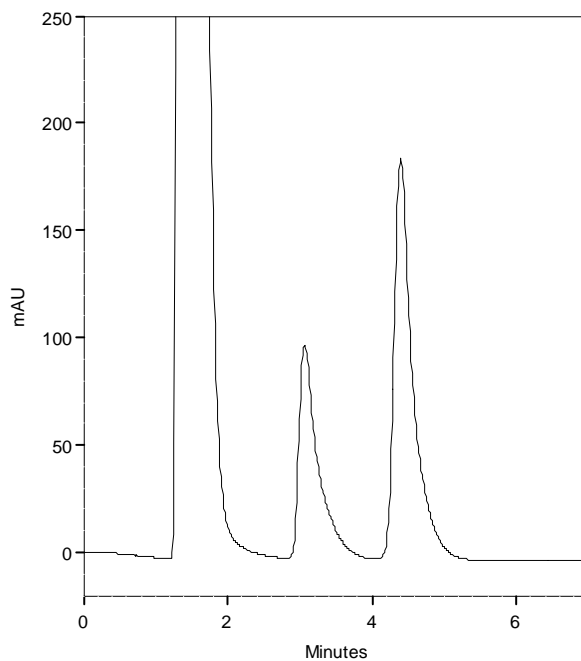


Figura 43 - Cromatograma do cetoconazol matéria-prima (concentração teórica 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$) em presença de peróxido de hidrogênio 30 %, por 30 minutos, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

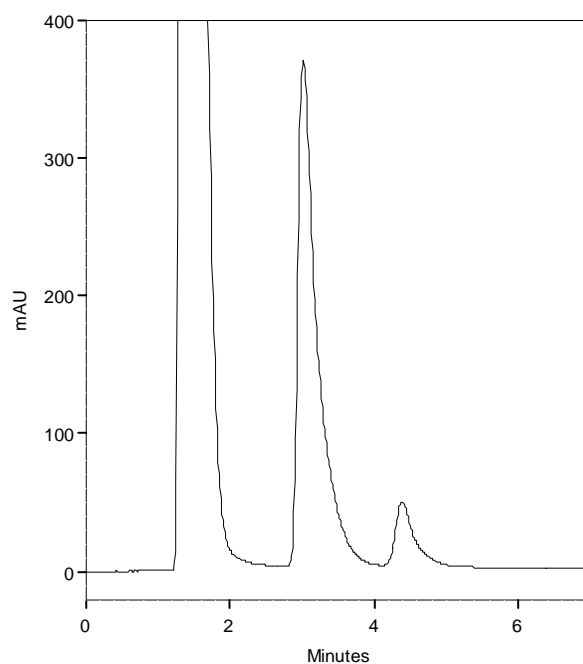


Figura 44 - Cromatograma do cetoconazol matéria-prima (concentração teórica 320 µg/ml) em presença de peróxido de hidrogênio 30 %, por 4 horas, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

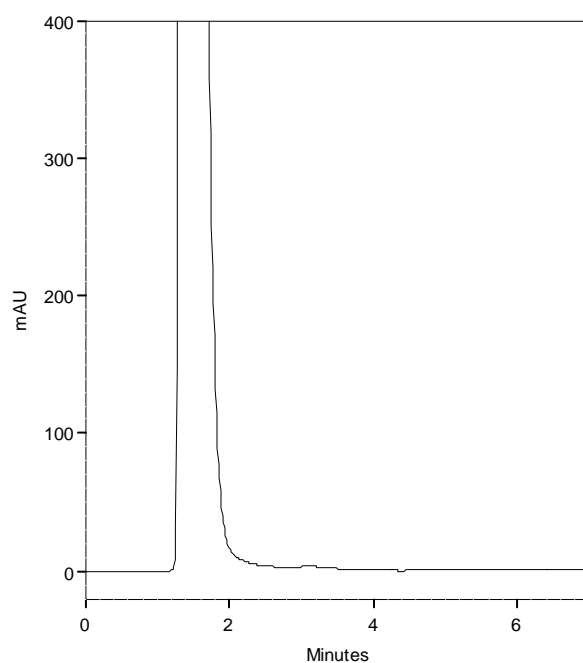


Figura 45 - Cromatograma do peróxido de hidrogênio 30 %, obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

5.6. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Durante a realização dos estudos de estabilidade fotoquímica e química do cetoconazol foi possível detectar a formação de diversos produtos de degradação. Entretanto, observou-se maior alteração no cromatograma no tempo de retenção de 3,4 minutos para matéria-prima, xampu e solução metanólica.

Após testes preliminares para o desenvolvimento do método empregado para o isolamento dos produtos de interesse (CLAE semipreparativa), foi possível verificar a presença de dois produtos de degradação majoritários no tempo de retenção de 3,4 minutos. Assim sendo, optou-se pelo isolamento destes dois produtos que foram denominados Fr1 e Fr2, para posterior realização de métodos espectroscópicos para identificação.

Para verificar se os produtos de degradação (Fr1 e Fr2), formados em solução e em xampu frente às luzes UV ou visível, eram os mesmos, foi empregada a CLAE com auxílio de detector de arranjo de diodos. Segundo WATSON (1999), o detector de arranjo de diodos é um tipo avançado de detector UV sendo útil na determinação de pureza de misturas complexas, onde picos cromatográficos podem estar sobrepostos. Além disso, é capaz de fornecer espectros de UV de cada pico cromatográfico colaborando na identificação de substâncias não conhecidas.

Após análise dos espectros obtidos (Figuras 46, 47, 48 e 49) foi possível verificar que os produtos de degradação, formados em solução e em xampu após exposição às luzes UV ou visível, apresentavam o mesmo perfil. Sendo assim, optou-se por isolar as duas frações em solução metanólica frente à luz UV-C. Nestas condições a degradação do fármaco é mais acelerada, pois quanto menor o λ da radiação mais energia é absorvida. Além disso, na formulação de xampu os excipientes fornecem uma certa proteção ao fármaco sendo a degradação mais lenta.

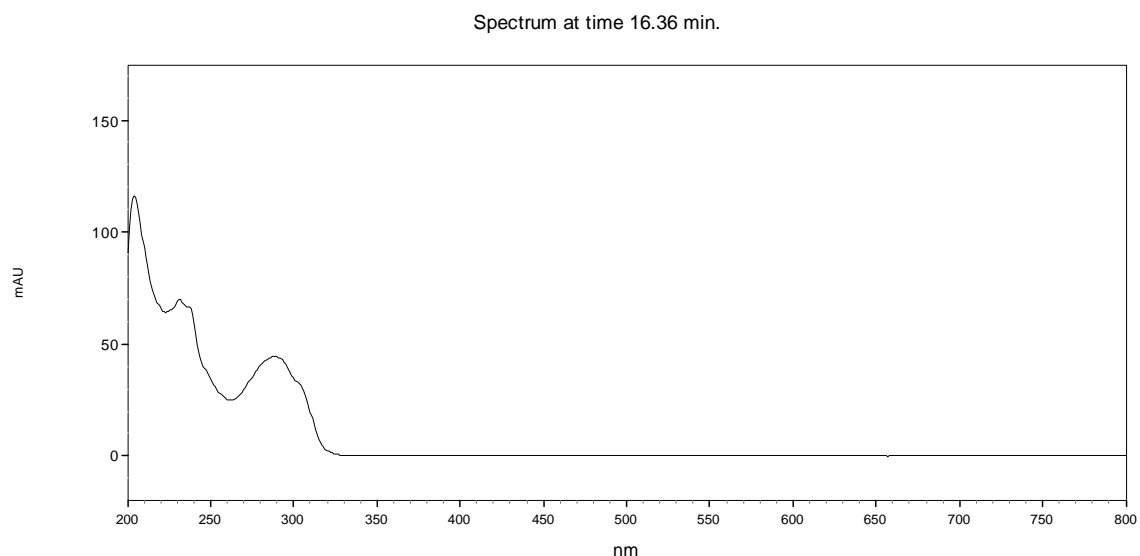


Figura 46 – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr1 para amostra de Sol-ceto frente à luz UV-C por 30 horas, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

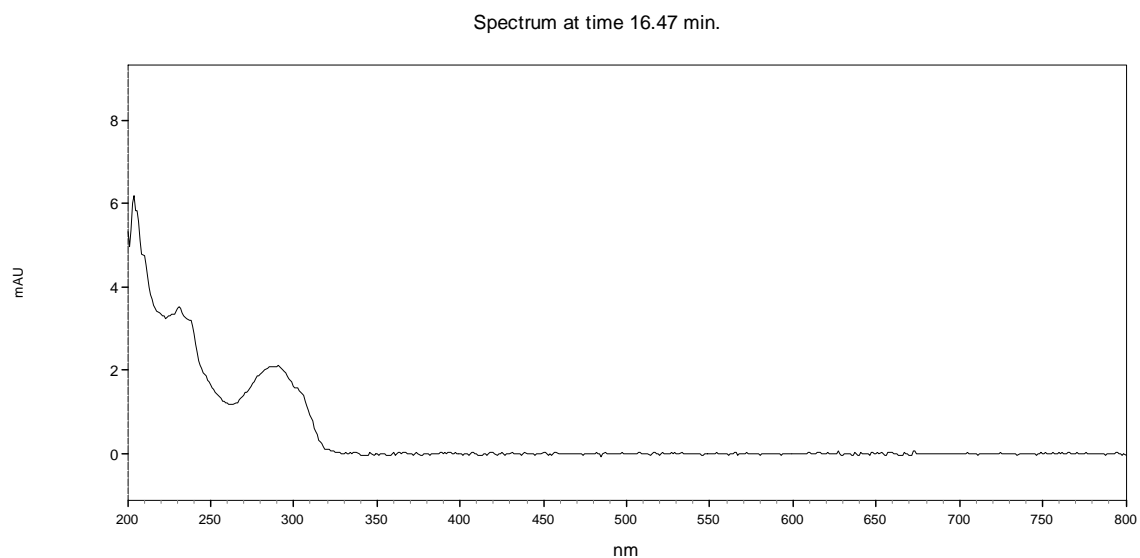


Figura 47 – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr1 para amostra de Xb-ceto frente à luz natural por 26 meses, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

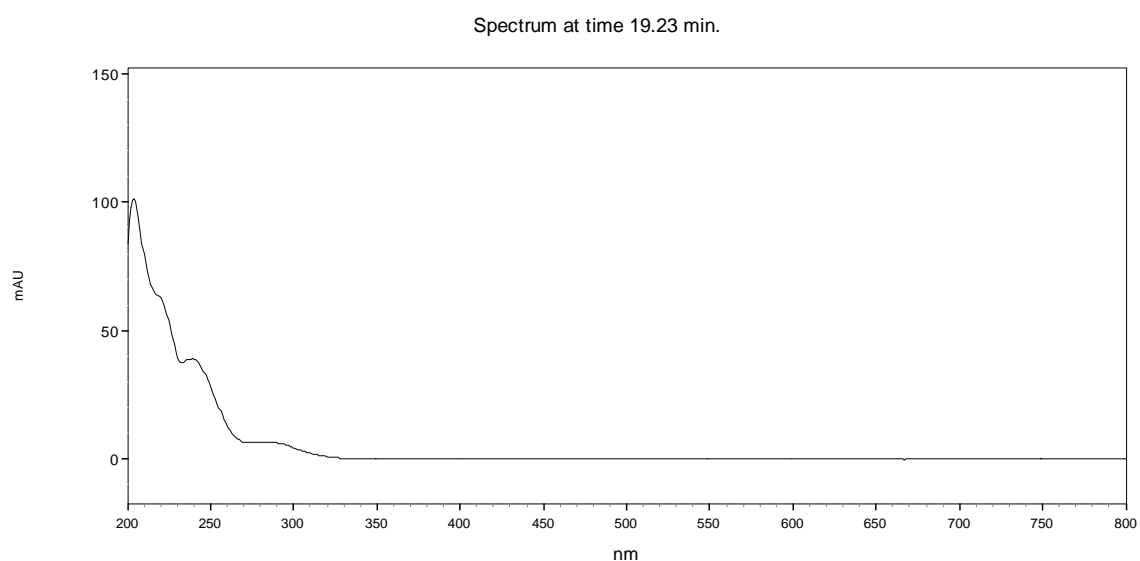


Figura 48 – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr2 para amostra de Sol-ceto frente à luz UV-C por 30 horas, obtidos com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

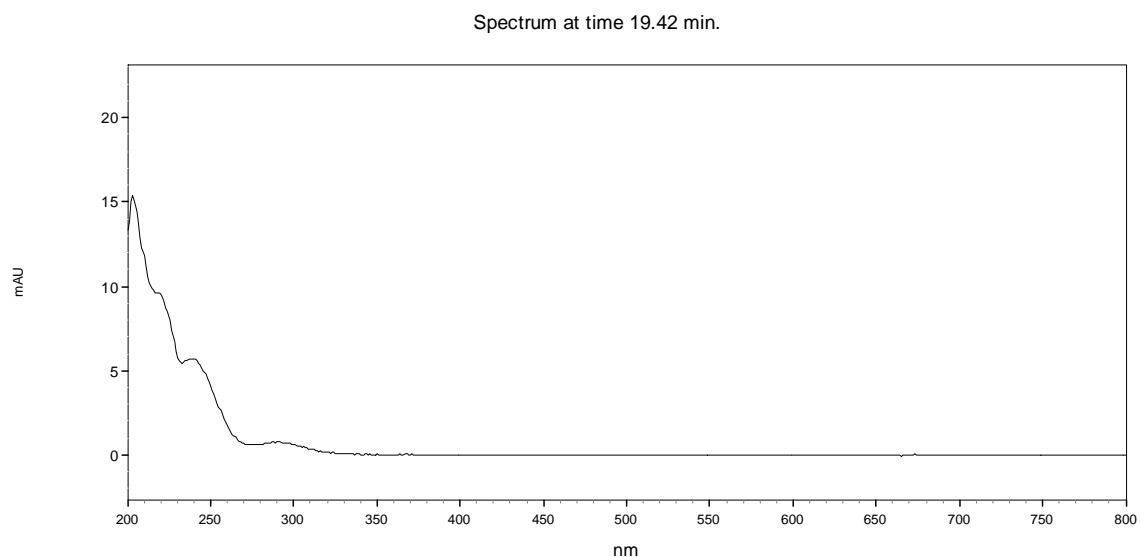


Figura 49 – Espectro de absorção na região do UV e Visível da Fr2 para amostra de Xb-ceto frente à luz natural por 26 meses, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

5.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa

As condições cromatográficas, utilizadas para o isolamento de produtos de degradação, foram totalmente alteradas em comparação à CLAE analítica. O tempo de corrida da análise foi de 30 minutos, o cetoconazol apresentou tempo de retenção de 25 minutos e as frações denominadas Fr1 e Fr2 apresentaram tempos de retenção em torno de 16,4 e 19,2 minutos, respectivamente (Figura 50).

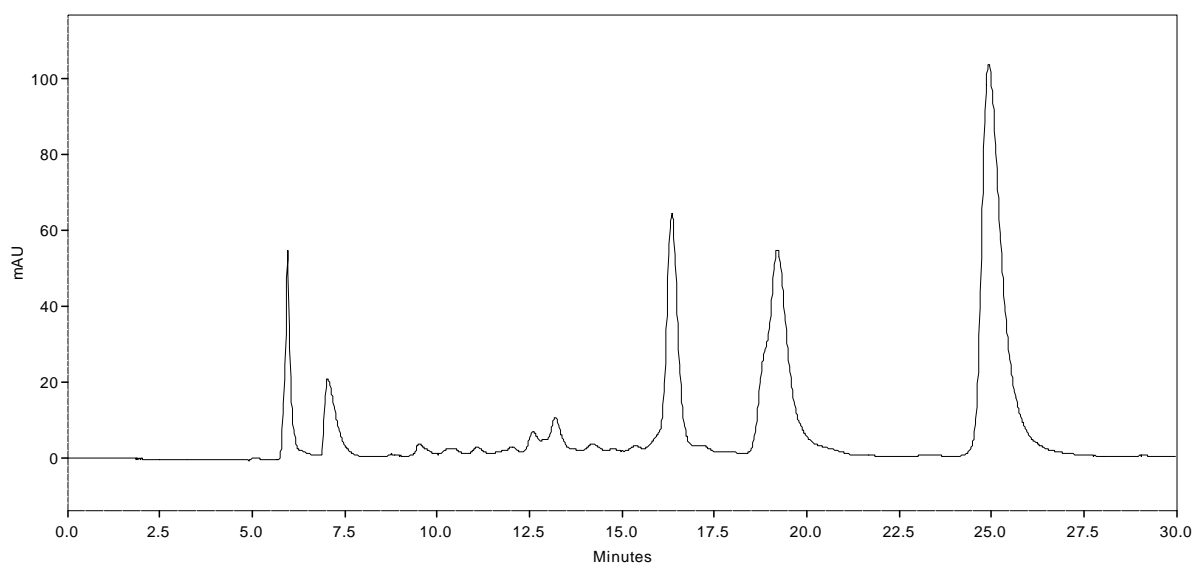


Figura 50 – Cromatograma da solução metanólica de cetoconazol, exposta à luz UV-C por 30 horas, obtido através de CLAE semipreparativa com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

5.6.2. Determinação da pureza

Durante a coleta das frações fez-se o monitoramento da pureza das mesmas. Fr1 e Fr2 foram avaliadas através da determinação da pureza do pico cromatográfico, utilizando detector de arranjo de diodos, o qual mostra gráfica e numericamente, a similaridade do espectro do pico da substância de interesse. As Figuras 51 e 52 apresentam os cromatogramas dos produtos isolados e as Figuras 53 e 54 apresentam as curvas de pureza para Fr1 e Fr2, respectivamente.

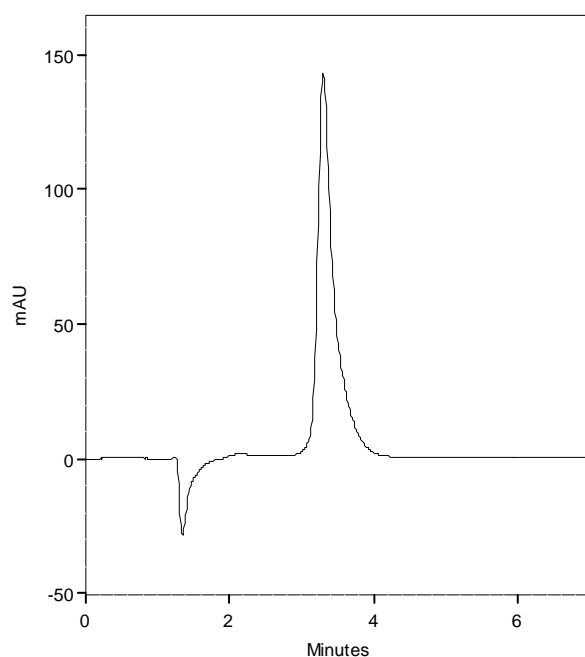


Figura 51- Cromatograma de Fr1 isolada (tempo 16,4 min.), obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

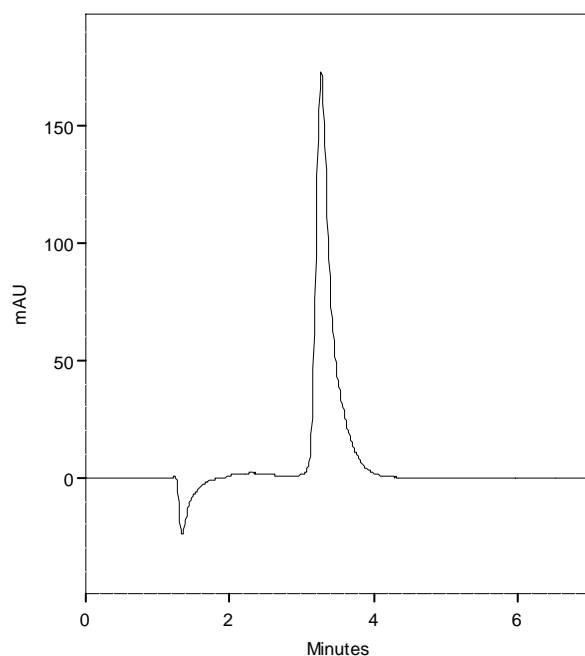


Figura 52- Cromatograma de Fr2 isolada (tempo 19,2 min.), obtido através de CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

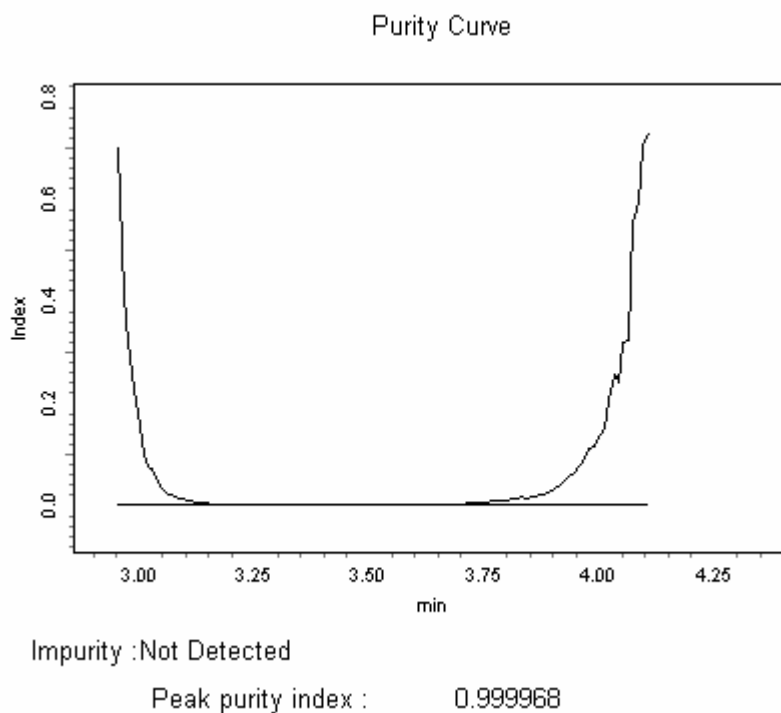


Figura 53 - Curva de pureza apresentada para Fr1, indicando a pureza total do pico de 0,999968, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

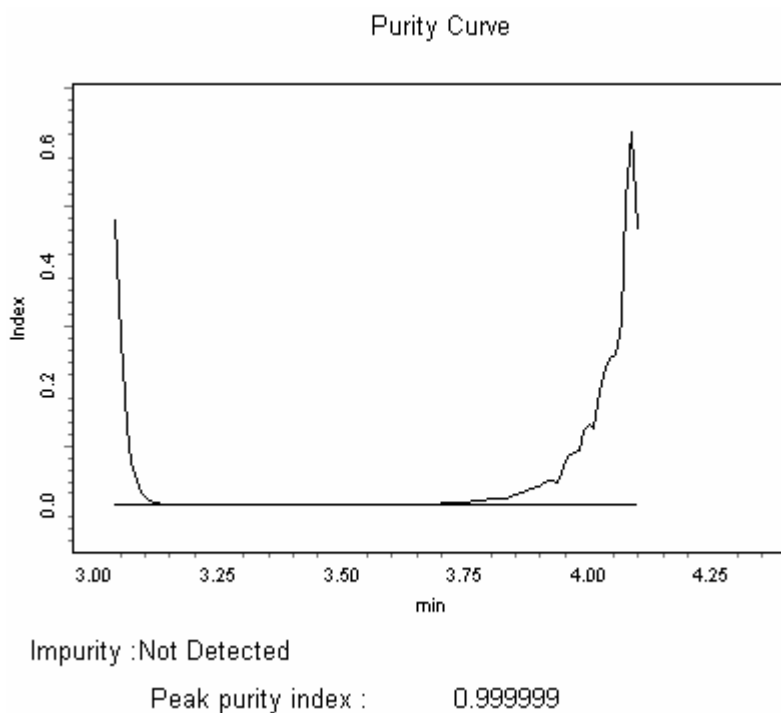


Figura 54 - Curva de pureza apresentada para Fr2, indicando a pureza total do pico de 0,999999, obtido por CLAE com comprimento de onda de 225 nm, utilizando coluna de fase reversa C-8 e monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V)/acetato de amônio-água (1:200, p/V) (7:3, V/V) pH 5,5 como fase móvel.

Com o auxílio do detector de arranjo de diodos foram traçados espectros de absorção nas regiões do UV e visível para o cetoconazol (Figura 55), Fr1 (Figura 46) e Fr2 (Figura 48). A fração isolada (Fr1) apresenta máximos de absorção em 200, 225, 238 e 290 nm, não apresentando absorção na região do visível, e a fração isolada (Fr2) apresenta máximos de absorção em 203, 220, 232, 238 e 288 nm, não apresentando absorção na região do visível. O pico relativo ao cetoconazol apresentou máximos de absorção em 200, 231 e 291 nm.

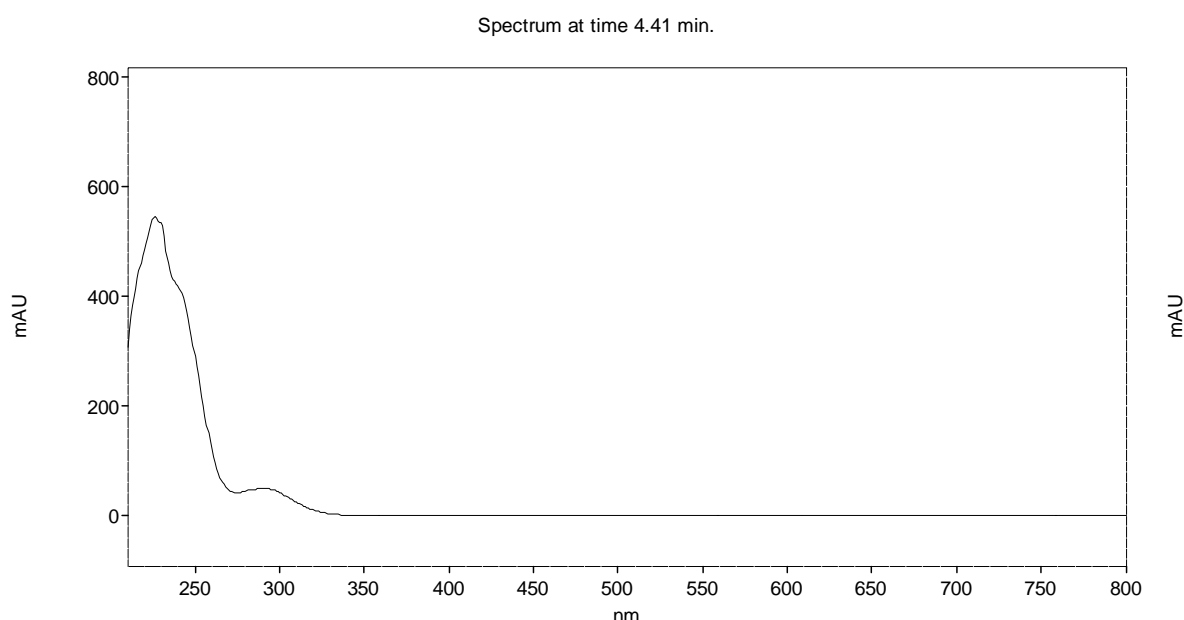


Figura 55 – Espectro de absorção na região do UV e Visível do pico relativo ao cetoconazol para amostra de Sol-ceto frente à luz UV-C, obtido com auxílio de detector de arranjo de diodos através de CLAE semipreparativa, utilizando coluna Waters Spherisorb® C-8 e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

Após a constatação da pureza das frações, as mesmas foram colocadas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, para evaporação do solvente, tendo o cuidado com a temperatura. O metanol evaporou rapidamente restando no balão apenas água, acetato de amônio e o produto de degradação. Com o objetivo de evitar a interferência do acetato de amônio, procedeu-se à extração do produto de degradação com clorofórmio, uma vez que os produtos formados mostraram-se bem solúveis neste solvente. Após evaporou-se o clorofórmio em evaporador rotatório.

Isolou-se 4 mg de cada um dos produtos e os mesmos apresentaram-se como um pó branco e foram mantidos em dessecador até realização dos espectros.

5.6.3. Análise do cetoconazol

Após revisão de literatura não foram encontrados trabalhos apresentando espectros de RMN para o cetoconazol. Sendo assim, foi necessária a análise espectroscópica do cetoconazol SQR. As Figuras 56 e 57 apresentam a estrutura e o espectro de RMN ^1H do cetoconazol SQR, respectivamente. Na Tabela 30 estão apresentados os deslocamentos químicos (δ), multiplicidade, constante de acoplamento (J) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro ampliado.

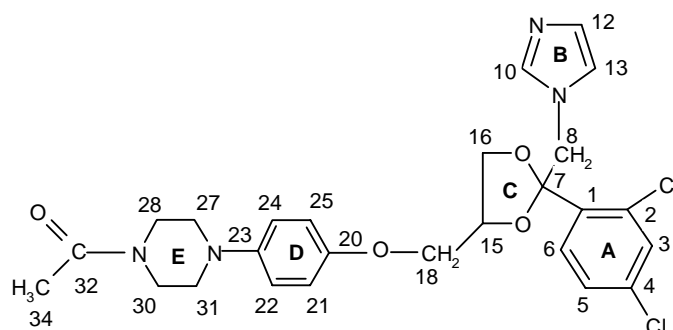


Figura 56 – Estrutura química do cetoconazol com identificação de carbonos e anéis aromáticos

Tabela 30 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ^1H do cetoconazol SQR, obtido em espectrômetro BRUKER (200 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 56)
2,06	s	3	34
2,96	m	4	H axiais (27, 28, 30, 31)
3,27	m	1	16
3,54	m	2	18
3,66	m	4	H equatoriais (27, 28, 30, 31)
3,80	m	1	16
4,28	m	1	15
4,42	Sistema AB, J (14,7Hz)	2	8
6,67-6,84	Sistema AA'BB' J (8,9 Hz)	4	21, 22, 24, 25
6,92	s	1	13 ou 12
6,95	s	1	12 ou 13
7,18	dd, J (1,6Hz e 8Hz)	1	5
7,39	d, J (1,6Hz)	1	3
7,51	d, J (8Hz)	1	6
7,62	s	1	10

* s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipletto

A Figura 58 apresenta o espectro totalmente desacoplado de RMN ^{13}C do cetoconazol SQR. Na Tabela 31 estão apresentados os deslocamentos químicos (δ) dos sinais observados no espectro ampliado.

Tabela 31 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuições dos carbonos para cetoconazol SQR a partir dos espectros de RMN-¹³C, obtido em espectrômetro VARIAN (300 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
C1	134,43
C2	135,64
C3	127,04
C4	132,79
C5	121,01
C6	128,32
C7	107,81
C8	51,03
C10	138,63
C12	129,34
C13	131,15
C15	74,57
C16	67,35
C18	67,42
C20	152,68
C21 e C25	115,05
C22 e C24	118,58
C23	145,50
C27	50,48
C28	41,27
C30	46,18
C31	50,84
C32	168,77
C34	21,18

Com auxílio da LC-MS obteve-se o cromatograma (Figura 59) da amostra que foi degradada em presença da luz UV-C. Após foi feito o espectro de massas do pico relativo ao cetoconazol (tempo de retenção de 24,7 minutos).

A Figura 60 apresenta o espectro de massas do cetoconazol. O cetoconazol protonado perde a acetila e origina m/z de 491, de acordo com CHEN e colaboradores (2002). O fragmento em m/z de 220 corresponde à perda de $C_{14}H_{13}O_2N_2Cl_2$ do íon molecular e o aparecimento do pico em 82 m/z é relativo à porção do anel imidazólico.

Figura 60 – Espectro de massas do pico relativo ao cetoconazol, obtido através de sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray acoplado ao sistema de CLAE, utilizando coluna Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

5.6.4. Análise do produto de degradação denominado Fr1

O espectro de RMN-¹H do produto de degradação isolado, denominado Fr1, está apresentado na Figura 61. Na Tabela 32 estão apresentados os deslocamentos químicos (δ), multiplicidade, constante de acoplamento (J) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro ampliado.

Tabela 32 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN-¹H do Fr1, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 64)
2,12	s	3	34
3,05	m	4	H axiais (27, 28, 30, 31)
3,58-3,79	m	4	H equatoriais (27, 28, 30, 31)
4,10	m	2	18
4,18	m	1	16
4,25	Sistema AB, J (13,3 Hz)	2	8
4,35	m	1	16
4,71	m	1	15
6,85-6,90	Sistema AA'BB' J (6,8 Hz)	4	21, 22, 24,25
6,92	s	1	12 ou 13
7,15	s	1	13 ou 12
7,33	dd, J (1,8 Hz e 8,3 Hz)	1	5
7,48	d, J (8,3 Hz)	1	6
7,52	m	1	3
7,71	m	1	4
8,05	s	1	10

* s = singlete, d = dublete, dd = duplo dublete, m = multiplete

Após a análise do espectro de RMN-¹H obtido para o produto de degradação denominado Fr1 foi possível verificar alteração quando comparado ao espectro do cetoconazol SQR. Verifica-se importante modificação na região do anel aromático A (Figura 64). É possível observar a presença de um hidrogênio a mais na região, indicando a possível perda do cloro na posição do carbono 4 e entrada de

hidrogênio. O anel *orto*-substituído pode ser verificado, pois o espectro apresenta os 4 hidrogênios do anel sendo que o mais desblindado é o hidrogênio da posição 4. Além disso, verificou-se também que os hidrogênios das posições 13, 15, 16 e 18 ficaram mais desblindados, e os dois hidrogênios da posição 8 ficaram mais blindados.

Após análise do espectro totalmente desacoplado de ^{13}C para a Fr1 (Figura 62) foi possível observar a existência dos sinais que estão apresentados na Tabela 33. Com auxílio dos subespectros DEPT (intensificação sem distorção por transferência de polarização), os sinais puderam ser discriminados em CH_3 , CH_2 e CH . Os sinais dos carbonos quaternários foram identificados em comparação com o espectro totalmente desacoplado.

Tabela 33 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuições dos carbonos para Fr1 a partir dos espectros de RMN-¹³C, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
C1	131,45
C2	136,30
C3	123,94
C4	127,73
C5	120,17
C6	125,61
C7	105,26
C8	51,99
C10	130,89
C12	128,34
C13	129,80
C15	76,00
C16	67,01
C18	68,04
C20	153,03
C21 e C25	115,56
C22 e C24	118,81
C23	146,06
C27	50,64
C28	41,48
C30	46,37
C31	51,02
C32	168,98
C34	19,15

Na Fr1 foi possível verificar que todos os carbonos da molécula de cetoconazol continuam presentes e, além disso, verificou-se a presença de CH que foi atribuído ao carbono 4 ($\delta=127,73$) e a ausência de um C quaternário, demonstrando a perda do cloro e entrada de hidrogênio (anel *orto*-substituído).

A espectrometria de massas em conjunto com a cromatografia líquida é um método muito útil para determinar ou confirmar a identidade de fármacos e seus metabólitos, impurezas e produtos de degradação. Segundo WATSON (1999), na espectrometria de massas os fragmentos moleculares são gerados em uma região de alto vácuo ou imediatamente antes da amostra entrar na região de alto vácuo, podendo utilizar uma variedade de métodos para a produção do íon.

Com auxílio da LC-MS obteve-se o cromatograma (Figura 59) da amostra que foi degradada em presença da luz UV-C e a partir do pico relativo à Fr1 (tempo de retenção de 16,42 minutos) foi feito o espectro de massas (Figura 63).

Foi possível verificar que os resultados obtidos na espectroscopia de RMN estão de acordo com os resultados obtidos através da análise do espectro de massas. Analisando o espectro da Fr1 verifica-se o pico base em 497 m/z , indicativo da massa molecular do produto. Como o peso molecular do cetoconazol é 531 a perda de um átomo de cloro do anel aromático e entrada de um hidrogênio leva a formação de um produto com menor peso molecular.

No espectro também foi possível verificar a perda da acetila originando m/z de 455 e o fragmento em m/z de 220 corresponde a perda de $C_{14}H_{13}O_2N_2Cl$ do íon molecular.

Figura 63 – Espectro de massas do pico relativo a Fr1, obtido através de sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray acoplado ao sistema de CLAE, utilizando coluna Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

Após a análise do conjunto de espectros obtidos para a Fr1, verificou-se que o cetoconazol, sob ação da luz, perde o cloro da posição 4. A estrutura proposta está apresentada na Figura 64.

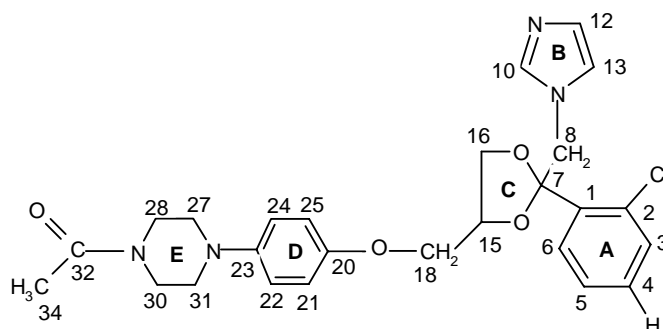


Figura 64 – Estrutura proposta para produto de degradação isolado denominado Fr1: 1-acetil-4-{4-[2-(2-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina).

5.6.5. Análise do produto isolado denominado Fr2

O espectro de RMN-¹H do produto de degradação isolado, denominado Fr2, está apresentado na Figura 65. Na Tabela 34 estão apresentados os deslocamentos químicos (δ), multiplicidade, constante de acoplamento (J) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro ampliado.

Após a análise do espectro de RMN-¹H obtido para Fr2 também foi possível verificar alteração quando comparado ao espectro do cetoconazol SQR. Da mesma forma que a Fr1, verifica-se importante modificação na região do anel aromático **A** (Figura 68). O surgimento do sistema AA'BB' é facilmente observado, indicando substituição *para* do anel aromático. Segundo PAVIA e colaboradores (2001), anéis aromáticos *para*-substituídos são facilmente reconhecidos, pois apresentam quatro linhas padrão.

No espectro da Fr2 também pode-se verificar que os hidrogênios relativos à posição 8 sofreram maior alteração no deslocamento químico. Isto pode ser

explicado, pois, com a perda do cloro (eletronegativo), os hidrogênios ficaram mais blindados.

Tabela 34 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ^1H do Fr2, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 68)
2,12	s	3	34
3,05	m	4	H axiais (27, 28, 30, 31)
3,26	m	1	16
3,6	m	2	18
3,65-3,80	m	4	H equatoriais (27, 28, 30, 31)
3,83	m	1	16
4,15	Sistema AB, J (4,8 Hz)	2	8
4,35	m	1	15
6,72-6,90	Sistema AA'BB', J (8,9 Hz)	4	21, 22, 24,25
6,92	s	1	12 ou 13
6,98	s	1	13 ou 12
7,34-7,46	Sistema AA'BB' J (8,4 Hz)	4	2, 3, 5, 6
7,5	s	1	10

* s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipeto

Após análise do espectro totalmente desacoplado de ^{13}C para a Fr2 (Figura 66) foi possível observar a existência dos sinais que estão apresentados na Tabela 35. Da mesma forma que para a Fr1, com auxílio dos subespectros DEPT, os sinais puderam ser discriminados em CH_3 , CH_2 e CH . Verifica-se a formação de um anel *para*-substituído pois os CHs do anel A (C2 e C6) e (C3 e C5) apresentaram deslocamentos químicos equivalentes.

Tabela 35 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuições dos carbonos para Fr2 a partir dos espectros de RMN-¹³C, obtido em espectrômetro BRUKER AMX 500 (500 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
C1	135,18
C2 e C6	128,46
C3 e C5	127,26
C4	137,92
C7	108,12
C8	53,75
C10	131,66
C12	128,45
C13	130,56
C15	74,89
C16	67,46
C18	67,95
C20	152,98
C21 e C25	115,30
C22 e C24	118,79
C23	145,75
C27	50,70
C28	41,50
C30	46,39
C31	51,06
C32	168,97
C34	21,30

O espectro de massas da Fr2 obtido com auxílio da LC-MS está apresentado na Figura 67. É possível verificar o pico mais intenso em 499 m/z , indicativo da massa molecular do produto formado. Da mesma forma que para a Fr1, verificou-se a perda de um átomo de cloro do anel aromático **A** e entrada de um hidrogênio. Entretanto, para a Fr1 verificou-se a presença do pico base de 497 m/z e para a Fr2 de 499 m/z . Esta diferença pode ser explicada pois, provavelmente, na Fr2 a molécula estava protonada nos nitrogênios “A” e “C” (Figura 11). No espectro, também, foi possível verificar a perda da acetila originando m/z 457 e o fragmento em m/z de 220 corresponde a perda de $C_{14}H_{13}O_2N_2Cl$ do íon molecular.

Figura 67 – Espectro de massas do pico relativo a Fr2, obtido através de sistema de espectrometria de massas – ionização eletrospray acoplado ao sistema de CLAE, utilizando coluna Waters Spherisorb® S5 C8 (10 x 250 mm) e metanol-água-acetato de amônio (7:3:0,0025 V/V/p) como fase móvel.

Após a análise do conjunto de espectros da Fr2, verificou-se que o cetoconazol, sob ação da luz, perde o cloro da posição 2. A estrutura proposta para Fr2 está apresentada na Figura 68.

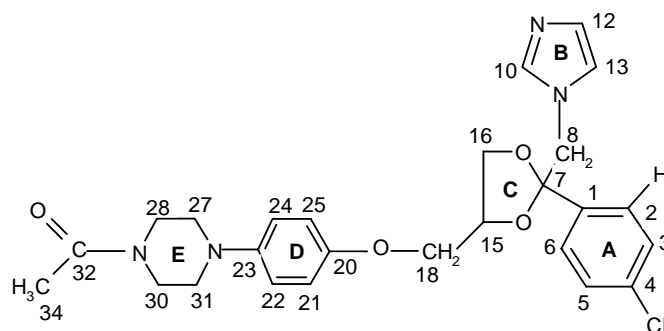


Figura 68 – Estrutura proposta para produto de degradação isolado denominado Fr2: (1-acetil-4-{4-[2-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxilanyl-4-metoxi]fenil}piperazina).

Verificou-se que os dois produtos isolados sofreram a perda de cloro, sendo que para a Fr1 foi o cloro da posição 4 e para a Fr2 foi o cloro da posição 2. Os dois produtos isolados não são responsáveis pela alteração de cor que a formulação sofre. Provavelmente, a alteração na coloração do produto final ocorra devido à presença de outros produtos de degradação em pequenas quantidades, uma vez que foram isolados os produtos majoritários.

5.7. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA BIOLÓGICA

Deve-se considerar como candidatos potenciais a estes testes, matérias-primas e produtos acabados que se enquadram no grupo dos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, fármacos e materiais de acondicionamento (PINTO *et al.*, 2000).

Para os ensaios utilizaram-se duas amostras de xampu, a amostra de Xb-ceto com teor de 103,3 % e amostra com teor de 41,4 %, que havia sido exposta à lâmpada UV-C. O objetivo dos ensaios foi a comparação dos resultados entre as duas formulações para verificar se os produtos de degradação formados poderiam aumentar o grau de irritação do produto.

A amostra Xb (xampu base) não foi avaliada, pois é reconhecido que, na maioria das vezes, o agente tensoativo é responsável pela irritação no olho do coelho. Sendo assim, optou-se por não avaliar esse produto para que fosse utilizado um número menor de animais.

O teste de Draize, por utilizar animais, na avaliação da irritação dos produtos, é bastante questionado. Esse problema resultou em vários estudos direcionados a métodos que utilizam tecidos e células vivas.

Objetivando à validação de métodos alternativos ao teste de Draize, comissão formada pelo governo britânico e membros da comunidade europeia desenvolveram estudo interlaboratorial para sugerir métodos substitutos dos ensaios *in vivo*. Após obtenção dos resultados concluiu-se que alguns métodos poderiam predizer o potencial de irritação ocular, mas com precisão muito baixa e utilidade prática questionável (BALLS *et al.*, 1995).

A COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) também desenvolveu estudos de validação de métodos alternativos com o objetivo de avaliar a sua habilidade de predizer o potencial de irritação ocular. Os resultados

obtidos indicaram que os métodos não poderiam ser considerados como válidos para substituir o teste de Draize (BRANTON *et al.*, 1997).

Atualmente, muitos estudos têm sido feitos para obtenção de métodos *in vitro*, que possam ser padronizados e validados, podendo ser utilizados como substituição ao teste de Draize, sem a utilização dos animais.

Sendo assim, foi necessária a realização de dois testes para a avaliação da segurança biológica dos produtos: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*.

5.7.1. Avaliação da toxicidade aguda com efeito local

Efetou-se o teste de irritação ocular em coelho, pois o mesmo é indicado para produtos com potencial considerável de contato acidental com os olhos; dentre eles pode-se citar: sabonetes levemente ácidos ou básicos, xampus, soluções de limpeza, cremes e loções, delineadores e outros.

Os coelhos foram examinados 24, 48, 72 h e sete dias após a instilação do xampu no olho direito. O olho não tratado serviu como controle. Os resultados obtidos para as amostras encontram-se nas Tabelas 36 e 37.

Tabela 36 – Valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize (item 4.9.1.1.), para amostra de Xb-ceto não degradada.

Coelho	24 horas	48 horas	72 horas	7 dias
<i>1</i>	21	17	10	2
<i>2</i>	21	12	8	0
<i>3</i>	33	24	17	4
<i>4</i>	33	33	17	4
<i>5</i>	23	17	8	2
<i>Média</i>	26,20	20,60	12,00	2,40

Tabela 37 – Valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize (item 4.9.1.1.), para amostra de Xb-ceto degradada.

Coelho	24 horas	48 horas	72 horas	7 dias
<i>1</i>	21	15	8	2
<i>2</i>	17	8	6	0
<i>3</i>	19	17	6	2
<i>4</i>	12	10	6	0
<i>5</i>	12	10	6	0
<i>Média</i>	16,20	12,00	6,40	0,80

Com os valores obtidos determinou-se o grau de irritação das amostras. Para o Xb-ceto não degradado (teor de 103,3 %) o produto mostrou-se irritante moderado

(Classe III), da mesma forma, o Xb-ceto contendo os produtos de degradação (teor de 41,4 %) mostrou-se um produto irritante moderado (Classe III).

5.7.2. Avaliação *in vitro*

O desenvolvimento dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos, por volta dos anos 40, propiciaram os experimentos com culturas de tecido, fornecendo a base de diversas pesquisas. A primeira linhagem celular isolada a partir de tecido subcutâneo de camundongo, recebeu o nome de linhagem L. Desta linhagem, em 1948, por técnica de clonagem ocorreu o isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929, até hoje utilizada nos estudos de citotoxicidade (CRUZ, 2003).

A linhagem celular utilizada na realização deste teste foi NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1), células de tecido conjuntivo de camundongo, proveniente da American Type Culture Collection. Atualmente, esse banco de células fornece linhagens certificadas e elabora manuais de controle de qualidade, onde todos os cuidados para caracterização e manutenção de uma linhagem são descritos. Estes procedimentos podem ser adotados por todos os laboratórios que utilizam as células na pesquisa e no diagnóstico.

As culturas celulares assumem importância nos testes de toxicidade pois são sensíveis, reprodutíveis, fáceis de estabelecer e gerenciar, com menores custos. Atualmente, sistemas de células encontram utilização para avaliar o potencial citotóxico de componentes cosméticos, materiais médico-hospitalares, produtos farmacêuticos e químicos. A citotoxicidade é baseada nos efeitos da substância-teste sobre a integridade celular, crescimento celular e alterações de parâmetros específicos bioquímicos ou fisiológicos (PINTO *et al.*, 2000).

O método de difusão em ágar emprega uma camada de células, à qual se sobrepõe meio de cultura para células (Eagle) adicionado de 1,5 ou 1,0 % de ágar. É

incorporado ao meio, vermelho neutro, que é capaz de corar as células saudáveis (corante vital). A superfície de ágar proporciona um sistema flexível para testar uma variedade de amostras: sólidos, pós e amostras líquidas impregnadas em discos de papel.

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados. Utilizou-se o vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) que em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade/morbidade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação do corante (HARBELL *et al.*, 1997).

O grau de citotoxicidade é baseado na extensão de células descoradas ao redor das amostras (tamanho do halo formado), assim como em índice de lise, parâmetros macro e microscópicos, respectivamente.

Os resultados obtidos, após leitura dos halos formados, estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38– Valores dos índices de zona obtidos após a leitura das placas de culturas celulares, utilizando método de difusão em ágar e linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1), para as amostras de Xb-ceto e Xb-ceto degradado.

Placas	IZ Xb-ceto (103,3 %)	IZ Xb-ceto degradado (41,4 %)	Controle positivo	Controle negativo
1	4	4	4	0
2	4	4	4	0
3	4	4	4	0
4	4	4	4	0

IZ: índice de zona obtido após leitura das placas

As duas formulações apresentaram severo efeito tóxico, ao redor da amostra, para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1).

Com os resultados obtidos na avaliação das amostras de xampu, pelo teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*, pode-se verificar que não houve diferença entre as amostras, isto é, a formulação contendo os produtos de degradação não apresentou grau de irritação superior ao do xampu contendo cetoconazol não degradado.

Como já comentado anteriormente, é possível que o grau de irritação, verificado para as duas amostras avaliadas, seja devido ao tensoativo, dificultando a avaliação da irritação causada pelo cetoconazol e seus produtos de degradação. Entretanto, o objetivo do trabalho era verificar se poderia ocorrer uma alteração no grau de irritação da amostra, em função da presença dos produtos de degradação.

Observou-se diferença nos resultados obtidos entre os dois métodos empregados; isso pode ser explicado pois os dados obtidos *in vitro* nem sempre extrapolam corretamente os resultados obtidos através de estudos *in vivo*. No teste de irritação ocular há mais de um mecanismo envolvido, pois o olho é um sistema complexo. Sendo assim, um único ensaio *in vitro* não é suficiente para uma completa avaliação. Por este motivo, até agora, nenhum único teste *in vitro* foi amplamente aceito como alternativo ao teste de Draize.

CONCLUSÕES

- ✓ As matérias-primas de cetoconazol avaliadas através de características organolépticas, cromatografia em camada delgada, determinação do ponto de fusão, rotação específica e espectrofotometria na região do ultravioleta e infravermelho apresentaram conformidade com a sua SQR.
- ✓ As matérias-primas, quantificadas através de volumetria em meio não-aquoso, apresentaram conformidade com especificação farmacopéica.
- ✓ As formas farmacêuticas, contendo cetoconazol, foram avaliadas através de cromatografia em camada delgada, determinação da densidade e do pH, encontrando resultados adequados.
- ✓ O método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, preciso, específico, exato e robusto para a quantificação de cetoconazol na forma farmacêutica xampu.
- ✓ O ensaio microbiológico – método de difusão em ágar – cilindros em placas foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, preciso e exato para a quantificação de cetoconazol na forma farmacêutica xampu.
- ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos, cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio microbiológico, demonstrou que não houve diferença significativa nos teores de cetoconazol em xampu, nas condições experimentais utilizadas.
- ✓ Para o estudo da fotoestabilidade utilizando lâmpadas UV-A e UV-C:
 - ❖ todas as amostras avaliadas sofreram degradação, sendo que a degradação na lâmpada UV-C foi maior. Através de cromatografia líquida de alta eficiência foi possível detectar os produtos de degradação majoritários em todas as amostras, sendo a degradação do fármaco maior na forma de solução ou como matéria-prima;

- ❖ Foi observada diminuição na atividade do cetoconazol frente ao microrganismo teste (*Candida albicans*), quando amostras de xampu, expostas à lâmpada UV-C, foram avaliadas através do ensaio microbiológico.
- ✓ Para as amostras expostas à luz natural:
 - ❖ a solução metanólica de cetoconazol, em frasco transparente, desenvolveu coloração avermelhada, diminuição no teor e foi possível visualizar a presença de produtos de degradação;
 - ❖ a solução metanólica de cetoconazol, em frasco opaco, desenvolveu leve coloração avermelhada e aumento no teor do fármaco, provavelmente devido à evaporação do solvente. Não foi possível visualizar os produtos de degradação. Entretanto, após ampliação da escala, se verificou alteração do cromatograma indicando que mesmo em pequenas quantidades, o produto de degradação produz coloração;
 - ❖ o xampu de cetoconazol (Xb-ceto), em frasco transparente, desenvolveu coloração avermelhada, diminuição no teor e foi possível visualizar a presença de produtos de degradação. A amostra manteve teores não inferiores a 90 % por um período de 10 meses;
 - ❖ o xampu de cetoconazol (Xb-ceto), em frasco opaco, desenvolveu coloração avermelhada, diminuição no teor e foi possível visualizar a presença de produtos de degradação. Entretanto, a amostra manteve teores não inferiores a 90 % durante todo o período de análise (26 meses);
 - ❖ os teores das formulações comerciais não diminuíram significativamente durante o período de análise (17 meses). Não foi possível detectar a presença de produtos de degradação;
 - ❖ amostras de xampu (Xb-ceto), expostas à luz natural por 17 meses, foram avaliadas através do ensaio microbiológico. Foi observada diminuição na atividade do cetoconazol frente ao microrganismo teste (*Candida albicans*);

- ❖ constatou-se que o fármaco sofre degradação fotoquímica, pois todas as amostras expostas à luz tiveram degradação maior em comparação com as amostras protegidas da luz.
- ✓ No estudo da estabilidade química, o xampu de cetoconazol sofreu degradação ácida (94,3 %) e por ação do peróxido de hidrogênio (68,8 %). O cetoconazol (matéria-prima) apresentou forte degradação por ação do peróxido de hidrogênio (30,4 %).
- ✓ O pH ácido e a exposição à luz favorecem a instabilidade do cetoconazol.
- ✓ Após estudo de fotoestabilidade foram isolados dois produtos de degradação majoritários, denominados Fr1 e Fr2. Estes foram identificados, através de espectroscopia de RMN e espectrometria de massas, sendo verificado a perda de cloro das posições 4 (Fr1) e 2 (Fr2).
- ✓ Verificou-se que a cor desenvolvida nas formulações não é proveniente dos produtos majoritários que foram isolados e elucidados, demonstrando que o produto que leva a alteração de cor da formulação se forma em menor quantidade.
- ✓ O teste de irritação ocular em coelho demonstrou que a presença dos produtos de degradação nas formulações, mesmo em quantidades elevadas, não aumentou a irritação ocular em coelho.
- ✓ A avaliação da citotoxicidade permitiu verificar que a presença dos produtos de degradação, mesmo em quantidades elevadas, não aumentou o grau de irritação das amostras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de medicamentos de qualidade e a conservação desta durante a comercialização do produto, interessa tanto aos fabricantes quanto aos consumidores. Portanto o estudo da estabilidade de matérias-primas e formas farmacêuticas é de fundamental importância.

É reconhecido que o cetoconazol em algumas formas farmacêuticas, em especial o xampu, altera a coloração muito rapidamente. Face a isso este trabalho teve como objetivo principal o estudo da estabilidade fotoquímica do cetoconazol na forma farmacêutica xampu.

Para o desenvolvimento do trabalho foram desenvolvidos e validados métodos de análise quantitativa do xampu de cetoconazol. O fármaco, não apresenta métodos de análise para a forma farmacêutica xampu em compêndios oficiais. Assim sendo, os métodos validados permitiram a publicação de artigos:

- ❖ STAUB, I., SCHAPOVAL, E.E.S., BERGOLD, A.M. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 292, p. 195-199, 2005.
- ❖ STAUB, I., BERGOLD, A.M. Determination of ketoconazole in shampoo by high performance liquid chromatography. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 387-390, 2004.

No estudo de fotoestabilidade foi possível verificar que o fármaco sofre alteração em presença da luz, sendo que dois produtos de degradação majoritários foram isolados e identificados através de RMN ^1H e ^{13}C . A estrutura proposta para produto de degradação isolado denominado Fr1 é 1-acetil-4-{4-[2-(2-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina) e para a Fr2 é 1-acetil-4-{4-[2-(4-clorofenil)-2-(1*H*-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina).

Com os resultados obtidos, também foi possível verificar, que com o aumento do tempo de exposição do fármaco à luz, a coloração vermelha

intensificava. Os dois produtos isolados não são responsáveis pela alteração na cor da formulação; provavelmente o produto de degradação que leva ao desenvolvimento de cor seja formado em pequena quantidade sendo difícil o seu isolamento. Um artigo contendo os resultados do estudo de estabilidade está sendo redigido para posterior publicação.

Verificou-se que o fármaco, após exposição intensa à luz, diminui a atividade antifúngica, entretanto seu grau de irritação, verificado através de testes *in vitro* e *in vivo*, não é alterado na formulação contendo produtos de degradação em comparação à formulação íntegra.

Sendo assim, para a matéria-prima e formas farmacêuticas contendo o cetoconazol adequada proteção da luz deve ser adotada durante sua produção e armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOETY, E.M., KHATTAB, F.I., KELANI, K.M., ABOU AL-ALAMEIN, A.M. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, v. 57, p. 931-938, 2002.

ABOUNASSIF, M. A., EL SHAZLY, B. M. D1-differential potentiometric and proton NMR spectrometric determinations of ketoconazole and its formulations. *Analytical Letters*, v. 22, p. 2233-2247, 1989.

ALLEN, L.V., ERICKSON, M.A. Stability of ketoconazole, metolazone, metronidazole, procainamide hydrochloride, and spirinolactone in extemporaneously compounded oral liquids. *American Society of Health-System Pharmacists*, v. 53, p. 2073-2078, 1996.

AL-MESHAL, M.A. Determination of ketoconazole in plasma and dosage forms by high performance liquid chromatography and microbiological method. *Analytical Letters*, v. 22, p. 2249-2263, 1989.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALLEN, L.V. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6 ed. São Paulo: Premier, 2000. 397 p.

ANVISA: Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899, 20. mai.2003., *DOU.*, 02. jun.2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/89903re.htm>>.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 15.ed. Arlington, 1990. v.1.

BALLS, M., BOTHAM, P.A., BRUNER, L.H., SPIELMANN, H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA*, v. 9, p. 871-929, 1995. Resumo.

BARCHIESI, F., ARZENI, D., COMPAGNUCCI, P., Di FRANCESCO, L.F., GIACOMETTI, A., SCALISE, G. In vitro activity of five antifungal agents against clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, v. 36, p. 437-440, 1998.

BISSCHOP, M.P., MERKUS, J.M., SCHEYGROND, H., VAN CUTSEN, J., VAN KUY, A. Treatment of vaginal candidiasis with ketoconazole, a new, orally active, antimycotic. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 9, p. 253-259. 1979. Resumo.

BORELLI, D., BRAN, J.L., FUENTES, J., LEGENDRE, R., LEIDERMAN, E., LEVINE, H.B., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. Ketoconazole, an oral antifungal: laboratory and clinical assessment of imidazole drugs. *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 55, p. 657-661, 1979. Resumo.

BOUILLON, C. Shampoos. *Clinics in Dermatology*, v. 14, p. 113-121, 1996.

BRANTON, P.G., BRUNER, L.H., CHAMBERLAIN, M., SILVA, O., DUPUIS, J., EARL, L.K., LOVELL, D.P., PAPE, W.J.W., UTTLEY, M., BAGLEY, D.M., BAKER, F.W., BRACHER, M., COURTELLEMONT, P., DECLERCQ, L., FREEMAN, S., ATEILING, W., WALKER, A.P., CARR, G.J., DAMI, N., THOMAS, G., HARBELL, J., JONES, P.A., PFANNENBECKER, U., SOUTHEE, J.A., TCHENG, M., ARGEMBEAUX, H., CASTELLI, D., CLOTHIER, R., ESDAILE, D.J., ITIGAKI, H., JUNG, K., KASAI, Y., KOJIMA, H., KRISTEN, U., LARNICOL, M., LEWIS, R.W., MARENUS, K., MORENO, O., PETERSON, A., RASMUSSEN, E.S., ROBLES, C., STERN, M. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published Association with BIBRA*, v. 11, p. 141-179, 1997. Resumo.

CARR, M.M., PRYCE, D.M., IVE, F.A. Treatment of seborrhoeic dermatitis with ketoconazole: Response of seborrhoeic dermatitis of the scalp to topical ketoconazole. *British Journal of Dermatology*, v. 116, p. 213-216, 1987. Resumo.

CHEN, Y., FELDER, L., JIANG, X., NAIDONG, W. Determination of ketoconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 774, p. 67-78, 2002.

CRUZ, A.S. Testes de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos. Tese de Doutorado- Universidade de São Paulo, 103 p. 2003.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. (Ed.) *Introdução a métodos cromatográficos*. 7 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. 279 p.

COX, F.W., STILLER, R.L., SOUTH, D.A., STEVENS, D.A. Oral ketoconazole for dermatophyte infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v. 6, p. 455-462, 1982. Resumo.

CURRIE, B., ROCHE, V., ZITO, S.W. *Medicinal chemistry case study workbook*. New York: Williams e Wilkins, 1996.

DISCHER, C.A. *Química Inorgânica Farmacêutica*. Madrid: Alhambra, 1966. 583 p.

D'LEÓN, L.F.P. Estudos de estabilidade de produtos cosméticos. *Cosmetics e Toiletries*, v. 13, p. 54-64, 2001.

DOBREV, H., ZISSOVA, L. Effect of ketoconazole 2 % shampoo on scalp sebum level in patients with seborrhoeic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 77, p. 132-134, 1997. Resumo.

DRAIZE, J.H., WOODARD, G., CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 82, p. 377-390, 1944.

DUROVICOVA, J., SIEGFRIED, L., SABOL, M., DUROVIC, E. Susceptibility of *Candida albicans* isolated in oral pre-cancerous lesions to selected antifungal agents. *Biologia*, v. 56, p. 61-64, 2001.

EL-SHABOURI, S.R., EMARA, K.M., KHASHABA, P.Y., MOHAMED, A.M. Charge-transfer complexation for spectrophotometric assay of certain imidazole antifungal drugs. *Analytical Letters*, v. 31, p. 1367-1385, 1998. Resumo.

ERCHIGA, V.C., MARTOS, A.O., CASAÑO, A.V., ERCHIGA, A.C., FAJARDO, F.S. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *British Journal of Dermatology*, v. 143, p. 799-803, 2000.

ESPINEL-INGROF, A. History of medical mycology in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, p. 235-272, 1996.

FAERGEMANN, J. Treatment of seborrhoeic dermatitis of the scalp with ketoconazole shampoo. A double-blind study. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 70, p. 171-172, 1990. Resumo.

FAERGEMANN, J. Management of seborrheic dermatitis and pityriasis versicolor. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 1, p. 75-80, 2000.

F. Bras. IV. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FERREIRA, A. O. *Guia prático da farmácia magistral*. 2 ed. Juiz de Fora: Pharmabooks, 2002. 847 p.

FOYE, W.O., LEMKE, T.L., WILLIAMS, D.A. *Principles of medicinal chemistry*. 5 ed. New York: Williams and Wilkins, 2002. 1114 p.

FREEDBERG, I.M., EISEN, A.Z., WOLFF, K., AUSTEN, K.F., GOLDSMITH, L.A., KATZ, S.I. (Ed.) *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 6 ed. New York: MacGraw-Hill, 2003. v. 2. 2594 p.

GERNTHOLTZ, T., PASCOE, M.D., BOTHA, J.F., HALKETT, J., KAHN, D. The use of a cyclosporin-ketoconazole combination: making renal transplantation affordable in developing countries. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 60, p. 143-148, 2004. Resumo.

GO, I.H., WIENTJENS, D.P., KOSTER, M. A double-blind trial of 1 % ketoconazole shampoo versus placebo in the treatment of dandruff. *Mycoses*, v. 35, p. 103-105, 1992. Resumo.

GOKMEN, O., SENOZ, S., GULEKLI, B., ISIK, A.Z. Comparison of four different treatment regimes in hirsutism related to polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, v. 10, p. 249-255, 1996. Resumo.

GREER, D.L. Successful treatment of tinea capitis with 2 % ketoconazole shampoo. *International Journal of Dermatology*, v. 39, p. 302-304, 2000.

GRAYBILL, J.R., WILLIAMS D.M., VAN CUTSEN, E., DRUTZ, D.J. Combination therapy of experimental histoplasmosis and cryptococcosis with amphotericin B and ketoconazole. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 2, p. 551-558, 1980. Resumo.

GUPTA, A.K., BLUHM, R., SUMMERBELL, R. Pityriasis versicolor. *European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 16, p. 19-33, 2002.

GUPTA, A.K., BLUHM, R. Seborrheic dermatitis. *European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 18, p. 13-26, 2004.

GUPTA, A.K., MADZIA, S.E., BATRA, R. Etiology and management of seborrheic dermatitis. *Dermatology*, v. 208, p. 89-93, 2004.

HARBELL, J.W., KOONTZ, S.W., LEWIS, R.W., LOVELL, D., ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 35, p. 79-126, 1997.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.) *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana, 1996.1269 p.

HEERES, J., BACKX, L.J., MOSTMANS, J.H., VAN CUTSEN, J. Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent

orally active broad-spectrum antifungal agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 1003-1005, 1979. Resumo.

HENNING, H., KASPER, B., LUDERS, C.J. Ketoconazole-induced hepatitis. Case report. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, v. 21, p. 709-715, 1983. Resumo.

HEPP, K. Estabilidade do cetoconazol em shampoos. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, 1999. Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia.

HEWITT, W. *Microbiological assay: an introduction to quantitative principles and evaluation*. New York: Academic Press, 1977.

HEYDEN, Y.V., NGUYET, A.N.M., DETAEVERNIER, M.R., MASSART, D.L., VERCAMMEN, J.P. Simultaneous determination of ketoconazole and formaldehyde in a shampoo: liquid chromatography method development and validation. *Journal of Chromatography A*, v. 958, p. 191-201, 2002.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996a.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996b.

INCQS Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual INCQS n. 66.3330.0004, 2002.

JACKSON, E.M. Worldwide availability of coaltar shampoos threatened. *American Journal of Contact Dermatitis*, v. 7, p. 131-134, 1996.

JORDAN, W.C. The effectiveness of combined saquinavir and ketoconazole treatment in reducing HIV viral load. *Journal of the National Medical Association*, v. 90, p. 622-624, 1998. Resumo.

KEDOR-HACKMANN, E.R.M., NERY, M.F.M., SANTORO, M.I.R.M. Determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, v. 27, p. 363-376, 1994.

KELANI, K., BEBAWY, L.I., ABDEL-FATTAH, L., AHMAD, A.K.S. Spectrophotometric determination of some n-donating drugs using DDQ. *Analytical Letters*, v. 30, p. 1843-1860, 1997.

KEOGH, A., SPATT, P., MCCOSKER, C., MACDONALD, P., MUNDY, J., KAAN, A. Ketoconazole to reduce the need for cyclosporine after cardiac transplantation. *New England Journal of Medicine*, v. 333, p. 628-633, 1995. Resumo.

KOROLKOVAS, A. *Análise farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984. p. 119-143.

KOROLKOVAS, A., FRANÇA, F.F.A.C., CUNHA, B.C.A. *Dicionário terapêutico guanabara*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003/2004.

KUMMER, K.P., OKONOMAH, A.D., BRADSHA, W.G. Stability of ketoconazole in ethanolic solutions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 17, p. 577-580, 1991.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANIG, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste, 2001. v. 2.

LANGE, D.S., RICHARDS, H.M., GUARNIERI, J., HUMENIUK, J.M., SAVIN, R.C., REYES, B.A., HIKMAN, J., PARISER, D.M., PARISER, R.J., SHEREETZ, E.F., GROSSMAN, R.M., GISOLDI, E.M., KLAUSNER, M.A. Ketoconazole 2 % shampoo in the treatment of tinea versicolor: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 39, p. 944-950, 1998. Resumo.

LAVERDIERE, M., HOBAN, D., RESTIERI, C., HABEL, F. In vitro activity of three new triazoles and one echinocandian against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, p. 119-123, 2002.

LEGENDRE, R., STELTZ, M. A multi-center, double-blind comparison of ketoconazole and griseofulvin in the treatment of infections due to dermatophytes. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 2, p. 586-591, 1980. Medline. Resumo.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, p. 1-10, 2004.

MARCINIEC, B.; BUGAI, A.; KEDZIORA, W. Kinetic studies of the photodegradation of nitroimidazole derivatives in the solid state. *Pharmazie*, v.52, p.220-223, 1997.

NENOFF, P., HAUSTEIN, U.F. The effect of antiseborrhoeic agents on *Pytirosporum ovale* in vitro. *Hautarzt*, v. 45, p. 464-467, 1994.

NGUYET, A.N.M., TALLIEU, L., VERCAMMEN, J.P., MASSART, D.L., HEYDEN, Y.V. Validation of an HPLC method on short columns to assay ketoconazole and formaldehyde in shampoo. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 32, p. 1-19, 2003.

NUDELMAN, N.S. *Estabilidad de medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneu, 1975. 187 p.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001. 579 p.

PETER, R.U., RICHARZ, U.B. Successful treatment and prophylaxis of scalp seborrhoeic dermatitis and dandruff with 2 % ketoconazole shampoo: results of a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Dermatology*, v. 132, p. 441-445, 1995. Resumo.

Ph. Eur. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4ed. Strasbourg: Convention on elaboration of an European Pharmacopoeia, 2002.

PIERARD-FRANCHIMONT, C., PIERARD, G.E., ARRESE, J.E., DE DONKER, P. Effect of ketoconazole 1 % and 2 % shampoos on severe dandruff and seborrhoeic dermatitis: Clinical, squamometric and mycological assessments. *Dermatology*, v. 202, p. 171-176, 2001. Resumo.

PIERARD-FRANCHIMONT, C., PIERARD, G.E. A double blind placebo-controlled study of ketoconazole + desonide gel combination in the treatment of facial seborrheic dermatitis. *Dermatology*, v. 204, p. 334-337, 2002. Resumo

PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2000. 309 p.

PRISTA, L.N., BAHIA, M.F.G., VILAR, E. *Dermatofarmácia e cosmética*. Edição da associação nacional de farmácias. Lisboa, 1995.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed). *Martindale-The extra pharmacopoeia*. 31 ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. 2739 p.

SADEGHI, S., SHAMSIPUR, M. A new extractive-spectrophotometric method for the determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations. *Analytical Letters*, v. 31, p. 2691-2705, 1998.

SAMPAIO, S.A.P., RIVITTI, E.A. *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas, 1998. 1155 p.

SHAPIRO, J., MADDIN, S. Medicated shampoos. *Clinics in Dermatology*, v. 14, p. 123-128, 1996.

SHIMADZU: Manual Shimadzu CLASS-VP™. Chromatography Data System. Instruction Manual. Version 6.1. Kyoto: Shimadzu Scientific Instrument, 2001.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SKIBA, M., SKIBA-LAHIANI, M., MARCHAIS, H., DUCLOS, R., ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 198, p. 1-6. 2000.

SOBH, M., EL-AGROUDY, A., MOUSTAFA, F., HARRAS, F., EL-BEDEWY, M., GHONEIM, M. Coadministration of ketoconazole to cyclosporin-treated kidney transplant recipients: a prospective randomized study. *American Journal of Nephrology*, v. 15, p. 493-499, 1995.

SQUIQUERA, L., PLOTKIN, L., GALIMBERTI, R., LEONI, J. Analysis of the antifungal activity of ketoconazole, zinc pyrithione, and ciclopirox olamine against *Pityrosporum ovale*. A diffusion assay for cultures in solid media. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 7, p. 26-29, 1996.

SQUIRE, R.A., GOODE, K. A randomized, single-blind, single-centre clinical trial to evaluate comparative clinical efficacy of shampoos containing ciclopirox olamine (1.5 %) and salicylic acid (3 %), or ketoconazole (2 % Nizoral) for the treatment of dandruff/seborrheic dermatitis. *The Journal of Dermatological Treatment*, v. 13, p. 51-60, 2002.

STAUB, I., ADAMS, A.I.H., BERGOLD, A.M., FRÖEHLICH, P.E. Avaliação da integridade da fórmula do xampu de cetozonazol. *Infarma*, v. 14, p. 74-76, 2002.

STAUB, I., BERGOLD, A.M. Determination of ketoconazole in shampoo by high performance liquid chromatography. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 23, p. 387-390, 2004.

STAUB, I., SCHAPOVAL, E.E.S., BERGOLD, A.M. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 292, p. 195-199, 2005.

STRIPPOLI, V., PIACENTINI, A., DAURIA, F.D., SIMONETTI, N. Antifungal activity of ketoconazole and other azoles against *Malassezia furfur* in vitro and in vivo. *Infection*, v. 25, p. 303-306, 1997.

THOMA, K., KÜBLER, N. Einfluss der Wellenlänge auf die Photozersetzung von Arzneistoffen. *Pharmazie*, v. 51, p. 660-664, 1996a.

THOMA, K., KÜBLER, N. Photoinstabilität von Arzneistoffen und ihre analytischen Nachweismöglichkeiten. *Pharmazie*, v. 51, p. 919-923, 1996b.

THOMA, K., KÜBLER, N. Untersuchung der Photostabilität von Antimykotika 1. Mitteilung: Photostabilität von Polyenantibiotika. *Pharmazie*, v. 51, p. 885-893, 1996c.

THOMA, K., KÜBLER, N. Einfluss von Hilfsstoffen auf die Photozersetzung von Arzneistoffen. *Pharmazie*, v. 52, p. 122-129, 1997.

TONNESEN, H.H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 225, p. 1-14, 2001.

TONON, D.C., SOARES, M.S., ANDREAZZA, I.F., BRESOLIN, T.M.B., ANDREAZZA, R.C.S. Avaliação do cetococonazol em formulações magistrais. VIII Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, 1999. Livro de Resumos. Florianópolis.

TRACHTENBERG, J., HALPERN, N., PONT, A. Ketoconazole: a novel and rapid treatment for advanced prostatic cancer. *Journal of Urology*, v. 130, p. 152-153, 1983. Resumo.

USP 28. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 28.ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2005.

VAN CUTSEN, J. The antifungal activity of ketoconazole. *American Journal of Medicine*, v. 74, p. 9-15, 1983. Resumo.

VANDEN-BOSSCHE, H., ENGELEN, M., ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 26, p. 5-29, 2003.

VANGERVEN, F., ODDS, F.C. The anti-*Malassezia furfur* activity in vitro and in experimental dermatitis of 6 imidazole antifungal agents – bifonazole, clotrimazole, flutrimazole, ketoconazole, miconazole and sertaconazole. *Mycoses*, v. 38, p. 389-393, 1995.

VELIKINAC, I., CUDINA, O., JANKOVIC, I., AGBABA, D., VLADIMIROV, S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. *Il Farmaco*, v. 59, p. 419-424, 2004.

VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Ed.) *Tratado de infectologia*. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. v. 2. 1015 p.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 1999. 337 p.

WILKINSON, J.B., MOORE, R.J. *Harry's cosmeticology*. 7 ed. New York: Chemical Publishing, 1982. 934 p.

WOLF, R., WOLF, D., TÜZÜN, B., TÜZÜN, Y. Soaps, shampoos and detergents. *Clinics in Dermatology*, v. 19, p. 393-397, 2001.

Tabela 39 - Análise de variância (ANOVA) das áreas determinadas para a obtenção da curva padrão do cetoconazol por CLAE.

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F calc	F tab
<i>Entre</i>	4	1,13777E+15	2,84442E+14	22047,13*	3,48
<i>Regressão linear</i>	1	1,13767E+15	1,13767E+15	88181,11*	4,96
<i>Desvio de linearidade</i>	3	9,55225E+10	3,18408E+10	2,47	3,71
<i>Resíduo</i>	10	1,29015E+11	1,29015E+10		
<i>Total</i>	14	1,13789E+15			

* significativo para $p < 0,05$

Tabela 40 – ANOVA dos dados obtidos no ensaio microbiológico – método de difusão em ágar-cilindros em placas utilizando meio de cultura Ágar Sabouraud-dextrose 2%, *Candida albicans* como microrganismo teste, tempo de incubação de 18 horas e temperatura de 35 ± 2 °C.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calc	F tab
<i>Preparação</i>	1	0,048	0,048	0,23	4,20
<i>Regressão</i>	1	308,669	308,669	1458,29 *	4,20
<i>Desvio de paralelismo</i>	1	0,093	0,093	0,44	4,20
<i>Quadrático</i>	1	0,826	0,826	3,90	4,20
<i>Diferença de quadrático</i>	1	0,034	0,034	0,16	4,20
<i>Entre doses</i>	5	309,669	61,934	292,60 *	2,60
<i>Entre placas</i>	5	1,566	0,313	1,48	2,60
<i>Dentro (erro)</i>	25	5,292	0,212		
<i>Total</i>	35	316,526			

* significativo para $p < 0,05$

Tabela 41 – DPR dos teores encontrados no estudo de fotoestabilidade da solução metanólica (Sol-ceto) e do xampu (Xb-ceto) após exposição à luz natural.

Tempo (meses)	DPR (%) (Solução metanólica)		DPR (%) (Xampu)	
	frasco transparente	frasco opaco	frasco transparente	frasco opaco
0	0,6	0,6	0,1	0,1
1	0,7	0,2	1,9	1,8
2	0,9	0,8	1,0	1,5
4	0,5	0,8	0,3	0,7
6	1,6	0,6	1,8	1,3
8	1,2	0,4	0,7	1,9
10	1,1	0,1	1,3	2,6
12	0,5	0,5	0,4	2,8
14	0,5	2,3	0,2	2,6
17	0,4	1,0	1,3	2,5
19	0,5	1,8	1,4	0,7
22	1,3	2,9	0,8	2,9
26	1,9		1,6	2,4

Tabela 42 – DPR dos teores encontrados no estudo de fotoestabilidade das formulações comerciais (Form1 e Form2).

Tempo (meses)	DPR (%)	
	Form1	Form2
0	1,4	0,5
3	0,1	3,7
6	0,3	4,0
11	1,3	0,2
17	1,6	1,8