UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos**

**Desenvolvimento de metodologia analítica específica e seletiva para a
determinação do nitrato de econazol em cremes**

ANGEL ARTURO GAONA GALDOS

**Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann**

**SÃO PAULO
2008**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos**

**Desenvolvimento de metodologia analítica específica e seletiva para a
determinação do nitrato de econazol em cremes**

ANGEL ARTURO GAONA GALDOS

**Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann**

**SÃO PAULO
2008**

" O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto."

Thomas Huxley

*A Dios padre por darme salud,
sabiduría e iluminar mis pasos
en todos los instantes de mi vida.*

*A mi esposa Mónica y a
mi hijo Sebastián por el amor
y la motivación que me brindan
cada día de mi vida.*

*A mis padres Florencio y Amelia,
y a mi hermano Gustavo por
las palabras de aliento y persistencia,
y por el apoyo y cariño brindado.*

*À Profa. Dra. Erika Rosa Maria
Kedor-Hackmann pela orientação,
apoio e incentivo neste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Aurora Prado, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos Prof. Jivaldo do Rosário Matos e Lucildes Pita Mercuri pelo incentivo, apoio e amizade.

À Profa. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Jorge Luis Seferin Martins pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Anil Kumar Singh, pelas sugestões.

À Profa. Marina Franco Maggi Tavares pelas sugestões, incentivo e uso do equipamento de eletroforese capilar.

Aos colegas de Laboratório Pedro, Ricardo, Ingrid, Joyce, Carla, Mariana, Hellen, Fabio, Marcel, Nayane e Amanda, pelo companheirismo e apoio.

Às funcionárias do laboratório Regina, Iria e Raquel pela colaboração e amizade.

À funcionária Leila Aparecida Bonadio, da biblioteca do conjunto das Químicas, pela conferência das referências utilizadas nesta pesquisa.

Aos funcionários Elizabete Paiva, Elaine Ychico e em especial ao Jorge pela colaboração e amizade.

Ao CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

RESUMO

Neste trabalho realizaram-se provas de identificação qualitativa e quantitativa do nitrato de econazol (matéria-prima); ensaios de caracterização térmica do nitrato de econazol, excipientes e formulação farmacêutica (creme), assim como desenvolvimento de metodologia analítica específica e seletiva para a quantificação do nitrato de econazol na formulação farmacêutica de creme. A caracterização térmica dos excipientes foi realizada usando-se a Termogravimetria (TG). Para a caracterização térmica do nitrato de econazol e da formulação foram empregadas a Termogravimetria, a Termogravimetria Derivada (TG/DTG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Na caracterização térmica da formulação foram identificados e quantificados dois tipos de água com interações diferentes com a matriz. No desenvolvimento da metodologia específica utilizou-se a eletroforese capilar em zona, método linear com concentrações entre 80 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9995; precisão calculada como desvio padrão relativo (DPR) menor de 2%; exatidão do método comprovada mediante teste de recuperação, obtendo-se valores de $100\pm 2,5\%$; limites de detecção e quantificação 1,853 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5,617 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, comprovando-se também que o método é robusto. No desenvolvimento da metodologia seletiva foram usadas a cromatografia líquida de alta eficiência com eluição em gradiente (CLAE) e a eletroforese capilar pelo método da cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). Nestes métodos foram separados o nitrato de econazol, as impurezas relatadas na literatura do nitrato de econazol (4-álcool clorobenzílico, alfa-2,4-diclorofenil-1H-imidazol-1-etanol) e os conservantes presentes na formulação (metilparabeno e propilparabeno). O método seletivo desenvolvido por CLAE foi linear para todas as moléculas, com coeficientes de correlação maiores de 0,99. A precisão calculada para o nitrato de econazol como DPR foi menor de 2%; a exatidão para o nitrato de econazol foi comprovada mediante teste de recuperação, obtendo-se valores de $100\pm 2\%$; comprovou-se também que o método é robusto e que poderia ser aplicado para a quantificação de cada um destes cinco compostos. No método seletivo desenvolvido por MEKC se obteve tempo menor em comparação ao método por CLAE.

ABSTRACT

In this work, were performed qualitative and quantitative identification of econazole nitrate (raw material); thermal characterization of econazole nitrate, excipients and formulation (cream). There also were developed and validated specific and selective analytical methodology for quantitative determination of econazole nitrate in creams. The thermal characterization of drug product excipients was performed using the Thermogravimetry (TG). For the thermal characterization of econazole nitrate drug and their formulation were used the Thermogravimetry, Derivative Thermogravimetry (TG/DTG) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). From cream formulation were identified and quantified two kinds of water which have different interactions with the matrix. As regards to developing of specific methodology was used the capillary zone electrophoresis (CZE). The method was linear, with a correlation coefficient of 0.9995 in the concentration range of 80 to 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of econazole nitrate, precision calculated as relative standard deviation (RSD) was less than 2%, accuracy calculated as percentage of recovery for commercial sample was of $100 \pm 2.5\%$, detection and quantitation limits were 1.853 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 5.617 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The CZE method showed to be robust. For developing of selective methodology were used high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution, and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) methods. Econazole nitrate, related impurities of the drug (4-Chlorobenzyl alcohol, α -2,4-dichlorophenyl-1H-imidazole-1-ethanol) and preservatives (methylparaben, propylparaben) present in the drug product were separated. The HPLC method was linear for all analytes, the correlation coefficients were higher than 0.99. The precision for nitrate econazol in terms of RSD was less than 2%, the percentage of recovery for commercial sample of econazole nitrate was $100 \pm 2\%$, the method is robust and could be applied for the quantitation of the five substances cited above. With the MEKC method developed the five substances were separated in less time compared with HPLC method.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do nitrato de econazol	05
Figura 2	Representação esquemática do fluxo eletroosmótico	17
Figura 3	Tipos de perfis radiais de velocidade de fluxo característicos dos sistemas CE e CLAE	18
Figura 4	Esquema de um equipamento de eletroforese capilar	19
Figura 5	Tipos de introdução de amostra para eletroforese capilar	20
Figura 6	Esquema de equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência	26
Figura 7	Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência	27
Figura 8	Espectro de absorção do nitrato de econazol no UV-Visível	54
Figura 9	Espectro de absorção no infravermelho do nitrato de econazol	55
Figura 10	Identificação do nitrato de econazol mediante reação química	57
Figura 11	Análise cromatográfica do nitrato de econazol Condições: fase fixa: sílica gel GF254; eluente: amônia concentrada : tolueno : dioxano 1:40:60 (v/v/v)	58
Figura 12	Curvas TG/DTG e DSC do nitrato de econazol obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 ml. min ⁻¹	60
Figura 13	Sobreposição das curvas TG obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL min ⁻¹ dos excipientes utilizados na formulação do creme	62
Figura 14	Curvas TG/DTG e DSC obtidas a 1°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do creme de nitrato de econazol	64
Figura 15	Eletroferograma do sistema 1 por CZE. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	66
Figura 16	Eletroferograma do sistema 2 por CZE. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.	67

Figura 17	Eletoferograma do sistema 3 por CZE. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 µm d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.	67
Figura 18	Eletoferograma do sistema 4 por CZE. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 µm d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.	68
Figura 19	Curva de calibração do nitrato de econazol na faixa de concentrações de 80 a 120 µg mL ⁻¹ ; detecção UV 200 nm; padrão interno, imidazol (100µg mL ⁻¹); eletroforese capilar em zona.	69
Figura 20	Eletoferograma referente à solução do placebo da amostra comercial. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 µm d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	73
Figura 21	Eletoferograma referente à solução de amostra comercial contaminada com a impureza DCF. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 µm d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.	73
Figura 22	Perfil cromatográfico do sistema 1 Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente linear); vazão 1,0 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	76
Figura 23	Perfil cromatográfico do sistema 2. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente linear); vazão 1,2 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	76
Figura 24	Perfil cromatográfico do sistema 3. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,2 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm	77

Figura 25	Perfil cromatográfico do sistema 4. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: tampão carbonato de amônio 0,1% pH 6,5 (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,2 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	77
Figura 26	Perfil cromatográfico do sistema 5. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: tampão trietanolamina 0,1% pH 6,4 (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,2 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	78
Figura 27	Perfil cromatográfico do sistema 6. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	78
Figura 28	Perfil cromatográfico do sistema 7. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	79
Figura 29	Cromatograma do sistema 8. Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	79
Figura 30	Cromatograma referente à solução do placebo da amostra comercial (A); cromatograma da amostra comercial (B). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®, fase móvel: álcool metílico: água (eluição gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min ⁻¹ ; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.	84
Figura 31	Cromatograma do sistema 1. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	87
Figura 32	Cromatograma do sistema 2: Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV. 200 nm	87

Figura 33	Cromatograma do sistema 3. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,4% de β-CD; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	88
Figura 34	Cromatograma do sistema 4. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,12% de α-CD; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	88
Figura 35	Cromatograma do sistema 5. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,05% de α-CD; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	89
Figura 36	Cromatograma do sistema 6. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,05% de α-CD; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm	89
Figura 37	Cromatograma do sistema 7. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 10 mM tampão tetraborato de sódio, 50 mM de SDS, 0,05% de α-CD; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perda por dessecação de 1 g de nitrato de econazol mantido em estufa a 100 - 105°C durante 2 horas	56
Tabela 2	Resultados dos fatores de retenção (R_f) para amostras de nitrato de econazol por cromatografia em camada delgada	57
Tabela 3	Resultados da determinação quantitativa do nitrato de econazol por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1 N	59
Tabela 4	Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição do nitrato de econazol obtidos pelas curvas TG/DTG com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹	61
Tabela 5	Dados de temperatura onset (T_{onset}), temperatura de pico (T_{pico}) e entalpias de decomposição e fusão do nitrato de econazol, obtido pela curva DSC com razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹	61
Tabela 6	Resultados obtidos a partir dos dados TG/DTG sob razão de 10°C min ⁻¹ dos excipientes empregados na formulação	63
Tabela 7	Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição do creme de nitrato de econazol obtidos pelas curvas TG/DTG com razão de aquecimento de 1°C min ⁻¹	65
Tabela 8	Dados de temperatura onset (T_{onset}), temperatura de pico (T_{pico}) e entalpias do creme de nitrato de econazol, obtido pela curva DSC com razão de aquecimento de 1°C min ⁻¹	65
Tabela 9	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE	69
Tabela 10	Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por CZE	71
Tabela 11	Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por CZE	72
Tabela 12	Resultados obtidos na determinação da robustez do método específico por CZE com dois equipamentos diferentes para a análise de amostra de nitrato de econazol 100 µg mL ⁻¹	74

Tabela 13	Resultados da comparação estatística da robustez do método específico por CZE com dois equipamentos diferentes para a análise de amostra de nitrato de econazol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	74
Tabela 14	Resultados obtidos na determinação do teor de pureza da amostra comercial pelo método por CZE	75
Tabela 15	Resultados obtidos nas determinações nas curvas de calibrações para o nitrato de econazol, as impurezas e os conservantes, pelo método seletivo por CLAE com eluição gradiente	81
Tabela 16	Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação para o nitrato de econazol, as impurezas e os conservantes, pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente	81
Tabela 17	Resultados obtidos na determinação da precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária) para o nitrato de econazol, pelo do método seletivo por CLAE com eluição em gradiente	82
Tabela 18	Resultados obtidos na determinação da exatidão para o nitrato de econazol pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente	83
Tabela 19	Resultados obtidos na determinação da robustez com a mudança da temperatura para o nitrato de econazol pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente	85
Tabela 20	Resultados obtidos na determinação da robustez com a mudança do comprimento de onda para o nitrato de econazol pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente	85
Tabela 21	Resultados obtidos na determinação do teor de pureza para a amostra do nitrato de econazol, pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Técnicas de separação para a determinação do nitrato de econazol	11
Quadro 2	Fórmula do placebo preparado com os excipientes utilizados na amostra comercial	31
Quadro 3	Sistemas estudados no desenvolvimento da metodologia específica por CZE	38
Quadro 4	Procedimento experimental para o teste de recuperação do método específico por CZE	42
Quadro 5	Sistemas estudados no desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com eluição gradiente	45
Quadro 6	Procedimento para a linearidade do método seletivo por CLAE	47
Quadro 7	Procedimento experimental para o teste de recuperação do método seletivo por CLAE	50
Quadro 8	Sistemas estudados no desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia capilar eletrocinética micelar	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%R	porcentagem de recuperação
ΔH	variação de entalpia
Δm	variação de massa
μ_{EOF}	mobilidade eletroforética
μ_{OBS}	mobilidade eletrosmótica observada
A	intercepto
ACB	4-álcool clorobenzílico (impureza)
AIDS	síndrome de imunodeficiência humana adquirida
CCD	cromatografia em camada delgada
C_E	concentração molar do soluto na fase estacionária
CE	eletroforese capilar
CG	cromatografia gasosa
CLAE G	cromatografia líquida de alta eficiência com eluição gradiente
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
C_M	concentração molar do soluto na fase móvel
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CZE	eletroforese capilar de zona
d.i.	diâmetro interno
DCF	alfa-2,4-diclorofenil-1H-imidazol-1-etanol (impureza)
DDQ	2,3 dicloro 5,6 diciano 1,4 benzoquinona
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DTG	termogravimetria derivada
E	campo elétrico
EOF	fluxo eletrosmótico
F	teste F
GF254	sílica gel com fluorescência a 254 nm
HP- β -CD	hidroxipropil beta ciclodextrina
I	inclinação da curva de calibração
IV	infravermelho
K	constante de distribuição
k'	fator de retenção
L	comprimento da coluna
LC	cromatografia líquida
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
mAU	miliunidades de absorvância
MEEKC	cromatografia capilar eletrocínética micelar por microemulsão
MEKC	cromatografia eletrocínética micelar
N	número de pratos teóricos
NIRS	espectroscopia de refletância no infravermelho
P.I.	padrão interno
PAR	razão das áreas dos picos

p-CA	ácido p-cloranílico
pH	logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio
pK	logaritmo negativo da constante de dissociação do tampão
PTFE	politetrafluoretileno (teflon)
q	carga do íon
r^2	coeficiente de correlação
r	raio do soluto
R_f	fator de retenção
SBE- β -CD	sulfobutil éter beta ciclodextrina
SDS	dodecil sulfato de sódio
t	teste t
T_1	temperatura <i>onset</i> extrapolada
TEA	trietanolamina
T_f	temperatura final extrapolada
TG	termogravimetria
t_M	tempo morto
Tmax	temperatura máxima
t_R	tempo de retenção
u	velocidade linear media do movimento das moléculas na fase móvel
u_x	velocidade de migração
V	velocidade linear media de migração do soluto
V_E	volume da fase estacionaria
V_{EOF}	velocidade do fluxo eletrosmótico
V_{EP}	velocidade eletroforética
V_M	volume da fase móvel
V_{OBS}	velocidade eletroforética observada
$W_{1/2}$	largura do pico na metade da sua altura máxima
α	fator de separação
β -CD	beta – ciclodextrina
ϵ	constante dielétrica do tampão
η	viscosidade do tampão
λ	comprimento de onda
ξ	potencial zeta

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. Nitrato de econazol	03
2.2. Análise térmica	12
2.3. Eletroforese capilar	14
2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência	22
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Material	30
4.1.1. Substâncias de referência	30
4.1.2. Matérias-primas	30
4.1.3. Amostras	31
4.1.4. Solventes e reagentes	32
4.1.5. Soluções e tampões	33
4.1.6. Equipamentos	33
4.2. MÉTODOS	34
4.2.1. Determinação qualitativa e quantitativa do nitrato de econazol matéria-prima	34
4.2.2. Caracterização do nitrato de econazol (matéria-prima) excipientes e formulação farmacêutica empregando as técnicas termoanalíticas	36
4.2.3. Metodologia analítica específica para a determinação de nitrato de econazol na formulação farmacêutica de creme empregando a eletroforese capilar em zona	38

4.2.4.	Metodologia analítica seletiva para a determinação de nitrato de econazol na formulação farmacêutica de creme.....	44
4.2.4.1.	Desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
4.2.4.2.	desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia eletrocinética micelar.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1.	Nitrato de econazol na forma solada.....	54
5.2.	Caracterização do nitrato de econazol (matéria-prima) excipientes e formulação farmacêutica empregando as técnicas termoanalíticas.....	60
5.3.	Metodologia analítica específica para a determinação de nitrato de econazol na formulação farmacêutica do creme empregando a eletroforese capilar em zona.....	65
5.4.	Metodologia analítica seletiva para a determinação de nitrato de econazol na formulação creme.....	75
5.4.1.	Desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia líquida de alta eficiência.....	75
5.4.2.	Desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia eletrocinética micelar.....	86
6.	CONCLUSÕES.....	91
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

INTRODUÇÃO

A terapia antifúngica desenvolveu-se aceleradamente nos últimos tempos, já que poucos agentes antifúngicos sistêmicos tinham sido disponibilizados antes de 1960. A anfotericina B, que é muito efetiva, porém tóxica, por longo período permaneceu como o único agente confiável. Esta inércia foi justificada pela pouca disseminação deste tipo de infecção e porque as micoses tropicais tinham sua distribuição geográfica bem definida³⁸.

Três fatores alteraram esta situação: o crescimento da incidência de septicemia devido a leveduras invasivas e de aspergilose como resultado do uso de terapias médicas e cirúrgicas mais efetivas, porém também mais agressivas; o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e a aparição de novos agentes fúngicos oportunistas. Um estudo realizado nos Estados Unidos entre 1980 e 1989 mostrou que infecções nosocomiais de origem fúngica tinham aumentado em 40%¹⁵.

O número de espécies responsáveis por estas infecções permanece relativamente limitado a *Candida Albicans* (80%), *Aspergillus fumigatus* (15%), *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. As principais espécies isoladas em pacientes com AIDS são *Aspergillus fumigatus* (83%), *Aspergillus flavus* (9%), *Aspergillus niger* (5%) e *Aspergillus terreus* (3%)¹⁵.

O descobrimento da atividade antifúngica dos imidazóis representa considerável avanço no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas. Três grupos podem ser distintos baseados mais em dados históricos que na estrutura química deles. A primeira geração inclui uma variedade de compostos imidazólicos (miconazol, econazol). A segunda geração de compostos imidazólicos está representada pelo cetoconazol, que foi o primeiro composto imidazólico utilizado por via oral. Finalmente, a terceira geração de compostos imidazólicos são os derivados triazóis (fluconazol, itraconazol)³⁸.

O econazol pertence à primeira geração de compostos imidazólicos, usado sob a forma de nitrato. Trata-se de um antifúngico de amplo espectro com aplicação tópica no tratamento de infecções fúngicas da pele^{36,74}. O econazol, como clotrimazol, apresenta

também atividade *in vitro* contra a forma latente do *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos recentes mostraram que o econazol reduziu em 90% a carga bacteriana em pulmões e baço de camundongos infectados com células de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo equivalente à rifampicina. O econazol isoladamente, ou em combinação com drogas tuberculostáticas, não produziu hepatotoxicidade nos camundongos infectados em condições normais^{85,86}.

Métodos para a determinação de nitrato de econazol na matéria-prima são preconizados pela maioria das farmacopéias oficiais^{16,29,80}. No entanto, para formulações farmacêuticas contendo nitrato de econazol apenas a Farmacopéia Européia apresenta uma metodologia oficial²⁹. A maioria das metodologias não oficiais encontradas na literatura para formulações farmacêuticas contendo nitrato de econazol não é específica para o nitrato de econazol, constituindo-se de separações enantioméricas. Ultimamente, o nitrato de econazol tem sido quantificado em amostras biológicas usando-se Espectroscopia de Reflectância no Infravermelho Próximo (NIRS) e CLAE^{20,39,58,59}.

Um problema nos métodos analíticos é a falta de clareza nos termos usados para os diferenciar como específicos ou seletivos, já que o primeiro pode ser definido como um método capaz de quantificar sem equívoco o analito na presença dos produtos de degradação, impurezas, excipientes e aditivos presentes na formulação. Por outra parte, o seletivo é capaz de medir sem equívoco o analito e os produtos de degradação ou impurezas na presença de excipientes e aditivos na formulação¹².

Considerando os fatos acima expostos, o presente trabalho teve como objetivos principais propor metodologia analítica específica para a quantificação do nitrato de econazol mediante a eletroforese capilar e metodologia seletiva para a quantificação de nitrato de econazol, impurezas e conservantes na formulação farmacêutica do creme por cromatografia líquida de alta eficiência e por eletroforese capilar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NITRATO DE ECONAZOL

2.1.1. GENERALIDADES

Micoses são doenças causadas por ação direta de fungos devido tanto a patogenicidade como também as micotoxicoses, os micetismos e as micoalergoses. As micotoxicoses são provenientes de substâncias tóxicas produzidas por bolores; os micetismos são causados por venenos produzidos por cogumelos e as micoalergoses são alergias produzidas por fungos⁶².

Tanto a incidência quanto a gravidade das micoses nos seres humanos tiveram aumento significativo nesses últimos anos, devido, em grande parte, aos avanços na cirurgia, no tratamento do câncer, nos cuidados intensivos, acompanhados do uso aumentado de agentes antimicrobianos de amplo espectro, e em decorrência do aumento de casos de pacientes com AIDS. Essas mudanças tiveram como resultado aumento no número de pacientes com risco de adquirir infecções fúngicas. O surgimento de microorganismos novos e incomuns vem sendo detectado, à medida que se adquire experiência com pacientes imunodeprimidos. Além disso, estes fungos são, em sua maioria, totalmente resistentes aos agentes antibacterianos convencionais¹³.

A localização das micoses no corpo humano varia de acordo com o agente ou com a resistência do hospedeiro. A pitíriase atinge exclusivamente o estrato córneo, a lobomicose ocorre inicialmente no tecido cutâneo e subcutâneo e a candidíase afeta diversas partes, como pele, mucosas, pulmões, intestinos, etc⁶².

Geralmente, as micoses atingem pessoas de qualquer idade, porém, algumas espécies ocorrem em determinadas faixas de idade, como é o caso das tinhas tonsurantes de couro cabeludo, que se manifestam principalmente entre as crianças. Somente as micoses superficiais são transmitidas de pessoa para pessoa^{41,62}.

Por muitas décadas, o desenvolvimento de substâncias antimicóticas foi ofuscado pelo grande impulso dado à bacteriologia. A farmacoterapia das doenças

fúngicas foi revolucionada pela introdução dos azóis orais relativamente atóxicos, contudo, o aparecimento de microorganismos resistentes aos azóis antifúngicos e o aumento do número de pacientes com risco de adquirir infecções micóticas criaram novos desafios^{13, 78}.

Os agentes antifúngicos atualmente disponíveis são classificados em várias categorias: fármacos sistêmicos (orais ou parenterais) para infecções sistêmicas e fármacos tópicos para infecções mucocutâneas¹³.

Antes de 1950, não existia tratamento confiável ou seguro para micoses profundas e a terapêutica das superficiais dependia de preparações tópicas empíricas⁷⁸. O tratamento de infecções por fungos iniciou-se com a descoberta dos antibióticos poliênicos representados pela nistatina e anfotericina B. A nistatina foi isolada por Hazen e Brown do *Streptomyces noursei* em 1949 e disponibilizada comercialmente desde 1951. A anfotericina B foi isolada do fungo *Streptomyces nodosus* em 1956 por Gold e colaboradores. Apesar de suas desvantagens, como administração intravenosa lenta e efeitos adversos, tais como febre, náuseas e toxicidade renal, a anfotericina B foi o único antimicótico fidedigno de amplo espectro de ação até 1970^{35, 36, 37, 46}.

Oxford e colaboradores isolaram em 1938 a griseofulvina; entretanto sua ação antifúngica só se tornou conhecida em 1958^{36, 48}.

Uma nova geração de substâncias antifúngicas iniciou-se com produtos sintéticos, como a flucitosina, sintetizada por Duschinsky e colaboradores em 1957, disponível no comércio desde 1963, e o tolnaftato, que foi preparado por Miyasaki e colaboradores em 1963, cuja ação antifúngica foi estudada em 1968⁶³.

Em 1944, Wooley constatou a atividade antifúngica e antibacteriana do benzimidazol. Esta informação foi, no entanto, ignorada, uma vez que as infecções micóticas não eram muito notadas na época⁸³. Jerchel e colaboradores, revisando as observações de Wooley, observaram, em 1952, que alguns compostos benzimidazólicos substituídos apresentavam notável atividade antifúngica. Este fato despertou interesse em outros pesquisadores, iniciando-se, em 1969, com os derivados

imidazólicos, uma nova classe de antimicóticos, muitos dos quais vêm sendo introduzidos com êxito nas últimas décadas^{30, 83}.

O avanço dos imidazóis iniciou-se em 1969, quando três compostos foram introduzidos: o clotrimazol, o miconazol e o econazol, seguido pelo isoconazol^{30, 82}.

O cetoconazole foi sintetizado em 1978 e introduzido na terapêutica em 1981 por Heeres e colaboradores³⁴. Outros avanços na terapia antifúngica foram representados pelo terconazol, de uso tópico; fluconazol, de uso oral e parenteral, e itraconazol, de uso oral. A terbinafina e a alilamina (sintetizadas em 1978) encontram-se disponíveis no mercado para o tratamento de infecções por dermatófitos³⁸.

2.1.2. NOMENCLATURA

O nitrato de econazol é um antifúngico imidazólico diazólico, usado sob a forma de nitrato. Quimicamente é o mononitrato de 1-[2-[(4-clorofenil) metoxi] -2- (2,4 - diclorofenil) etil] - 1H- imidazol. Sua fórmula molecular é $C_{18}H_{15}Cl_3N_2O.HNO_3$, com massa molecular de 444,70 mol/g^{16,22, 29,61,71,80}.

2.1.3. ESTRUTURA QUÍMICA

O nitrato de econazol é um derivado incolor do miconazol e tem a seguinte estrutura química^{36, 74} (Figura 1):

Figura 1: Estrutura química do nitrato de econazol

2.1.4. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O nitrato de econazol contém no mínimo 98,5% e não mais que 101,0% de $C_{18}H_{15}Cl_3N_2O.HNO_3$ calculado com referência à substância seca⁸⁰.

O nitrato de econazol possui ponto de fusão na faixa de 162 a 166°C, seguido de decomposição do produto. Apresenta-se como um pó branco ou quase branco, cristalino, solúvel no metanol, ligeiramente solúvel na água, levemente solúvel no cloreto de metileno e praticamente insolúvel no éter^{16,22, 29,71,80}.

2.1.5. ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

2.1.5.1. MECANISMO DE AÇÃO

O nitrato de econazol inibe a desmetilação do carbono 14 do esterol da parede celular do fungo, inibindo, conseqüentemente, a biossíntese normal de ergosterol, alterando a composição bioquímica da mesma, com perda de constituintes celulares (proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, cátions monovalentes), aliada a falhas na absorção de nutrientes extracelulares importantes. Os efeitos desses compostos parecem depender da presença de fosfolipídios insaturados e ácidos graxos na parede celular do fungo⁵¹.

Um mecanismo adicional de atividade antifúngica está aparentemente relacionado à capacidade desses compostos de inibir a atividade das enzimas mitocondriais e peroxissômicas, como citocromoxidase, peroxidase e catalase, ocasionando acúmulo de peróxido de hidrogênio intrafúngico em níveis letais⁵¹.

2.1.5.2. FARMACODINÂMICA, FARMACOCINÉTICA E METABOLISMO

Antifúngico de amplo espectro, com ações tópica e vaginal. É antibacteriano ativo contra certas bactérias Gram-positivas⁷⁴.

Após aplicação tópica, a absorção sistêmica é mínima. No entanto, com a administração vaginal, pequenas porções são absorvidas sistematicamente. Depois de alguns minutos da aplicação tópica, pode-se detectar o nitrato de econazol na camada

córnea da pele em quantidades muito superiores à concentração inibitória mínima⁵¹. A fração absorvida é excretada pela urina e pelas fezes⁵¹.

2.1.5.3. USOS

O nitrato de econazol apresenta atividade em casos de *tinea pedis*, *tinea cruris*, *tinea corporis*, *tinea versicolor* e candidíase cutânea⁷⁴.

O nitrato de econazol possui atividade na ceratite fúngica, mais, para uso oftalmológico, deverá ser formulada³⁶.

O nitrato de econazol *in vitro* tem atividade antifúngica contra os dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrouaudi*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum audouini*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*, leveduras, *Candida albicans* e *Pityrosporum orbiculare* e contra certas bactérias Gram-positivas^{36, 74}.

2.1.5.4. REAÇÕES ADVERSAS

As reações adversas ao nitrato de econazol são pouco freqüentes, podendo aparecer prurido, ardor, irritação local e eritema⁷⁴.

A incidência de sensibilização é muito baixa. Ainda não se registrou toxicidade sistêmica com o uso de nitrato de econazol⁷⁴.

Efeitos fetotóxicos e embriotóxicos foram observados em camundongos, coelhos e ratos, com doses maiores do que as doses dérmicas humanas⁷⁴.

O nitrato de econazol só deve ser usado em gestantes se sua indicação for considerada essencial. Deve também haver precaução no uso de nitrato de econazol em mulheres que amamentam⁷⁴.

2.1.6. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO NITRATO DE ECONAZOL

Existem métodos de identificação e doseamento do nitrato de econazol baseados em técnicas por cromatografia em camada delgada, espectrometria no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta, titulometria, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (CE), espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS), etc.

2.1.6.1. IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAPHIA EM CAMADA DELGADA (CCD) NA MATÉRIA-PRIMA

A Farmacopéia Britânica descreve um método para a matéria-prima utilizando como fase estacionária uma placa de sílica gel com indicador de fluorescência a 254 nm e fase móvel constituída de amônia/tolueno/dioxano (1:40:60, v/v). A revelação pode ser realizada utilizando-se luz ultravioleta a 254 nm ou com uma solução de iodobismutato de potássio¹⁶.

A Farmacopéia Americana descreve o método utilizando como fase estacionária uma placa de sílica gel e fase móvel constituída de 1,4 dioxano/tolueno/amônia 13,5 M (60:40:1, v/v), utilizando como revelador vapor de iodo⁸⁰.

2.1.6.2. IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO (IV) NA MATÉRIA-PRIMA

Este método baseia-se na preparação de uma pastilha de brometo de potássio e nitrato de econazol em proporções 10:1 (p/p) e análise espectroscópica^{16, 29, 80}.

2.1.6.3. IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA (UV/VIS) NA MATÉRIA-PRIMA

Segundo a Farmacopéia Britânica, o nitrato de econazol, na concentração de 100 µg mL⁻¹, dissolvido em uma mistura de 2-propanol e ácido clorídrico 0,1mol L⁻¹ (9:1), quando analisado entre 240 e 320 nm, apresenta três absorções máximas a 265, 271 e 280 nm¹⁶.

Segundo a Farmacopéia Americana, o nitrato de econazol, na concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, dissolvido em uma mistura de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e álcool metílico (1:9), quando analisado espectrofotometricamente entre 240 e 320 nm, apresenta três absorções máximas a 265, 271 e 280 nm⁸⁰.

2.1.6.4. IDENTIFICAÇÃO POR REAÇÃO QUÍMICA NA MATÉRIA-PRIMA

O nitrato de econazol em presença de cloreto de potássio, difenilamina e ácido sulfúrico tem uma coloração azul intensa⁸⁰.

2.1.6.5. QUANTIFICAÇÃO DO NITRATO DE ECONAZOL POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA NA MATÉRIA-PRIMA

A determinação quantitativa do nitrato de econazol inclui dissolução em ácido acético glacial e titulação com ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, determinando o ponto final potenciometricamente. Cada mL de ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ equivale a 44,47 mg de nitrato de econazol^{16, 80}.

2.1.6.6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO NITRATO DE ECONAZOL EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

A Farmacopéia Britânica e a Farmacopéia Européia descrevem uma metodologia para a determinação do nitrato de econazol em formas farmacêuticas baseada na separação por cromatografia líquida de alta eficiência^{16,29}.

Massaccesi (1986) desenvolveu uma metodologia analítica para a determinação quantitativa do nitrato de econazol em comprimidos vaginais e loções, mediante uma titulação em dupla fase, utilizando como indicador o azul de indofenol e, como titulante, dodecil sulfato de sódio (SDS)⁵⁶.

El-Shabouri e colaboradores (1998) apresentaram método espectrofotométrico para a determinação de nitrato de econazol em comprimidos vaginais, mediante uma derivatização química com iodo. As leituras foram realizadas a 290 nm ²⁸.

Khashaba e colaboradores (2000) também apresentaram método espectrofotométrico para a determinação de nitrato de econazol em comprimidos vaginais, mediante uma derivatização química com o 2,3 dichloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinone (DDQ) em álcool metílico ou ácido *p*-cloranílico (*p*-CA) em acetonitrila. As leituras foram monitoradas a 460 e 520 nm para DDQ e *p*-CA, respectivamente⁴⁵.

Vários autores empregaram espectrofotometria derivada, na qual os espectros são obtidos colocando-se no gráfico a primeira ou segunda derivada da absorbância ou transmitância em função do comprimento de onda. A diferenciação afina as bandas de absorção e permite isolar aquelas que estão parcialmente encobertas, por fazerem parte de um espectro largo e diferenciado^{43,46,47,57}.

Bonazzi e colaboradores (1998) desenvolveram metodologia analítica para a determinação de nitrato de econazol em cremes por extração em fluido supercrítico seguida da análise espectrofotométrica utilizando a primeira derivada a 283,2 nm¹⁴.

Cavrini e colaboradores (1989) desenvolveram metodologia analítica para a determinação do nitrato de econazol em pó e cremes com prévia purificação com fase de extração sólida (SPE) seguida da análise espectrofotométrica utilizando a terceira derivada a 282,8 nm¹⁸.

No Quadro 1 são apresentadas técnicas de separação empregando cromatografia a líquido, cromatografia a gás, eletroforese capilar e cromatografia a líquido em gradiente, utilizadas na determinação do nitrato de econazol em diferentes formulações farmacêuticas.

Quadro 1 – Técnicas de separação para a determinação do nitrato de econazol

Método	Fase estacionária ou capilar	Fase móvel ou eletrólito	Tipo de separação	λ nm	Amostra	Ref.
CLAE	Chiralpak AD	álcool etílico 2-propanol (v/v)	Enantiomerica	254	Matéria-prima	79
CE	Capilar de sílica fundida (48,5 cm x 50 μ m I.D.)	2mM HP- β -CD,	Enantiomerica	200	Matéria-prima	17
CE	Capilar de sílica fundida (45 cm x 75 μ m I.D.)	tris-fosfato tampão: 5 mM HP- β -CD pH 2,5	Enantiomerica	214	Matéria-prima	53
CLAE	Coluna amino (C ₈)	acetonitrila 30:água:70 (v/v) pH 2,5 (ac. fosfórico)		230	Loção Supositórios	69
CLAE G	LiChrospher (C ₈)	ac. fosfórico/hexano sulfonato de sódio/ isopropanol/água		227	Matéria-prima	84
CLAE G	Discovery RP-amide C ₁₆	acetonitrila 15:clorato de sódio 10 ⁻³ M 85 (v/v)		220	Xampu	31
CLAE	Cellulose tris (3,5 dichloro phenylcarbamate)	2-propanol	Enantiomerica	220	Matéria-prima	5
CLAE	Chiralcel OD, OJ, OB, OK, OF.	hexano 425:2-propanol 74 dietilamina 1 (v/v/v)	Enantiomerica	250	Matéria-prima	2
CLAE	Chiralpak AD, AS, AR.	hexano 400:2-propanol 99 dietilamina 1 (v/v/v)	Enantiomerica	250	Matéria-prima	3
CLAE	Chiralpak WH	hexano 400:2-propanol 99 dietilamina 1 (v/v/v)	Enantiomerica	250	Matéria-prima	1
CE	Capilar sílica fundida (37 cm. x 75 μ m I.D.)	ácido ortofosfórico 0,1M : HP- β -CD pH 3,0 (TEA)	Enantiomerica	214	Matéria-prima	81
CE	Capilar de sílica fundida	ácido acético 20:tampão tris 75mM 80 (v/v) pH 5,18		196	Supositórios	8
CE	Capilar sílica fundida (48 cm. * 50 μ m I.D.)	5 mM HP- β -CD in 50 mM pH2,5 trietanolamina fosfato.	Enantiomérica	214	Matéria-prima	26
CLAE	Lichrocart RP ₁₈	álcool metílico 73:tampão fosfato 27 + HP- β -CD	Enantiomerica	230	Matéria prima	64
CE	Capilar de sílica fundida	tampão britton robinson 120 mM:SBE- β -CD 10 mM	Enantiomerica		Matéria-prima	54
CLAE	Lichrocart RP ₁₈	álcool metílico 73:tampão fosfato : HP- β -CD pH 3 (ácido fosfórico)	Enantiomerica	230	Matéria-prima	68
CLAE	Li-Chromspher 60 RP	acetonitrila : ácido fosfórico 0,02M			Cremes Pomadas	50
CLAE	Lichrocart RP ₁₈	álcool metílico 75:tampão fosfato 25 + β -CD. pH 3 (ácido fosfórico)	Enantiomerica	230	Matéria-prima	65
CG	UCW-98 Chromosorb				Matéria-prima	49
CLAE	Spherisorb-CN	acetonitrila 35:tampão TEA fosfato 0,05M 65 pH3		235	Cremes	25
CLAE	μ Bondapak C ₁₈	álcool metílico 78:carbonato de amônio 20: THF 2 (v/v/v)		220	Crema	21

CE: Eletroforese capilar; CG: Cromatografia gasosa; CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência; CLAE G: Cromatografia líquida de alta eficiência com eluição gradiente.

2.1.6.7. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO NITRATO DE ECONAZOL EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Nitrato de econazol, nitrato de miconazol e clotrimazol foram quantificados em plasma humano mediante diálises e enriquecimento deste em pré-coluna, sendo diretamente acoplado ao sistema de cromatografia em fase líquida²⁰.

O nitrato de econazol foi quantificado em plasma animal depois de administração oral e vaginal por CLAE em fase reversa³⁹.

Recentemente, o nitrato de econazol tem sido quantificado em amostras biológicas (pele humana e pele de porquinho-da-índia) usando técnicas de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS)^{58,59}.

2.2. ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica é um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância (e/ou de seus produtos de reação) é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Esses métodos encontram ampla aplicação tanto em controle de qualidade como na pesquisa de produtos farmacêuticos, produtos industriais (polímeros), argilas, minerais, metais e ligas^{33,55}.

2.2.1. TERMOGRAVIMETRIA/TERMOGRAVIMETRIA DERIVADA (TG/DTG)

Na termogravimetria, a massa de uma amostra em atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo, à medida que a temperatura da amostra aumenta²⁷.

Os instrumentos comerciais modernos para termogravimetria consistem de: uma balança analítica sensível, um forno, um sistema de gás de purga, de modo a fornecer uma atmosfera inerte (ou, em certos casos, reativa), e um microcomputador, para controle do instrumento na aquisição e na apresentação de dados⁷⁵.

A curva DTG auxilia no esclarecimento da curva TG.⁶⁶ Ela relaciona a velocidade de variação de massa (dm/dt) com a temperatura (T) ou tempo (t). A curva DTG permite:

- Apresentar as informações de forma mais acessível visualmente.
- Apresentar área diretamente proporcional à variação de massa (Δm).
- Obter a razão de Δm a partir da altura do pico a qualquer temperatura.
- Determinar prontamente, a T_{max} (está num máximo) que fornece informações sobre a temperatura *onset* extrapolada (T_1) e temperatura final extrapolada *endset* (T_f).

2.2.2. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica térmica na qual as diferenças no fluxo de calor na substância e na substância de referência são medidas como uma função da temperatura da amostra, enquanto as duas são submetidas a um programa de temperatura controlada⁷⁵.

Existem dois tipos de calorímetro exploratório diferencial (DSC). O primeiro é de compensação de potencial, no qual a amostra e o material de referência são aquecidos por aquecedores separados, de forma que suas temperaturas sejam mantidas iguais, enquanto as temperaturas são aumentadas (ou diminuídas) linearmente. O segundo, de fluxo de calor, no qual a diferença no fluxo de calor sobre a amostra e a substância de referência é medida conforme a temperatura é aumentada ou diminuída linearmente⁶⁷.

2.2.3. APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

Algumas aplicações das técnicas termoanalíticas são:

- Obtenção de parâmetros cinéticos das reações de decomposição.
- Isolamento das fases intermediárias que possam surgir durante a história térmica de uma amostra.
- Determinação da estabilidade térmica de compostos orgânicos e minerais.

-
- Controle e conhecimento do estado de hidratação dos sais.
 - Elucidação de fenômenos de desolvatação, desidratação, eflorescência.
 - Determinação da pureza e da estabilidade térmica de reagentes e padrões em química analítica.
 - Processos quantitativos na existência de dois ou mais componentes.
 - Identificação funcional de compostos orgânicos, etc.
 - Estudos de pré-formulação de medicamentos, estabilidade térmica e caracterização de fármacos.
 - Determinação de conteúdo de água em emulsões^{42,44}.

As aplicações da calorimetria exploratória diferencial, de modo geral, são:

- Pontos de fusão e ebulição.
- Transições de fases polimórficas.
- Determinações de pureza.
- Estabilidade térmica.
- Determinações vítreas.
- Determinações quantitativas.

2.3. ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A eletroforese capilar (CE) é uma versão instrumental da eletroforese, desenvolvida e usada a partir dos anos 1980, tornando-se um importante método de separação usado por químicos e profissionais de ciências da vida⁷⁵.

A eletroforese capilar é definida como o transporte de partículas ou solutos eletricamente carregados num meio líquido sob a influência de um campo elétrico¹¹.

A CE oferece varias vantagens, entre elas: alta eficiência, separações rápidas e relativamente econômicas, pequenos volumes de injeção de amostra, pequenas

quantidades de reagentes e possibilidade de se analisar simultaneamente compostos polares e não-polares^{7,11}.

2.3.1. PRINCÍPIOS DE SEPARAÇÃO

Os princípios de separação da amostra aqui descritos são aplicados à eletroforese capilar em zona.

A velocidade do fluxo eletrosmótico¹¹ (v_{EOF}) pode ser calculada pela equação 1:

$$v_{EOF} = \epsilon \zeta E / 4 \pi \eta \quad (\text{eq. 1})$$

onde:

v_{EOF} : velocidade do fluxo eletrosmótico;

ϵ : constante dielétrica do tampão;

ζ : potencial zeta;

E : campo elétrico em volts cm^{-1} ;

η : viscosidade do tampão.

A mobilidade eletrosmótica¹¹ (μ_{EOF}) do tampão é dada pela equação 2:

$$\mu_{EOF} = \epsilon \zeta / 4 \pi \eta \quad (\text{eq. 2})$$

A mobilidade eletrosmótica é dependente somente das características do tampão, isto é, constante dielétrica, viscosidade, pH e concentração (à qual influencia o potencial zeta), sendo independente da tensão aplicada¹¹.

Sob a influência de um campo elétrico, um soluto eletricamente carregado migra através do eletrólito com uma velocidade eletroforética¹¹ (v_{EP} , cm s^{-1}) (equação 3). A separação é atingida porque os solutos migram através do capilar a diferentes velocidades.

$$v_{EP} = \mu_{EP} E \quad (\text{eq. 3})$$

onde:

μ_{EP} : mobilidade eletroforética;

E: campo elétrico.

A mobilidade eletroforética¹¹ para os íons esféricos é dada pela equação 4:

$$\mu_{EP} = q/6\pi\eta r \quad (\text{eq. 4})$$

onde:

μ_{EP} = mobilidade eletroforética em $\text{cm}^2/\text{V.s}$;

q = carga do íon;

η = viscosidade do eletrólito;

r = raio do soluto.

Pode-se observar, na equação 4, que quanto maior é a razão carga/tamanho (q/r), maior será a mobilidade eletroforética para determinada tensão e tampão e portanto, maior a velocidade eletroforética (equação 3).

A velocidade eletroforética é dependente tanto da mobilidade eletroforética como da tensão aplicada. Por outro lado, a mobilidade eletroforética está relacionada apenas às propriedades do soluto e do tampão, sendo independente da tensão aplicada¹¹.

A velocidade do soluto está influenciada pela sua mobilidade eletrosmótica e pelo fluxo eletrosmótico. A velocidade eletroforética observada¹¹ (v_{OBS}) é dada pela equação 5:

$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (\text{eq. 5})$$

onde:

v_{EOF} : velocidade do fluxo eletrosmótico, em cm/s ;

v_{EP} : velocidade eletroforética.

A mobilidade eletroforética observada¹¹ (μ_{OBS}) do soluto é dada pela sua mobilidade eletroforética e pela mobilidade eletrosmótica (equação 6):

$$\mu_{\text{OBS}} = \mu_{\text{VEF}} + \mu_{\text{EOF}}$$

(eq. 6)

O fluxo eletrosmótico (EOF) é o fluxo normalmente direcionado do ânodo para o cátodo, nestas condições, os analitos são separados de acordo com a mobilidade de cada íon. A aplicação de uma tensão através do capilar preenchido com tampão causa um fluxo que bombeia os íons ao longo do capilar, este fluxo ocorre em função da ionização dos grupos silanóis no interior do capilar. Quando em contato com o eletrólito, os grupos silanóis (Si-OH) da parede interna do capilar são ionizados a silanoatos (Si-O-) em pH maior do que 3; já em pH menor do que 3 a ionização dos grupos silanóis é pequena ou não existe^{7, 73}.

Os grupos silanoatos atraem cátions carregados positivamente provenientes do tampão, que formam uma camada interna de cátions (camada fixa) perto da parede do capilar; estes cátions não são suficientes para neutralizar todas as cargas negativas, assim, uma segunda camada de cátions é formada (camada móvel), estas duas camadas formam uma dupla camada difusa de cátions; quando uma tensão é aplicada, a camada móvel é puxada no sentido do cátodo carregado negativamente. Esta força que transporta as espécies iônicas ao longo do capilar é denominada fluxo eletrosmótico⁷³.

Figura 2 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico
(http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecaph_4/fluele_2/fluele_2.htm)

A formação do EOF a partir das paredes do capilar origina um perfil radial de velocidade planar que contrasta com o perfil radial de velocidade parabólico observado

nos sistemas de alta pressão, como a CLAE, o que contribui significativamente para a elevada eficiência dos picos obtidos⁷³.

Figura 3 – Tipos de perfis radiais de velocidade de fluxo característicos dos sistemas CE e CLAE

(http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm)

2.3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Os componentes principais do aparelho são: um capilar de diâmetro estreito (25-100 μm), que passa através do centro ótico de um sistema de detecção conectado a um dispositivo de aquisição de dados; uma fonte de alta tensão; um sistema de introdução de amostra com amostrador automático, conectados a um computador que registra e integra os eletroferogramas.

Os capilares são revestidos externamente por um polímero de poliimida, que confere alta flexibilidade ao capilar, tornando-o resistente a possíveis quebras. Estes capilares possuem normalmente de 20 a 100 cm de comprimento. O volume de injeção da amostra varia entre 1 a 20 nL⁷.

Diversos tipos de detectores são utilizados em eletroforese capilar. A maioria dos métodos de CE emprega detectores baseados em absorções nas regiões UV e UV-VIS. Outros sistemas de detecção em CE incluem fluorescência induzida a laser, espectrometria de massas, amperometria, radiometria e espectrometria de Raman. Os mesmos critérios aplicados para os detectores em CLAE também são aplicados em CE, ou seja, sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e habilidade para fornecer resultados qualitativos^{7,11}.

Figura 4 – Esquema de um equipamento de eletroforese capilar. (Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. Gervasio et al.)

2.3.3. INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

A introdução da amostra no capilar pode ser realizada por injeção hidrodinâmica e eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é realizada por pressão, vácuo e por gravidade (sifonamento). Na injeção da amostra por pressão, a extremidade do capilar é submersa no reservatório que contém a solução da amostra, uma diferença de pressão é aplicada e a amostra é introduzida no capilar. A injeção por vácuo pode ser feita pela aplicação do vácuo no reservatório destino enquanto o extremo do capilar está mergulhado no reservatório da amostra. Na injeção por gravidade, o capilar mergulhado no reservatório da amostra é mecanicamente elevado acima do nível do reservatório que contém o eletrólito, permitindo a introdução da amostra no capilar^{7,11}.

Para efetuar-se a injeção eletrocinética, o capilar e o ânodo são mergulhados no reservatório que contém a amostra. A tensão aplicada provoca a migração dos íons da amostra dentro do capilar devido à mobilidade eletroforética. A quantidade da amostra injetada depende da mobilidade eletroforética dos solutos, do fluxo eletrosmótico (EOF), da tensão aplicada, do tamanho do capilar e da concentração do soluto^{7,11}.

A vantagem da injeção hidrodinâmica é que a quantidade do soluto injetada é constante, independente da sua própria mobilidade, ao contrário do que acontece quando se procede à injeção eletrocinética^{7,11}.

Figura 5 – Tipos de introdução de amostra para eletroforese capilar (http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec_4/instru_2/instru_2.htm)

2.3.4. CLASSIFICAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR

Os principais modos de CE desenvolvidos e atualmente aplicados incluem a eletroforese capilar de zona (CZE), a cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC), a cromatografia capilar eletrocinética micelar por microemulsão (MEEKC), a eletroforese capilar em gel e a eletroforese por focalização isoeletrica.

2.3.4.1. ELETROFORESE CAPILAR POR ZONA (CZE)

Na eletroforese capilar por zona, a composição do tampão é constante na região da separação. O potencial aplicado faz com que os diferentes componentes iônicos da mistura migrem de acordo com a sua própria mobilidade e se separem em zonas que podem ser completamente resolvidas ou apresentar superposição parcial. A situação é análoga à eluição em cromatografia em coluna, na qual as regiões da fase móvel estão localizadas entre zonas contendo os analitos separados⁷⁵.

2.3.4.2. CROMATOGRAFIA CAPILAR ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

Em 1984, Terabe e colaboradores introduziram a MEKC. Neste tipo de CE a solução tampão contém um tensoativo que atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna de fase reversa em CLAE. O tensoativo é introduzido dentro do capilar em concentração acima da concentração micelar crítica. As micelas carregadas atuam como fase estacionária. Portanto, os compostos mais hidrofóbicos permanecem mais tempo na micela carregada negativamente e, conseqüentemente, eluem por último. Os compostos mais hidrofílicos não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética. O dodecil sulfato de sódio (SDS) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) são os tensoativos mais empregados em cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)^{7, 11}.

2.3.5. VANTAGENS DA CE

A eletroforese capilar apresenta as seguintes vantagens^{11, 19}:

- Separações de alta eficiência: utiliza colunas de até um milhão de pratos. A eficiência da separação está diretamente relacionada à mobilidade do soluto à alta voltagem utilizada na separação.
- Utiliza colunas capilares duradouras, o mesmo capilar pode ser utilizado para separações e análises de compostos polares, compostos não-polares, compostos quirálicos e biomoléculas de alta massa molecular.
- São requeridos volumes de injeção pequenos de amostras, na ordem de nanolitros (1 a 20 nL).
- São utilizadas quantidades pequenas de reagentes.
- As análises podem ser realizadas em grande intervalo de pH, podendo-se caracterizar o comportamento de analitos fortemente ácidos ou básicos.
- Podem ser analisados diferentes tipos de amostras pelos diversos tipos de eletroforese capilar.

- É utilizada para a determinação de constantes de dissociação, pontos isoelétricos de proteínas ácidas e básicas.
- A quantificação da amostra é feita em poucos minutos.
- A análise é realizada à temperatura ambiente.
- As análises são econômicas, pelo baixo consumo de reagentes em comparação com CLAE.

2.3.6. DESVANTAGENS DA CE

A maior desvantagem da CE é que não estão disponíveis os injetores de volume fixo e, portanto, a precisão da injeção pode ser mais pobre do que com CLAE, a menos que sejam empregados um padrão interno e altas concentrações da amostra^{7,11}.

2.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é um processo analítico para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias em razão das afinidades relativas pelas duas fases: a fase móvel e a fase estacionária²³.

Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móveis e estacionária em vários graus⁷⁵.

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostra, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade²³.

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição do tamanho da

partícula da fase estacionária. Entretanto, somente no final dos anos 1960 foi desenvolvida a tecnologia para a produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10 μm . Esta técnica exigiu equipamentos sofisticados operando a altas pressões, que contrastavam acentuadamente com as colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade. O nome cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é empregado para distinguir esses procedimentos mais novos dos métodos básicos⁷⁵.

A cromatografia líquida de alta eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. As razões para a popularidade do método é a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público⁷⁵.

2.4.1. PRINCÍPIOS DE SEPARAÇÃO

2.4.1.1. VELOCIDADE DE MIGRAÇÃO DE SOLUTOS

A eficiência de uma coluna cromatográfica em separar dois solutos depende em parte das velocidades relativas nos quais os dois eluem.

A constante de distribuição K , que representa as concentrações de soluto nas fases móvel e estacionária, respectivamente, pode ser calculada pela equação 7⁷⁵:

$$K = c_E / c_M \quad (\text{eq. 7})$$

onde:

c_E = concentração molar do soluto na fase estacionária;

c_M = concentração molar do soluto na fase móvel.

A velocidade linear média de migração do soluto $\bar{V}$ e a velocidade linear média do movimento das moléculas da fase móvel (u) podem ser calculadas pelas equações 8 e 9, respectivamente⁷⁵:

$$\bar{V} = L / t_R \quad (\text{eq. 8})$$

$$u = L/t_M$$

(eq.9)

onde:

L = comprimento da coluna;

t_R = tempo de retenção;

t_M = tempo morto.

Para relacionar o tempo de retenção de um soluto com a sua constante de distribuição, expressa-se a velocidade de migração como uma fração da velocidade da fase móvel, mediante a equação 10⁷⁵:

$$u_x = u (1/1 + KV_E/V_M)$$

(eq.10)

onde:

V_E = volume da fase estacionária;

V_M = volume da fase móvel.

O fator de retenção k' é um parâmetro importante para descrever as velocidades de migração dos solutos nas colunas. Para um soluto A o fator de retenção pode ser calculado pela equação 11^{75, 76}:

$$k'_A = t_{RA} - t_M / t_M$$

(eq.11)

Idealmente, as separações são feitas em condições nas quais os fatores de retenção dos solutos em uma mistura caem no intervalo entre 2 e 10.

O fator de separação α de uma coluna para duas espécies A e B pode ser calculado pela equação 12^{75, 76}:

$$\alpha = (t_R)_B - t_M / (t_R)_A - t_M$$

(eq.12)

onde

$(t_R)_B$ = tempo de retenção da espécie B retida mais fortemente;

$(t_R)_A$ = tempo de retenção da espécie A retida menos fortemente ou que elui mais rapidamente.

2.4.1.2. EFICIÊNCIA DA COLUNA

Dois termos são amplamente usados em medidas quantitativas de eficiência de coluna cromatográfica: altura equivalente a um prato teórico H e número de pratos teóricos N. Os dois termos estão relacionados pela equação 13⁷⁵:

$$N = L/H \quad (\text{eq.13})$$

onde:

L= comprimento da coluna empacotada.

A eficiência da coluna cromatográfica aumenta à medida que o número de pratos torna-se maior e a altura do prato diminui. A eficiência em termos de número de pratos pode variar de algumas centenas a milhares. Altura dos pratos variando de poucos décimos a um milésimo de centímetro ou ainda menores não é rara⁷⁵.

Para calcular o número de pratos N, pode usar-se a equação 14^{75, 76}:

$$N = 5.54 (t_R/W_{1/2})^2 \quad (\text{eq.14})$$

onde

$W_{1/2}$ = largura do pico na metade da sua altura máxima.

O número de pratos N e a altura do prato H são amplamente usados na literatura e pelos fabricantes de instrumentos como medidas de eficiência das colunas⁷⁵.

2.4.2. INSTRUMENTAÇÃO

O equipamento da cromatografia líquida de alta eficiência consta dos seguintes componentes^{23, 75, 76} (Figura 6):

Figura 6 – Esquema de equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.
(Cortesia da Perkin Elmer-Elmer Corporation, Norwalk, CT.)

- Reservatório de fase móvel e sistema de tratamento de solventes.
- Sistema de bombeamento.
- Sistema de injeção de amostras.
- Colunas para cromatografia líquida.
- Detectores.
- Computador que registra e integra os cromatogramas.

2.4.3. APLICAÇÕES DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As diversas aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência estão baseadas nos tipos de fase estacionária, que implicam em quatro mecanismos diferentes, mediante a simples troca de coluna e de fase móvel^{23,75,76} (Figura 7):

Figura 7 – Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (de D. L. Saunders, in *Chromatography*, 3rd. ed., E. Heftmann, Ed., 81. New York: Van Nostrand Reinhold, 1975)

- Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção.
- Cromatografia de partição.
 - Cromatografia líquido-líquido.
 - Cromatografia de fase ligada.
- Cromatografia por exclusão.
- Cromatografia por troca iônica.

2.4.4. VANTAGENS

As principais vantagens são²³:

- Menor tempo de análise, devido à alta eficiência da coluna e à vazão rápida da fase móvel através da coluna.
- Alta resolução, pela possibilidade de análise de misturas complexas.
- Resultados quantitativos de fácil execução e grande precisão.
- Boa sensibilidade pelo uso de detectores que permitem medidas em nanogramas.
- Versatilidade: pode ser aplicada a compostos orgânicos e inorgânicos, amostras líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes.
- Automatização conseguida com o emprego de microcomputadores conjugados ao sistema cromatográfico.

2.4.5. LIMITAÇÕES

As principais limitações são²³:

- Alto custo de instrumentação, representando alto investimento.
- Alto custo de operação pelo custo elevado das fases móveis de alto grau de pureza e pela contínua reposição das fases estacionárias.
- Falta de detector que seja simultaneamente universal e sensível.

A pouca literatura sobre metodologia analítica para a determinação quantitativa do nitrato de econazol em formulações farmacêuticas, por si só, aponta para a oportunidade de realização de uma pesquisa neste âmbito. Por outro lado, tendo em vista que o nitrato de econazol se apresenta nas formas farmacêuticas creme e loção, optou-se por se pesquisar este princípio ativo na forma de creme, já que esta exige maior cuidado no processo de extração. Por fim, as metodologias escolhidas para a elaboração deste trabalho foram as técnicas de separação CLAE e CE, por representarem, atualmente, as técnicas mais utilizadas na análise de medicamentos.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação do nitrato de econazol na forma farmacêutica de creme a ser utilizada em laboratórios de controle de qualidade.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos, buscou-se:

- Caracterizar o nitrato de econazol, os excipientes e a formulação farmacêutica empregando a análise térmica.
- Desenvolver metodologia específica para quantificar o nitrato de econazol na preparação farmacêutica do creme.
- Desenvolver metodologia seletiva para quantificar o nitrato de econazol, as impurezas e os conservantes.
- Validar as metodologias desenvolvidas, tanto específicas como seletivas, para a quantificação do nitrato de econazol na formulação farmacêutica de creme.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

- Nitrato de Econazol, matéria-prima cedida pela Formil Química Ltda., lote 04.02.003.210, teor de pureza 100,55%.
- Alfa-2,4-diclorofenil-1H-imidazol-1-etanol, 98% (DCF), impureza adquirida da Acros Organics da Bélgica, lote: A0115503, teor de pureza 99%.
- 4-álcool clorobenzílico, 99% (ACB), impureza adquirida da Acros Organics da Bélgica, lote: A0235150001, teor de pureza 99,3%.
- Ácido salicílico, padrão interno adquirido da Sigma Aldrich, lote 064K3721, teor de pureza 99%.
- Imidazol, padrão interno adquirido da Merck, lote L328716, teor de pureza 99%.
- Nitrato de miconazol, padrão interno cedido pela Formil Química Ltda., lote FMC.06.06.013.032, teor de pureza 100,32%.

4.1.2. MATÉRIAS-PRIMAS

- Álcool cetílico (Química Anastásio, lote E05040031; pureza 97,91%).
- Monoestearato de glicerila (Lê Cosmetique Ltda.).
- Monoestearato de sorbitan (Dhaymers, lote 6469).
- Glicerina (Razzo Ltda.).
- Palmitato de isopropila (Dhaymers, lote 6414; teor de pureza 98,3%).
- Alcoóis graxos de óxido de etileno: Polawax (Instituto Nacional de Quimioterapia Ltda.)
- Metilparabeno (Laboratório Stiefel Ltda.).
- Propilparabeno (Laboratório Stiefel Ltda.).
- Imidazolidinil uréia (Sarfam comercial importadora Ltda., lote 04500135847).

4.1.3. AMOSTRAS

4.1.3.1. AMOSTRA COMERCIAL

Para a realização do trabalho experimental, utilizaram-se amostras do creme Micostyl contendo teor declarado de 1% de nitrato de econazol, adquirido do Laboratório Stiefel Ltda.

4.1.3.2. PLACEBO

O placebo foi preparado com os mesmos excipientes utilizados na formulação comercial. A fórmula empregada na preparação do placebo está indicada no Quadro 2:

Quadro 2 – Fórmula do placebo preparado com os excipientes utilizados na amostra comercial

Substância	Quantidade
Álcool cetílico	1,50 g
Monoestearato de glicerila	8,00 g
Monoestearato de sorbitan	2,00 g
Glicerina	10,00 g
Palmitato de isopropila	3,00 g
Alcoóis graxos de óxido de etileno (Polawax®)	8,00 g
Metilparabeno	0,15 g
Propilparabeno	0,05 g
Imidazolidinil uréia	0,20 g
Água q.s.p.	100,00 g

O placebo foi preparado da seguinte forma:

Foram fundidos os componentes da fase oleosa: álcool cetílico, monoestearato de glicerila, monoestearato de sorbitan e o Polawax[®] a 75°C, usando banho-maria e mantendo o sistema em agitação. Uma vez fundida a mistura, foi adicionado o palmitato de isopropila e o propilparabeno. A fase aquosa (água, glicerina e metilparabeno) foi aquecida em banho-maria à mesma temperatura da fase oleosa. Em seguida, se verteu a fase aquosa sobre a fase oleosa e se retirou o aquecimento, mantendo-se a agitação. Separadamente, dissolveu-se o imidazolidinil uréia na água e se incorporou sobre a mistura fase aquosa-fase oleosa. Manteve-se a agitação até atingir a temperatura de 30°C e após resfriamento, o placebo foi envasado para posterior utilização.

4.1.4. SOLVENTES E REAGENTES

- β-ciclodextrina (Beckmann[®])
- 2-propanol (Merck[®])
- Ácido acético glacial (Merck[®])
- Ácido clorídrico (Merck[®])
- Ácido perclórico (Merck[®])
- Ácido sulfúrico (Merck[®])
- Ácido L (+) - tartárico (Merck[®])
- Água ultra pura Milli Q (Millipore[®])
- Álcool metílico (Merck[®])
- Amônia concentrada (Merck[®])
- Cloreto de potássio (Synth[®])
- Difenilamaina (Baker & Adamson Quality)
- Dioxano (Merck[®])
- Dodecil sulfato de sódio SDS (Merck[®])
- Fosfato de sódio hidratado (Merck[®])
- Iodeto de potássio (Synth[®])
- Solução de Karl Fischer (Merck[®])
- Subnitrato de bismuto (Baker & Adamson Quality)

- Tetraborato de sódio (Merck®)
- Tolueno (Merck®)

4.1.5. SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Solução tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 2,50): foram pesados 624,04 mg de fosfato de sódio, transferidos para balão volumétrico de 200 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q. A solução foi ajustada para pH 2,5 com ácido fosfórico.
- Solução tampão tetraborato de sódio 100 mM: foram pesados 9,5342 g de tetraborato de sódio, transferidos para balão volumétrico de 250 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q.
- Solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 100 mM: foram pesados 7,2095 g de dodecil sulfato de sódio, transferidos para balão volumétrico de 250 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q.
- Solução de β -ciclodextrina 0,1%: foram pesados 50 mg de β ciclodextrina, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q.
- Solução de iodobismutato de potássio (revelador): foram suspendidos 1,7 gramas de subnitrato de bismuto e 20 gramas de ácido L (+)-tartárico em 40 mL de água, foram acrescentados à suspensão 40 mL de uma solução de iodeto de potássio ao 40% (p/v), misturou-se por uma hora e filtrou. Antes de usar, diluíram-se 5 mL da solução em 15 mL de água para se utilizar na revelação.

4.1.6. EQUIPAMENTOS

- Aparelho de determinação de ponto de fusão Stuart Scientific SMP1.
- Aparelho Milli Q-Plus Millipore®.
- Capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, com 50 μ m de diâmetro interno.

- Célula DSC Shimadzu® modelo DSC-50.
- Coluna cromatográfica Bondclone C₁₈ 10µm, 300 x 3,9 mm Phenomenex®.
- Cromatógrafo Shimadzu LC-10AD com detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M10AVP, sistema controlador SCL-10AVP, conectado a um computador com *software* LC WORKSTATION CLASS-VP Shimadzu, injetor automático (SIL-10ADvp).
- Espectro infravermelho FITIR Bomem MB-100.
- Espectrofotômetro ultravioleta visível, Shimadzu 1601.
- Estufa Nova Ética®.
- Medidor de pH DIGIMED modelo TE-901.
- Sistema de eletroforese capilar modelo HP^{3E}CE, Agilent Technologies, equipado com detector de arranjo de diodos e *software* (HP ChemStation, ver A.08.03).
- Sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE 5510, Beckman Coulter Instruments, Fullerton, CA (USA), equipado com detector de arranjo de diodos e *software* para aquisição e tratamento de dados (Beckmann P/ACE System Gold Software).
- Termobalança Shimadzu® modelo TGA-50.
- Unidade filtrante FG Millex em polietileno c/membrana PTFE 0,22 µm de poro, 13 mm Millipore®.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO NITRATO DE ECONAZOL MATÉRIA-PRIMA

4.2.1.1. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL

Foram pesados 40,0 mg de nitrato de econazol, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos com uma mistura de 2-propanol e ácido clorídrico

0,1 M 9:1 (v/v) e completados com o mesmo solvente. Obteve-se concentração final de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol. A leitura desta solução foi realizada na faixa de 240 a 300 nm¹⁶.

4.2.1.2. ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO

Foi misturada uma quantidade do nitrato de econazol com o sal brometo de potássio. Esta mistura foi triturada e prensada a fim de ser identificada espectroscopicamente. O espectro foi comparado com espectros relatados na literatura^{16, 22, 29, 80}.

4.2.1.3. PONTO DE FUSÃO

O nitrato de econazol (matéria-prima) foi introduzido em capilar de vidro e submetido à determinação do ponto de fusão. O ensaio foi realizado em triplicata^{16, 29, 80}.

4.2.1.4. PERDA POR DESSECAÇÃO

Pesou-se um grama de nitrato de econazol e manteve-se na estufa por 2 horas à temperatura entre 100 e 105°C. O ensaio foi realizado em triplicata¹⁶.

4.2.1.5. REAÇÃO QUÍMICA

Foram pesados e suspensos 10 mg de nitrato de econazol em 5 mL de água, em seguida a suspensão foi resfriada. Acrescentou-se 0,4 mL de solução de cloreto de potássio ao 10% e 0,1 mL de difenilamina (solução a 1% em ácido sulfúrico p/v); em seguida, gotejou-se com agitação 5 mL de ácido sulfúrico⁸⁰.

4.2.1.6. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Examinou-se por cromatografia em camada delgada o nitrato de econazol, usando-se uma placa revestida com sílica gel contendo indicador de fluorescência a 254 nm. Foram examinadas duas matérias-primas de diferentes laboratórios.

Solução teste “a”: Dissolveram-se 0,25 g de nitrato de econazol em 5 mL de uma mistura de amônia concentrada e álcool metílico (1:9 v/v). Matéria-prima da Formil Química Ltda.

Solução teste “b”: Foi diluído um mL da solução teste “a” para 10 mL, com uma mistura de amônia concentrada e álcool metílico (1:9 v/v).

Solução de referência “a”: Dissolveram-se 25 mg de nitrato de econazol padrão em 5 mL de uma mistura de amônia concentrada e álcool metílico (1:9 v/v). Matéria-prima do Laboratório Stiefel Ltda.

Aplicou-se separadamente 10 µL de cada solução na placa cromatográfica e desenvolveu-se sobre um caminho de 10 cm, usando como fase móvel uma mistura de amônia concentrada, tolueno e dioxano 1:40:60 v/v, respectivamente. Examinou-se com luz ultravioleta a 254 nm e depois se revelou a placa com uma solução de iodobismutato de potássio (preparação indicada no item 4.1.5) para se observar com melhor claridade as manchas presentes na placa¹⁶.

O fator de retenção (Rf) foi calculado para comparar as duas matérias-primas utilizadas.

4.2.1.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITRATO DE ECONAZOL

Dissolveram-se 400 mg de nitrato de econazol em 50 mL de ácido acético glacial e titulou-se com uma solução padrão de ácido perclórico 0,1 N. Determinou-se o ponto final potenciométricamente, usando-se eletrodo para soluções não-aquosas. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 44,47 mg de nitrato de econazol^{16, 29, 80}.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DO NITRATO DE ECONAZOL (MATÉRIA-PRIMA), EXCIPIENTES E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EMPREGANDO AS TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

4.2.2.1. NITRATO DE ECONAZOL

A caracterização do nitrato de econazol (matéria-prima) por termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) foi realizada obedecendo-se as seguintes

condições experimentais: cadinho de platina, massa de amostra em torno de 4,5 a 6,0 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

A caracterização do nitrato de econazol (matéria-prima) por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada obedecendo-se as seguintes condições experimentais: cadinho de alumínio, massa de amostra em torno de 1,0 a 2,0 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

4.2.2.2. EXCIPIENTES EMPREGADOS NA FORMULAÇÃO

A caracterização dos excipientes por termogravimetria (TG) foi realizada obedecendo-se as seguintes condições experimentais: cadinho de platina, massa de amostra em torno de 4,5 a 6,0 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

4.2.2.3. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA (CREME)

A caracterização da formulação creme contendo nitrato de econazol a 1% por termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) foi realizada obedecendo-se as seguintes condições experimentais: cadinho de platina, massa de amostra em torno de 5,0 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 1°C min^{-1} .

A caracterização da formulação creme por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada obedecendo-se as seguintes condições experimentais: cadinho de platina, massa de amostra em torno de 1,0 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL min^{-1}) e razão de aquecimento de 1°C min^{-1} .

4.2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECÍFICA PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRATO DE ECONAZOL NA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE CREME EMPREGANDO A ELETROFORESE CAPILAR EM ZONA (CZE)

4.2.3.1. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ESPECÍFICA POR CZE

Os sistemas estudados estão explicados no quadro 3.

Quadro 3 – Sistemas estudados no desenvolvimento da metodologia específica por CZE

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4
Eletrólito	20 mM tampão fosfato pH 2,50*	20 mM tampão fosfato pH 2,50*	20 mM tampão fosfato pH 2,50*	20 mM tampão fosfato pH 2,50*
Comprimento do capilar (cm) **	41,50	41,50	23,00	23,00
Voltagem (kV)	20	30	30	30
Temperatura (°C)	25	25	25	25
Deteção (nm)	200	200	200	200
Solvente do analito***	álcool metílico	álcool metílico	álcool metílico	ácido clorídrico 37 mM
Solvente do padrão interno ****	água	água	água	ácido clorídrico 37 mM

* o pH 2,50 foi ajustado com ácido fosfórico.

** comprimento do capilar até o detector.

*** solvente para dissolver o padrão do nitrato de econazol.

**** solvente para dissolver o imidazol (padrão interno)

4.2.3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECÍFICO POR ELETROFORESE CAPILAR EM ZONA (CZE)

Preparação da solução padrão de nitrato de econazol

Foram pesados 40 mg de nitrato de econazol e transferidos para um balão volumétrico de 200 mL. Foram adicionados 150 mL de ácido clorídrico 37 mM e transferidos para banho ultra-som por 10 minutos para completa dissolução. Completou-se o volume com o mesmo solvente e obteve-se uma concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol.

Preparação da solução padrão de imidazol (padrão interno)

Foram pesados 200 mg de imidazol e transferidos para um balão volumétrico de 200 mL. Foram adicionados 150 mL de ácido clorídrico 37 mM para completa dissolução, em seguida foi completado o volume com o mesmo solvente. Obteve-se uma concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de imidazol.

Preparação da solução padrão de alfa-(2,4-diclorofenil)-1H-imidazol-1-etanol (DCF) (impureza)

Foram pesados 10 mg de DCF e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico 37 mM e colocado em banho de ultra-som por 10 minutos para completa dissolução. Completou-se o volume com o mesmo solvente e obteve-se uma concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3.2.1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Na padronização do método foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Coluna capilar: sílica fundida 31,5 cm de comprimento total (23,0 cm até o detector), 50 μm d.i.
- Eletrólito: tampão fosfato 20 mM com pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico.
- Voltagem: +30 kV.

- Detecção UV: 200 nm.
- Temperatura: 25°C.

4.2.3.2.2. LINEARIDADE

Procedimento

Foram transferidas alíquotas de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mL da solução padrão (nitrato de econazol 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida, transferiram-se alíquotas de 1,0 mL da solução do padrão interno (imidazol 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para cada balão. Depois, foram completados os volumes de cada balão com ácido clorídrico 37 mM. Obtiveram-se concentrações finais de 80,0; 90,0; 100,0; 110,0 e 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de imidazol (padrão interno em cada balão volumétrico).

A linearidade do método para nitrato de econazol foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (nitrato de econazol/imidazol).

4.2.3.2.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para o método eletroforético foram determinados através do desvio padrão (DP) e inclinação (I) da curva de calibração.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado pelas seguintes equações⁷²:

$$\text{LD} = (\text{DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA}) \times 3,3 \quad (\text{eq.15})$$

$$\text{LQ} = (\text{DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA}) \times 10 \quad (\text{eq.16})$$

4.2.3.2.4. PRECISÃO DO SISTEMA

Foi tomada uma alíquota de 25 mL da solução padrão do nitrato de econazol ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 5 mL da solução do padrão interno ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) para um balão de 50 mL. O volume foi completado com a solução de ácido clorídrico 37 mM. Obtiveram-se concentrações finais de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno. A mistura teste foi injetada 20 vezes no sistema.

4.2.3.2.5. PRECISÃO DO MÉTODO

A) REPETIBILIDADE

Para este ensaio trabalhou-se com a amostra comercial citada no item 4.1.3.1.

Pesaram-se 0,25 g do creme em um béquer, adicionaram-se 10 mL de ácido clorídrico 37 mM e aqueceu-se a mistura em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Em seguida, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções do solvente que foram transferidas para o balão. Foram adicionados 2,5 mL do padrão interno ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o volume foi completado com o mesmo solvente. Em seguida, filtrou-se com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Obtiveram-se concentrações finais de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno. O procedimento foi repetido dez vezes e as leituras para cada repetição foram em triplicata.

B) PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Foram preparadas três concentrações da amostra do creme (20% acima e abaixo da concentração nominal). Para isto foram pesados 0,20; 0,25 e 0,30 g de creme para cada concentração em um béquer, adicionando-se 10 mL de ácido clorídrico 37 mM aquecidos em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Nesse momento, os conteúdos dos béqueres foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, os béqueres foram lavados com pequenas porções do solvente e transferidos para os balões. Foram adicionados 2,5

mL do padrão interno ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) para cada balão, sendo o volume completado com o mesmo solvente. Em seguida, filtrou-se com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Obtiveram-se concentrações finais de 80; 100 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno para cada balão. O procedimento foi repetido três vezes para cada concentração e as leituras para cada concentração foram em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado em três dias consecutivos.

4.2.3.2.6. EXATIDÃO

Foram transferidas alíquotas de 2,0; 2,5 e 3,0 mL da solução padrão (nitrato de econazol $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 1,0 mL da solução do padrão interno (imidazol $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) para três balões volumétricos de 10,0 mL. Também foram adicionadas alíquotas de 5,0 mL de cada solução da amostra comercial 80; 100 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a preparação foi mencionada anteriormente na precisão intermediária). O volume foi completado com ácido clorídrico 37mM para obter as concentrações finais de 80; 100 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol. As soluções foram filtradas e injetadas no equipamento de eletroforese capilar. Os testes de exatidão foram realizados em triplicata.

Quadro 4 - Procedimento experimental para o teste de recuperação do método específico por CZE

Solução padrão nitrato de econazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução amostra comercial ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Padrão interno imidazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração final		Volume Final
200,0	80,0	100,0	120,0	1.000	econazol	imidazol	
Alíquotas (mL)					(μg mL ⁻¹)		(mL)
3,0			5,0	1,0	120,0	100,0	10,0
2,5		5,0		1,0	100,0	100,0	10,0
2,0	5,0			1,0	80,0	100,0	10,0

4.2.3.2.7. ESPECIFICIDADE

A especificidade do método foi realizada nos seguintes materiais:

A) PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DO PLACEBO DO CREME

Foram pesados 0,50 g de placebo (preparado como mencionado no item 4.1.3.2.) em um béquer; adicionaram-se 10 mL de ácido clorídrico 37 mM e aqueceu-se em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme do placebo estivesse fundido. Nesse momento, o conteúdo do béquer foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções do solvente e o líquido foi transferido para o balão volumétrico, sendo o volume completado com o mesmo solvente. Logo, se filtrou com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Esta solução foi injetada ao equipamento em triplicata.

B) PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DA IMPUREZA DO NITRATO DE ECONAZOL

Foram pesados 0,50 g de creme em um béquer, adicionaram-se 10 mL de ácido clorídrico 37 mM e aqueceu-se em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme do placebo estivesse fundido. Nesse momento, o conteúdo do béquer foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções do solvente e acrescentaram-se 5 mL da solução padrão do DCF ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 5 mL da solução do padrão interno (imidazol $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$). O volume foi completado com o mesmo solvente. Logo, se filtrou com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Esta solução foi injetada ao aparelho em triplicata.

4.2.3.2.8. ROBUSTEZ

A robustez do método foi realizada pela comparação dos resultados experimentais para duas amostras comerciais de diferentes lotes, quando se utiliza dois equipamentos. Testes de significância foram realizados nos resultados, a fim de

verificar se existe diferença estatisticamente significativa. Para comparar a exatidão e a precisão do método proposto, o teste *t* e o teste F foram utilizados^{10,24}.

Para este ensaio foi preparada uma curva de calibração como descrito no item 4.2.3.1.2.2. e uma recuperação da amostra comercial à concentração de 100 µg mL⁻¹ de nitrato de econazol e 100 µg mL⁻¹ de imidazol (padrão interno), utilizando dois lotes diferentes. A preparação das amostras comerciais foi feita como descrito no item 4.2.3.1.2.5.

4.2.3.2.9. ANÁLISE DO TEOR DE PUREZA DAS AMOSTRAS

Foram preparadas duas soluções padrão da seguinte forma: pesaram-se 5 mg de nitrato de econazol (matéria-prima), transferidos para balão volumétrico de 50 mL; em seguida, adicionou-se 5 mL da solução do padrão interno (imidazol 1.000 µg mL⁻¹), depois, o volume foi completado com ácido clorídrico 37 mM para obter a concentração final de 100 µg mL⁻¹ de nitrato de econazol e 100 µg mL⁻¹ de imidazol (padrão interno).

Foram preparadas duas amostras da seguinte forma: pesaram-se 0,25 g do creme em um béquer, adicionaram-se 20 mL de ácido clorídrico 37 mM e aqueceu-se a mistura em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Em seguida, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções de solvente que foram transferidas para o balão. Foram adicionados 2,5 mL do padrão interno (1.000 µg mL⁻¹), sendo o volume completado com ácido clorídrico 37 mM. Em seguida, filtrou-se com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Obtiveram-se concentrações finais de 100 µg mL⁻¹ de nitrato de econazol e 100 µg mL⁻¹ de padrão interno.

4.2.4. METODOLOGIA ANALÍTICA SELETIVA PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRATO DE ECONAZOL NA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE CREME

4.2.4.1. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA SELETIVA EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os sistemas estudados estão explicados no Quadro 5

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA SELETIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Preparação das soluções padrão de nitrato de econazol, nitrato de miconazol, metilparabeno, propilparabeno, DCF e ACB

Foram pesadas quantidades determinadas dos padrões e, em seguida, transferidos para balões volumétricos. Foram dissolvidos com álcool metílico e, em seguida, se completou o volume com o mesmo solvente. Obtiveram-se concentrações de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o nitrato de econazol, $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o nitrato de miconazol, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o metilparabeno, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o propilparabeno, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o 4-álcool clorobenzílico e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o DCF. Tanto para o ACB quanto para o DCF (impurezas) se realizaram diluições posteriores para obter concentrações de 20 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.4.1.1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Na padronização do método foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: álcool metílico (B) e água (A).
- Eluição: Gradiente segmentado:
 - B: 57 a 72% em 6,5 minutos
 - B: 72 a 98% em 3,5 minutos
 - B: 98 a 98% até 15 minutos
- Fase estacionária: Coluna Bondclone RP Phenomenex® 10 μm , 300 x 3,9 mm.
- Vazão: $1,4 \text{ mL min}^{-1}$.
- Detecção UV: 220 nm.
- Temperatura: 25°C.
- Volume de injeção: 20 μL .
- Padrão interno: nitrato de miconazol.

4.2.4.1.2. LINEARIDADE

Procedimento

Foram transferidas alíquotas (segundo a Tabela 2) para balões volumétricos de 10,0 mL e, em seguida, completou-se o volume com álcool metílico. Obtiveram-se concentrações finais de 70 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o nitrato de econazol; 30 a 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o metilparabeno; 8 a 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o propilparabeno; 0,2 a 6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o ACB; 0,2 a 6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o DCF e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o nitrato de miconazol (padrão interno)

Quadro 6 - Procedimento para a linearidade do método seletivo por CLAE

	Balões (mL)					
	1	2	3	4	5	6
Nitrato de econazol (1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,70	0,80	0,90	1,00	1,10	1,20
Metilparabeno (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00	1,10
Propilparabeno (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
ACB (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,10	0,70	1,30	--	--	--
ACB (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	--	--	--	0,95	1,25	1,55
DCF (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,10	0,70	1,30	--	--	--
DCF (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	--	--	--	0,95	1,25	1,55
Nitrato de miconazol (1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Volume final (mL)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

A linearidade do método para todos os analitos foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (analito/nitrato de miconazol).

4.2.4.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para o método cromatográfico desenvolvido foram determinados através do desvio-padrão (DP) e da inclinação (I) das curvas de calibração correspondentes a cada um dos analitos separados⁷².

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio-padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado pelas seguintes equações⁷²:

$$LD = (\text{DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA}) \times 3,3 \quad (\text{eq.15})$$

$$LQ = (\text{DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA}) \times 10 \quad (\text{eq.16})$$

4.2.4.1.4. PRECISÃO DO SISTEMA

Pesaram-se 4 mg de nitrato de econazol em um balão volumétrico de 50 mL, em seguida, transferiram-se 5 mL da solução padrão de nitrato de miconazol (1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foi completado o volume com álcool metílico, obtendo-se concentrações de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o nitrato de econazol e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o nitrato de miconazol (padrão interno). A mistura teste foi injetada 20 vezes no sistema.

4.2.4.1.5. PRECISÃO DO MÉTODO

A) REPETIBILIDADE

Para este ensaio trabalhou-se com a amostra comercial citada no item 4.1.3.1.

Pesaram-se 0,25 g do creme em um béquer, adicionaram-se 10 mL de uma mistura de álcool metílico e água 50:50 (v/v) e aqueceu-se a mistura em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Em seguida, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções do solvente que foram transferidas para o balão. Foram adicionados 2,5 mL do padrão interno (1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o volume foi completado com a mesma mistura de solventes. Em seguida, filtrou-se com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Obtiveram-se concentrações finais de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno. Por último, as amostras foram filtradas em filtro Millex 0,22 μm e analisadas por CLAE.

O procedimento foi repetido dez vezes e as leituras para cada repetição foram em triplicata.

B) PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Foram preparadas três concentrações da amostra do creme (20% acima e abaixo da concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para isto, foram pesados 0,20; 0,25 e 0,30 g de creme para cada concentração em um béquer, adicionaram-se 10 mL da mistura 50:50 de água:álcool metílico e aqueceu-se em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Nesse momento, os conteúdos dos béqueres foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, os béqueres foram lavados com pequenas porções da mistura de solventes e transferidas para os balões. Foram adicionados 2,5 mL do padrão interno ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) para cada balão, sendo o volume completado com a mesma mistura de solventes. Logo, se filtrou com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Obtiveram-se concentrações finais de 80; 100 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno para cada balão. Por último, as amostras foram filtradas em filtro Millex $0,22\mu\text{m}$ e analisadas por CLAE. O procedimento foi repetido três vezes para cada concentração e as leituras para cada concentração foram em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado em três dias consecutivos.

4.2.4.1.6. EXATIDÃO

Foram transferidas alíquotas de 0,8; 1,0 e 1,2 mL da solução padrão (nitrato de econazol $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 1,0 mL da solução do padrão interno (nitrato de miconazol $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) para três balões volumétricos de 10,0 mL. Também foram adicionadas alíquotas de 5,0 mL de cada solução da amostra comercial 80; 100 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a preparação foi mencionada anteriormente na precisão intermediária). O volume foi completado com álcool metílico para obter as concentrações finais de 80; 100 e $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol. Por último, as amostras foram filtradas em filtro Millex $0,22 \mu\text{m}$ e analisadas por CLAE. Os testes de exatidão foram realizados em triplicata.

Quadro 7 - Procedimento experimental para o teste de recuperação do método seletivo por CLAE

Solução padrão nitrato de econazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução amostra comercial ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Padrão interno miconazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração final		Volume final
1.000	80,0	100,0	120,0	1.000	econazol	miconazol	
Alíquotas (mL)					($\mu\text{g mL}^{-1}$)		(mL)
1,2			5,0	1,0	120,0	100,0	10,0
1,0		5,0		1,0	100,0	100,0	10,0
0,8	5,0			1,0	80,0	100,0	10,0

4.2.4.1.7. ESPECIFICIDADE

A especificidade do método foi realizada nos seguintes materiais:

A) PLACEBO DO CREME

Foram pesados 0,25 g de placebo (preparado como mencionado no item 4.1.3.2.) em um béquer, adicionaram-se 10 mL da mistura água:álcool metílico (50:50) e aqueceu-se em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Nesse momento, o conteúdo do béquer foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções do solvente, o líquido foi transferido para o balão volumétrico e o volume foi completado com a mesma mistura de solventes. Em seguida, filtrou-se com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Por último, a amostra do placebo foi filtrada em filtro Millex 0,22 μm e analisada por CLAE. Esta solução foi injetada no equipamento em triplicata.

4.2.4.1.8. ROBUSTEZ

A robustez do método foi realizada pela comparação dos resultados experimentais obtidos à concentração nominal ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Constatando-se a susceptibilidade do método a variações deliberadas nos parâmetros de temperatura e comprimento de onda.

4.2.4.1.9. ANÁLISE DO TEOR DE PUREZA DAS AMOSTRAS

Foram preparadas duas soluções padrão da seguinte forma: pesaram-se 5 mg de nitrato de econazol (matéria-prima), transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Em seguida, adicionaram-se 5 mL da solução do padrão interno (nitrato de miconazol $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), depois o volume foi completado com uma mistura de solventes água:álcool metílico (50:50) para obter a concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de miconazol (padrão interno).

Foram preparadas duas amostras da seguinte forma: pesaram-se 0,25 g do creme em um béquer, adicionaram-se 20 mL da mistura água:álcool metílico (50:50) e aqueceu-se a mistura em banho-maria à temperatura aproximada de 65°C até que o creme estivesse fundido. Em seguida, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, o béquer foi lavado com pequenas porções do solvente que foram transferidos para o balão. Foram adicionados 2,5 mL do padrão interno ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo o volume completado com a mistura de solventes. Em seguida, filtrou-se com papel filtro faixa azul, desprezando-se os primeiros 10 mL. Obtiveram-se concentrações finais de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno. Por último, as amostras foram filtradas em filtro Millex 0,22 μm e analisadas por CLAE. O procedimento foi repetido dez vezes e as leituras para cada repetição foram em triplicata.

4.2.4.2. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA SELETIVA EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA CAPILAR ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

No desenvolvimento da metodologia seletiva utilizando a cromatografia capilar eletrocinética foram estudados 7 sistemas, onde foram separados o nitrato de econazol, suas impurezas relatadas na literatura (DCF, ACB) e conservantes presentes na formulação (metilparabeno, propilparabeno).

Realizaram-se diluições das soluções padrões (indicados no item 4.1.5.), para preparar os tampões utilizados neste desenvolvimento.

Também foram otimizados os solventes utilizados para diluir os padrões e a voltagem aplicada na separação.

Os sistemas estudados estão explicados no quadro 8.

Quadro 8 – Sistemas estudados no desenvolvimento da metodologia seletiva empregando a cromatografia capilar eletrocínética micelar

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5	Sistema 6	Sistema 7
Eletrólito	tampão tetraaborato de sódio 20 mM; 20 mM SDS	tampão tetraaborato de sódio 20 mM; 20 mM SDS	tampão tetraaborato de sódio 20 mM; 20 mM SDS; 0,4% β -CD	tampão tetraaborato de sódio 20 mM; 20 mM SDS; 0,12% β -CD	tampão tetraaborato de sódio 20 mM; 20 mM SDS; 0,05% β -CD	tampão tetraaborato de sódio 20 mM; 20 mM SDS; 0,05% β -CD	tampão tetraaborato de sódio 10 mM; 50 mM SDS; 0,05 β -CD
Comprimento do capilar (cm)	50	50	50	50	50	50	50
Voltagem (kV)	15	20	20	20	25	30	30
Deteção UV (nm)	200	200	200	200	200	200	200
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	25	25
Solvente dos padrões	álcool metílico 50: água 50	álcool metílico 50: ácido clorídrico 37 mM 50	álcool metílico 50 : ácido clorídrico 37 mM 50	álcool metílico 50 : ácido clorídrico 37 mM 50	álcool metílico 50 : ácido clorídrico 37 mM 50	álcool metílico 50 : ácido clorídrico 37 mM 50	álcool metílico 50 : ácido clorídrico 37 mM 50

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. NITRATO DE ECONAZOL NA FORMA ISOLADA

5.1.1. IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA

5.1.1.1. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL

O espectro de absorção do nitrato de econazol ($400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) no UV, apresentado na Figura 8, mostra três picos de absorvância a 265, 271 e 280 nm. O pico de maior absorvância encontra-se em 271 nm, como está descrito na literatura oficial^{16,22,60,80}.

Figura 8: Espectro de absorção do nitrato de econazol no UV-Visível ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$). Principais picos (1) 280 nm; (2) 271 nm; (3) 265 nm.

5.1.1.2. ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO

O espectro de absorção do nitrato de econazol no infravermelho (IV) apresentado na Figura 9, mostra picos correspondentes aos seguintes números de onda: 1.090, 1.311, 805, 827, 1.009, 1.042 cm^{-1} , os quais são compatíveis com os descritos na literatura²².

Figura 9 – Espectro de absorção no infravermelho do nitrato de econazol

5.1.1.3. PONTO DE FUSÃO

A determinação do ponto de fusão do nitrato de econazol indicou transição para o estado líquido à temperatura de 162°C; este valor se encontra na faixa descrita nos documentos oficiais^{16, 29, 80}.

5.1.1.4. PERDA POR DESSECAÇÃO

A perda por dessecação está dentro dos limites preconizados pela Farmacopéia Britânica¹⁶.

Tabela 1 - Perda por dessecação de 1 g de nitrato de econazol mantido em estufa a 100 - 105°C durante 2 horas

Réplicas	(%)
Primeira	0,040
Segunda	0,020
Terceira	0,022
Média	0,027

5.1.1.5. REAÇÃO QUÍMICA

A identificação mediante reação química do nitrato de econazol foi positiva para a matéria-prima, apresentando coloração azul intensa (como é indicado na Figura 10)⁸⁰.

Figura 10: Identificação do nitrato de econazol mediante reação química.

5.1.1.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A identificação por cromatografia em camada delgada, apresentada na Figura 11, permitiu comparar duas matérias-primas de distintos laboratórios, obtendo-se valores de R_f similares. Esta comparação foi realizada de acordo com as especificações da Farmacopéia Britânica¹⁶.

Tabela 2 - Resultados dos fatores de retenção (R_f) para amostras de nitrato de econazol por cromatografia em camada delgada.

Amostra	R_f
Solução teste "a"	0.470
Solução teste "b"	0,465
Solução de referencia "a"	0,470

Figura 11: Análise cromatográfica do nitrato de econazol. Condições: fase fixa: sílica gel GF254; eluente: amônia concentrada : tolueno : dioxano 1:40:60 (v/v/v)

- (1) Nitrato de econazol (Formil) matéria-prima 50,0 mg mL⁻¹
- (2) Nitrato de econazol (Formil) matéria-prima 5,0 mg mL⁻¹
- (3) Nitrato de econazol (Stiefel) matéria-prima 5,0 mg mL⁻¹

5.1.1.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR

A determinação quantitativa do nitrato de econazol (matéria-prima) foi realizada mediante uma titulação potenciométrica, como é recomendado pelas diversas farmacopéias, obtendo-se pureza de 99,69%^{16, 29, 80}.

Tabela 3 - Resultados da determinação quantitativa do nitrato de econazol por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1 N.

Réplicas	Teor (mg)	Teor em %
Primeira	399,61	99,90
Segunda	398,63	99,65
Terceira	398,12	99,53
Média	398,79	99,69

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO NITRATO DE ECONAZOL (MATÉRIA-PRIMA), EXCIPIENTES E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EMPREGANDO AS TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

5.2.1. NITRATO DE ECONAZOL

A curva TG mostra que o nitrato de econazol é termoe estável até aproximadamente 170°C, seguido de um evento de decomposição térmica na T. pico aproximado de 194°C. A curva DSC mostra o primeiro pico endotérmico agudo a 165°C, correspondente à fusão do composto, seguido de um processo exotérmico que é atribuído à decomposição do princípio ativo. As curvas TG/DTG e DSC do nitrato de econazol obtidas de acordo com as condições descritas estão apresentadas na Figura 12. As perdas de massa e temperaturas características do nitrato de econazol estão descritas nas Tabelas 4 e 5.

Figura 12 - Curvas TG/DTG e DSC do nitrato de econazol obtidas a 10°C min⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 ml. min⁻¹

Tabela 4 – Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição do nitrato de econazol obtidos pelas curvas TG/DTG com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Amostra	Eventos	Tdecomposição ($^{\circ}\text{C}$)	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Produto Final (%)
Nitrato de econazol	1 $^{\circ}$	194,69	22,39		77,61
	2 $^{\circ}$	322,54		66,98	10,63

Tabela 5 – Dados de temperatura onset (Tonset), temperatura de pico (Tpico) e entalpias de decomposição e fusão do nitrato de econazol, obtido pela curva DSC com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Amostra	Eventos	Tonset ($^{\circ}\text{C}$)	Tpico ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H_{\text{fusão}}$ (J g^{-1})	$\Delta H_{\text{decomposição}}$ (J g^{-1})
Nitrato de econazol	1 $^{\circ}$	162,77	164,64	-69,71	
	2 $^{\circ}$	168,15	191,31		579,43

5.2.2. EXCIPIENTES EMPREGADOS NA FORMULAÇÃO

A caracterização dos excipientes por termogravimetria (TG) permitiu observar o comportamento térmico dos excipientes presentes na formulação. As curvas TG dos excipientes presentes na formulação do creme, obtidas de acordo com as condições descritas, estão apresentadas na Figura 13. A Tabela 6 mostra as perdas de massa e os eventos térmicos de cada um dos excipientes.

Figura 13 - Sobreposição das curvas TG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL min^{-1} dos excipientes utilizados na formulação do creme.

5.2.3. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CREME

As curvas TG/DTG evidenciaram perdas de massa que se mostraram contínuas, da temperatura ambiente até aproximadamente os 62°C. Nessa faixa de temperatura mostraram-se dois eventos, os quais sugerem a presença de diferentes formas de interação da água com a matriz.

As variações de massa correspondem à quantidade total de água liberada, já que tanto o nitrato de econazol quanto os excipientes não sofrem perda de massa nesse intervalo de temperatura. Com base nisso, a água livre (*bulk water*) ligada fracamente é liberada em temperatura relativamente baixa, que pode ser diferenciada da água interlamelar (*interlamellary water*) ligada fortemente, a qual é liberada à temperatura mais elevada. A curva DSC confirma a presença dos dois tipos de água.

As curvas TG/DTG e DSC da formulação do creme, obtidas de acordo com as condições descritas, estão apresentadas na Figura 14. Nas Tabelas 7 e 8 apresentam-se as perdas de massa e suas temperaturas respectivas.

Figura 14 - Curvas TG/DTG e DSC obtidas a $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do creme de nitrato de econazol.

Tabela 7 – Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição do creme de nitrato de econazol obtidos pelas curvas TG/DTG com razão de aquecimento de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Amostra	Eventos	Tpico ($^{\circ}\text{C}$)	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Produto Final (%)
Nitrato de econazol	1 $^{\circ}$	41,37	52,51		47,49
	2 $^{\circ}$	55,71		14,53	32,96

Tabela 8 – Dados de temperatura onset (Tonset), temperatura de pico (Tpico) e entalpias do creme de nitrato de econazol, obtido pela curva DSC com razão de aquecimento de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Amostra	Eventos	Tonset ($^{\circ}\text{C}$)	Tpico ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J g^{-1})
Nitrato de econazol	1 $^{\circ}$	28,24	34,15	-366,00
	2 $^{\circ}$	50,56	51,13	-7,28

5.3. METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECÍFICA PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRATO DE ECONAZOL NA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE CREME EMPREGANDO A ELETROFORESE CAPILAR EM ZONA

5.3.1. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ESPECÍFICA POR CZE

O nitrato de econazol é uma base com um valor de pKa de 6,6 ⁷¹. Por conseguinte, pode concluir-se que quando em pH menor que 5,6 se apresenta

predominantemente na forma protonada. Este caráter iônico faz do nitrato de econazol uma molécula adequada para a análise por eletroforese capilar de zona.

A fim de se obter a melhor condição, foram testados vários eletrólitos, obtendo-se melhores resultados em termos de forma e resolução do pico com o eletrólito composto de tampão fosfato de sódio monobásico 20 mmol L⁻¹, ajustado a pH de 2,5 com ácido fosfórico.

O nitrato de econazol é muito pouco solúvel em água e a protonação do nitrogênio do imidazol resulta em aumento de sua solubilidade. Foi este o motivo para a escolha de um meio ácido para a dissolução do nitrato de econazol e para a formulação do creme.

A influência da tensão também foi avaliada. Com uma tensão de 30 kV, a análise do nitrato de econazol foi realizada em menos de 1,5 minutos. O comprimento de onda foi selecionado em 200 nm, porque neste comprimento o nitrato de econazol e o imidazol (PI) apresentaram boa absorvância e a sensibilidade do método foi aumentada. O comprimento do capilar também foi diminuído para se conseguir tempo de análise menor. As figuras de 15 a 18 são resultados da aplicação dos sistemas 1 a 4.

Figura 15 – Eletroferograma do sistema 1 por CZE. Picos: (1) imidazol (100 µg mL⁻¹), (2) nitrato de econazol (100 µg mL⁻¹), dissolvidos em álcool metílico. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 µm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 16 – Eletroferograma do sistema 2 por CZE. Picos: (1) imidazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) nitrato de econazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), dissolvidos em álcool metílico. Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μm d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 17 – Eletroferograma do sistema 3 por CZE. Picos: (1) imidazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) nitrato de econazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), dissolvidos em álcool metílico. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 μm d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 18 – Eletroferograma do sistema 4 por CZE. Picos: (1) imidazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) nitrato de econazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), dissolvidos em ácido clorídrico 37 mM. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 μm d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

5.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR

5.3.2.1. LINEARIDADE

Após serem definidos os parâmetros, foi construída a curva de calibração num intervalo de concentrações de 80 a $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrato de econazol (Figura 19, Tabela 9). Obteve-se boa linearidade, com coeficiente de correlação de $r^2 = 0,99953$

Segundo Altria⁶, um coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 e uma interseção perto da origem são satisfatórios para o método de eletroforese capilar.

Figura 19: Curva de calibração do nitrato de econazol na faixa de concentrações de 80 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$; detecção UV 200 nm; padrão interno, imidazol (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$); eletroforese capilar em zona.

Tabela 9 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE.

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico* (A/A)**
80,0	3,818
90,0	4,325
100,0	4,732
110,0	5,232
120,0	5,712
Intercepto (A)	0,0688
Inclinação (B)	0,0470
Desvio-padrão	0,0264
Coeficiente de correlação [r^2]	0,9995

* Média de três leituras.

** Razão das áreas dos picos (nittrato de econazol/imidazol)

5.3.2.2. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de detecção foi de $1,853 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $5,617 \mu\text{g mL}^{-1}$, os resultados indicam que o método utilizado apresenta boa sensibilidade.

5.3.2.3. PRECISÃO DO SISTEMA

Vinte injeções da mistura (nitrato de econazol e imidazol) foram realizadas para demonstrar a precisão do sistema. O desvio padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi de 0,889%, menor que 1%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação⁶.

5.3.2.4. PRECISÃO DO MÉTODO

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. Normalmente, é expresso pelo coeficiente de variação em número significativo de amostras^{52, 76, 80}.

A) REPETIBILIDADE

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos na determinação da repetibilidade do método. Pode-se observar que o desvio-padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação^{4,72}.

B) PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A Tabela 10 também apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária. Pode-se observar que o desvio-padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2% para as três concentrações com as que se trabalhou nos três dias consecutivos. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação^{4,72}.

Tabela 10 - Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por CZE

Nitrato de econazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Repetibilidade do método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
80,0	-----	1,92
100,0	1,73	1,40
120,0	-----	0,57

5.3.2.5. EXATIDÃO

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão do método, o qual traduz o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência^{52, 80}.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação do nitrato de econazol. Estes resultados estão na faixa de 98,14 a 102,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando uma boa recuperação⁴.

O cálculo da porcentagem de recuperação (%R)³² foi realizado segundo a equação 17:

$$\%R = \frac{F - \frac{1}{2} O}{S} \times 100 \quad (\text{eq. 17})$$

onde:

%R: porcentagem de recuperação.

F : quantidade total de nitrato de econazol (amostra + padrão adicionado).

O : quantidade de nitrato de econazol encontrado no análise.

S : quantidade de padrão adicionado à amostra.

Tabela 11 – Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por CZE

Nitrato de econazol final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação* (%)
80,0	40,4	39,64	98,14
100,0	50,5	49,60	98,22
120,0	60,6	62,11	102,48

*Média de três determinações.

5.3.2.6. ESPECIFICIDADE

A especificidade é a capacidade que um método tem de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com sua determinação numa mistura complexa⁸⁰.

As Figuras 20 e 21 mostram os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra comercial e de uma impureza relatada do nitrato de econazol^{16,29}. O placebo da amostra comercial e a impureza não apresentam interferência com o pico de nitrato de econazol nem do imidazol. Portanto, o método demonstrou ser aplicável à quantificação do nitrato de econazol na amostra comercial.

A) PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DO PLACEBO DO CREME

Figura 20 - Eletroferograma referente à solução do placebo da amostra comercial. Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 μ m d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

B) PESQUISA DE INTERFERENTES A PARTIR DA IMPUREZA DO NITRATO DE ECONAZOL

Figura 21 - Eletroferograma referente à solução de amostra comercial contaminada com a impureza DCF. Picos: (1) imidazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) nitrato de econazol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), (3) DCF ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: capilar de sílica fundida 31,5 cm x 50 μ m d.i. (23,0 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão fosfato, pH 2,5; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

5.3.2.7. ROBUSTEZ

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta quando se faz algumas variações. Um método é considerado robusto quando não é afetado por uma modificação em seus parâmetros^{6,72}.

Os resultados na Tabela 12 mostram as porcentagens de recuperação e o desvio-padrão para as duas amostras com dois equipamentos diferentes. A tabela 13 mostra a estatística aplicada aos resultados para valores de t para a exatidão e F para a precisão, o que indica que os valores encontrados são menores que os valores tabulados. Isto significa que não há diferença significativa entre as análises realizadas

nos dois equipamentos. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o método é robusto quando são empregados equipamentos diferentes.

Tabela 12 - Resultados obtidos na determinação da robustez do método específico por CZE com dois equipamentos diferentes para a análise de amostra de nitrato de econazol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Amostras	HP ^{3D} CE		P/ACE 5100	
	(%)	DP	(%)	DP
1°	100,99	2,0	101,19	2,2
2°	98,63	1,7	98,52	1,4

^a média de nove determinações.

P/ACE 5100: sistema de eletroforese capilar da Agilent Technologies.

HP^{3D}CE: sistema de eletroforese capilar da Beckman Coulter Instruments

Tabela 13 - Resultados da comparação estatística da robustez do método específico por CZE com dois equipamentos diferentes para a análise de amostra de nitrato de econazol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Amostras	Exatidão calculada <i>t</i> -valor ^a	Precisão, calculada <i>F</i> -valor ^b
1	0,19	1,22
2	0,15	1,42

^a Valor *t* de Student com P=95% e 16 graus de liberdade *t*= 2,1199 (24)

^b Valor tabulado de *F* (Snedecor) com P=95%; *F*_{9/9} = 4,433 (24).

5.3.2.8. ANÁLISE DO TEOR DE PUREZA DAS AMOSTRAS

Os resultados (Tabela 14) demonstraram que o método é adequado para a determinação de nitrato de econazol em cremes. O ensaio foi considerado satisfatório para a amostra, já que se encontra dentro da tolerância exigida pela literatura oficial^{16,29} (90-110%)

Tabela 14 - Resultados obtidos na determinação do teor de pureza da amostra comercial pelo método por CZE.

Resultados	Amostra de nitrato de Econazol
Quantidade declarada (mg)	2,50
Quantidade encontrada ^a (mg)	2,56
Porcentagem encontrada (%)	102,64
Fator de resposta DPR (%)	1,92

^a média de nove determinações

5.4. METODOLOGIA ANALÍTICA SELETIVA PARA A DETERMINAÇÃO DE NITRATO DE ECONAZOL NA FORMULAÇÃO CREME

5.4.1. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA SELETIVA EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A fim de desenvolver um método seletivo para a determinação quantitativa de nitrato de econazol, impurezas e conservantes presentes na formulação, foram testadas diferentes fases móveis para alcançar uma solução satisfatória em curto tempo de análise. Devido à forte adsorção ou retenção do nitrato de econazol e nitrato de miconazol (PI) e, pelo contrário, à fraca adsorção ou retenção das impurezas e conservantes, foi necessária a utilização da eluição por gradiente. A fase móvel que deu melhores resultados foi a mistura metanol:água, na qual se aumentou a concentração de metanol para aumentar a força da fase móvel de maneira segmentada, com o qual se conseguiu um incremento de solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel e diminuição no tempo de análise. As figuras de 22 a 29 são resultados da aplicação dos sistemas 1 a 8.

Figura 22: Perfil cromatográfico do sistema 1. Picos: ACB (7,994 min.), metilparabeno (10,089 min), propilparabeno (15,762 min), DCF (20,210 min.), nitrato de econazol (36,733 min.) e nitrato de miconazol (40,214 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente linear); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 23: Perfil cromatográfico do sistema 2. Picos ACB (5,224 min.), metilparabeno (6,606 min), propilparabeno (10,283 min), DCF (11,338 min.), nitrato de econazol (28,232 min.) e nitrato de miconazol (31,796 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente linear); vazão 1,2 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 24: Perfil cromatográfico do sistema 3. Picos: ACB (5,173 min.), metilparabeno (6,505 min), propilparabeno (9,914 min), DCF (10,986 min.), nitrato de econazol (19,930 min.) e nitrato de miconazol (21,035 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex[®]; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,2 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 25: Perfil cromatográfico do sistema 4. Picos: ACB (5,986 min.), metilparabeno (7,708 min), propilparabeno (11,264 min), DCF (11,885 min.), nitrato de econazol (22,775 min.) e nitrato de miconazol (23,801 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex[®]; fase móvel: álcool metílico: tampão carbonato de amônio 0,1% pH 6,5 (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,2 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 26: Perfil cromatográfico do sistema 5. Picos: ACB (6,051 min.), metilparabeno (7,609 min), propilparabeno e DCF (11,496 min.), nitrato de econazol (22,651 min.) e nitrato de miconazol (23,665 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: tampão trietanolamina 0,1% pH 6,4 (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,2 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 27: Perfil cromatográfico do sistema 6. Picos: ACB (4,335 min.), metilparabeno (5,461 min), propilparabeno (8,394 min), DCF (10,168 in.), nitrato de econazol (20,542 min.) e nitrato de miconazol (21,567 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 28: Perfil cromatográfico do sistema 7. Picos: ACB (4,148 min.), metilparabeno (5,106 min), propilparabeno (7,473 min), DCF (8,287 in.), nitrato de econazol (16,778 min.) e nitrato de miconazol (17,520 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

Figura 29: Cromatograma do sistema 8. Picos: ACB (4,028 min.), metilparabeno (5,000 min), propilparabeno (7,107 min), DCF (7,849 in.), nitrato de econazol (13,252 min.) e nitrato de miconazol (13,827 min.). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico: água (eluição com gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

5.4.1.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA SELETIVA POR CLAE

5.4.1.1.1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Na padronização do método foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: álcool metílico (B) e água (A).
- Eluição: Gradiente segmentado:
 - B: 57 a 72% até 6,5 minutos;
 - B: 72 a 98% até 10 minutos;
 - B: 98 a 98% até 15 minutos.
- Fase estacionária: Coluna Bondclone RP Phenomenex® 10 µm, 300 x 3,9 mm.
- Vazão: 1,4 mL min⁻¹.
- Detecção UV: 220 nm.
- Temperatura: 25°C.
- Volume de injeção: 20 µL
- Padrão interno: nitrato de miconazol.

5.4.1.1.2. LINEARIDADE

Após serem definidos os parâmetros, foram construídas as curvas de calibração para o nitrato de econazol, metilparabeno, propilparabeno, ACB e DCF; todas apresentaram coeficientes de correlação (r^2) superior a 0,99. Os parâmetros das curvas de calibração de todos os compostos estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados obtidos nas determinações nas curvas de calibrações para o nitrato de econazol, as impurezas e os conservantes, pelo método seletivo por CLAE com eluição gradiente.

	Faixa de c.c. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intercepto (A)	Inclinação (B)	Error (A)	Error (B)	Desvio-padrão	Coefficiente de correlação
N. Econazol	70 a 120	0,08344	0,01008	0,03323	3,44E-04	0,01440	0,9977
Metilparabeno	30 a 55	0,01915	0,00658	0,00972	0,24E-04	0,00469	0,9977
Propilparabeno	8 a 18	0,00306	0,00505	0,00140	1,04E-04	8,70E-04	0,9992
ACB	0,2 a 6,2	-0,00149	0,01436	0,00116	3,05E-04	0,00153	0,99910
DCF	0,2 a 6,2	-0,00111	0,00858	6,83E-04	1,80E-04	9,03E-04	0,9991

5.4.1.1.3. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação do método CLAE gradiente foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o nitrato de econazol, metilparabeno, propilparabeno, ACB e DCF. A Tabela 16 apresenta os respectivos valores de limites de detecção e quantificação para cada uma das moléculas.

Tabela 16 - Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação para o nitrato de econazol, as impurezas e os conservantes, pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente

	N. Econazol	Metilparabeno	Propilparabeno	ACB	DCF
L.D. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,71	2,35	0,57	0,35	0,35
L.Q. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	14,29	7,13	1,72	1,06	1,05

5.4.1.1.4. PRECISÃO DO SISTEMA

A mistura (nitrato de econazol e nitrato de miconazol) foi injetada 20 vezes para demonstrar a precisão do sistema. O desvio-padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi de 0,252%, menor que 1%. Portanto, a precisão do sistema foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação⁶.

5.4.1.1.5. PRECISÃO DO MÉTODO

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos na determinação da repetibilidade e da precisão intermediária. Pode-se observar que o %DPR para as duas determinações foi menor que 2%. Portanto, a precisão do método foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação^{4,72}.

Tabela 17 - Resultados obtidos na determinação da precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária) para o nitrato de econazol, pelo do método seletivo por CLAE com eluição em gradiente

Nitrato de econazol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Repetibilidade do método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
80,0	-----	1,37
100,0	1,74	1,36
120,0	-----	1,30

5.4.1.1.6. EXATIDÃO

A Tabela 18 mostra os resultados obtidos na determinação do teste de recuperação do nitrato de econazol. Estes resultados estão na faixa de 97,88 a 102,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e apresentam boa recuperação.

Tabela 18 – Resultados obtidos na determinação da exatidão para o nitrato de econazol pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente

Nitrato de econazol final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação* (%)
80,0	40,0	39,15	97,88
100,0	50,0	51,13	102,26
120,0	60,0	60,68	101,13

*Média de três determinações.

5.4.1.1.7. ESPECIFICIDADE

A especificidade é a capacidade que um método tem de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com sua determinação numa mistura complexa^{76, 80}. A figura 30 mostra os resultados obtidos da pesquisa de interferências a partir dos excipientes da amostra comercial. O placebo da amostra comercial não apresenta interferência com os picos do nitrato de econazol e do padrão interno (nitrato de miconazol). Portanto, o método demonstrou ser aplicável à quantificação do nitrato de econazol na amostra comercial.

Figura 30: Cromatograma referente à solução do placebo da amostra comercial (A); cromatograma da amostra comercial (B). Condições: coluna Bondclone RP Phenomenex®, fase móvel: álcool metílico: água (eluição gradiente segmentado); vazão 1,4 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 220 nm.

5.4.1.1.8. ROBUSTEZ

Mudanças na temperatura e comprimento de onda foram avaliadas. Cerca de 1,8% de diferença foi observado no resultado mais crítico, quando os parâmetros analíticos foram modificados em comparação com as condições originais. Então pode-se concluir que o método é robusto a pequenas variações de temperatura e comprimento de onda.

Tabela 19 - Resultados obtidos na determinação da robustez com a mudança da temperatura para o nitrato de econazol pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente

Nitrato de econazol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	23°C	25°C	27°C
Razão das áreas	1,138	1,139	1,138

Tabela 20 - Resultados obtidos na determinação da robustez com a mudança do comprimento de onda para o nitrato de econazol pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente

Nitrato de econazol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	218 nm	220 nm	222 nm
Razão das áreas	1,112	1,132	1,142

5.4.1.1.9. ANÁLISE DO TEOR DE PUREZA DAS AMOSTRAS

Os resultados (Tabela 21) demonstraram que o método é adequado para a determinação quantitativa do nitrato de econazol em cremes. O ensaio foi considerado satisfatório para a amostra, já que se encontra dentro da tolerância exigida pela literatura oficial^{16,29} (90-110%).

Tabela 21 - Resultados obtidos na determinação do teor de pureza para a amostra do nitrato de econazol, pelo método seletivo por CLAE com eluição em gradiente

Resultados	Amostra de nitrato de econazol
Quantidade declarada (mg)	2,50
Quantidade encontrada ^a (mg)	2,64
Porcentagem encontrada (%)	105,50
Fator de resposta DPR (%)	1,32

^a média de nove determinações

5.4.2. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA SELETIVA EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

O objetivo deste método foi a separação simultânea de nitrato de econazol, conservantes (metilparabeno e propilparabeno) e impurezas do nitrato de econazol (DCF e ACB).

Para cumprir este objetivo foi utilizada a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) a qual é uma modalidade da eletroforese capilar que permite a separação de cátions, ânions e moléculas neutras. Foram testadas diferentes concentrações de tetraborato de sódio e do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS); como também foram testados diferentes meios de dissolução dos padrões.

O eletrólito intermediário consistia de 20 mM de tetraborato de sódio e 20 mM de SDS. Com este eletrólito, cinco picos dos seis apresentaram boa simetria e boa resoluções entre eles. O pico da impureza do nitrato de econazol ACB não apresentava boa simetria. Para solucionar este problema, optou-se pela inclusão de ciclodextrina, a qual permitiu a melhora na simetria da impureza. O eletrólito finalmente desenvolvido foi de 10 mM de tetraborato de sódio, 50 mM de SDS, 0,05 % β -ciclodextrina a um pH aproximado de 9. Com estas mudanças nas concentrações dos componentes do

eletrólito se conseguiu tempo menor de análise. Os seguintes sistemas foram testados (Figuras 31 a 37).

Figura 31: Cromatograma do sistema 1: mistura do nitrato de econazol (5); nitrato de miconazol (6); metilparabeno (2); propilparabeno (3); DCF (4) e ACB (1). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 32: Cromatograma do sistema 2: mistura do nitrato de econazol (5); metilparabeno (2); propilparabeno (3); DCF (4) e ACB(1). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 33: Cromatograma do sistema 3: mistura de nitrato de econazol (5); metilparabeno (2); propilparabeno (3); DCF (4) e ACB (1). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,4% de β -CD; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 34: Cromatograma do sistema 4: mistura de nitrato de econazol (5); metilparabeno (2); propilparabeno (3), DCF (4) e ACB (1). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,12% de β -CD; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 35: Cromatograma do sistema 5: mistura de nitrato de econazol (5); metilparabeno (2), propilparabeno (3); DCF (4) e ACB (1). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,05% de β -CD; voltagem aplicada: +25 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 36 - Cromatograma do sistema 6: mistura de nitrato de econazol (6); metilparabeno (2); propilparabeno (3); DCF (5), ACB (1) e ácido salicílico (4). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 20 mM tampão tetraborato de sódio, 20 mM de SDS, 0,05% de β -CD; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Figura 37 - Cromatograma do sistema 7: mistura de nitrato de econazol (6); metilparabeno (1); propilparabeno (4); DCF (5), ACB (2) e ácido salicílico (3). Condições: capilar de sílica fundida 50 cm x 50 μ m d.i. (41,5 cm até detector); eletrólito: 10 mM tampão tetraborato de sódio, 50 mM de SDS, 0,05% de β -CD; voltagem aplicada: +30 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 50 mbar em 5 segundos. Detecção UV, 200 nm.

Resumindo, os resultados obtidos na identificação qualitativa e quantitativa do nitrato de econazol matéria-prima foram satisfatórios. O desenvolvimento da metodologia específica para o nitrato de econazol empregando a eletroforese capilar em zona foi conseguido em menos de 1,5 minutos e a validação da metodologia, em todos os aspectos, foi satisfatória. No desenvolvimento da metodologia seletiva para nitrato de econazol, impurezas e conservantes, se empregaram a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. No método seletivo por CLAE com eluição em gradiente, se conseguiu boa separação entre as moléculas com um tempo menor de análise (15 minutos). A validação da metodologia foi atingida em todos seus pontos. Por fim, no desenvolvimento da metodologia seletiva empregando MEKC, se conseguiu tempo menor da análise (6 minutos).

6. CONCLUSÕES

A partir das condições experimentais nas quais foi realizado o presente trabalho pode-se concluir:

- Comprovou-se a estabilidade térmica do nitrato de econazol e o perfil térmico dos excipientes presentes na formulação.
- Foram encontrados dois tipos de água na formulação farmacêutica do nitrato de econazol: água livre e água interlamelar.
- O nitrato de econazol (creme) pode ser determinado quantitativamente por eletroforese capilar em zona (CZE) na presença de eletrólito tampão fosfato 20 mM, pH 2,5.
- Os excipientes presentes na amostra e a impureza relatada não interferem com o método proposto (CZE).
- A metodologia seletiva por cromatografia líquida de alta eficiência com eluição em gradiente foi desenvolvida com boa separação entre nitrato de econazol, impurezas, conservantes e nitrato de miconazol (padrão interno). A metodologia seletiva foi conseguida em menos de 15 minutos.
- A metodologia seletiva por eletroforese capilar (MEKC) foi desenvolvida com boa separação entre nitrato de econazol, impurezas do nitrato de econazol e conservantes presentes na formulação. A metodologia seletiva desenvolvida permite a análise em menos de 6 minutos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os achados deste trabalho, verifica-se, como perspectiva futura, a oportunidade de se realizar os seguintes pontos:

- Validação de método seletivo desenvolvido por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).
- Realização de estudos de estabilidade química para a formulação do creme utilizando os métodos analíticos desenvolvidos.
- Realização de estudos de estabilidade física para a formulação do creme do nitrato de econazol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Enantiomeric resolution of some imidazole antifungal agents on Chiralpak WH chiral stationary phase using HPLC. **Chromatographia**, v.54, n.3/4, p.200-202, 2001.
2. ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Comparative study of the enantiomeric resolution of chiral antifungal drugs econazole, miconazole and sulconazole by HPLC on various cellulose chiral columns in normal phase mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, n.3/4, p.441-446, 2002.
3. ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Comparison of the chiral resolution of econazole, miconazole, and sulconazole by HPLC using normal-phase amylose CSPs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.370, n.7, p.951-955, 2001.
4. ANVISA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&worc=>. Acesso em: 15 Dez. 2006.
5. ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Enantioseparation of some clinically used drugs by HPLC using cellulose Tris (3,5-dichlorophenylcarbamate) chiral stationary phase. **Biomedical Chromatography: BMC**, v.17 n.2/3, p.113-117, 2003.
6. ALTRIA, K.D.; RUDD, D.R. An overview of method validation and system suitability aspects in capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v.41, p.325-331, 1995.
7. ALTRIA, K.D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications**. Totowa: Humana Press, 1996. 349p. (Methods in Molecular Biology Series, 52).
8. ARRANZ, A.; ECHEVARRIA, C.; MOREDA, J.M.; CID, A.; ARRANZ, J.F. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs. **Journal of Chromatography, A**, v.871, n.1/2, p.399-402, 2000.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

-
9. AURORA-PRADO, M. **Determinação de fármacos em formulações farmacêuticas empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência.** São Paulo, 1995. 329p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
 10. AURORA-PRADO, M.S.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Métodos estatísticos empregados para comparação de métodos analíticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.82, p.6, 2001.
 11. BAKER, D.R. **Capillary electrophoresis.** New York: John Wiley, 1995. 244p. (Technique in analytical chemistry series).
 12. BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods: critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p.1011-1040, 2002.
 13. BERTRAM-KATZUNG, G., ed. **Farmacologia básica & clínica.** 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.709-909.
 14. BONAZZI, D.; CAVRINI, V.; GATTI, R.; BOSELLI, E.; CABONI, M. Determination of imidazole antimycotics in cream by supercritical fluid extraction and derivative UV spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, n.1/2, p.235-240, 1998.
 15. BRYSKIER, A. Antifungal targets and research into antifungal agents. In: _____, ed. **Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals.** Washington: American Society for Microbiology, 2005. cap.52, p.1288.
 16. BRITISH Pharmacopoeia 1999. London: Stationery Office, 1999. p.560-561, 1806-1807.
 17. CASTRO-PUYANA, M.; CREGO, A.L.; MARINA, M.L.; GARCIA-RUIZ, C. Enantioselective separation of azole compounds by EKC. Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration. **Electrophoresis**, v.28, n.15, p.2667-2674, 2007.
 18. CAVRINI, V.; DI PIETRA, A.M.; GATTI, R. Analysis of miconazole and econazole in pharmaceutical formulations by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.7, n.12, p.1535-1543, 1989.
 19. CHANG, S.C.; GIGANTINO, J.J.; RADZIK, D.M.; RYCHTMAN, A.C. The use of capillary electrophoresis in pharmaceutical development. In: LUNTE, S.M.; RADZIK,

- D.M., eds. **Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis**. Oxford: Pergamon, 1996. v.2, p.425-466. (Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.2).
20. CHIAP, P.; HUBERT, PH.; CROMMEN, J. Strategy for the development of automated methods involving dialysis and trace enrichment as on-line sample preparation for the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.948, n.1/2, p.151-161, 2002.
21. CHRISTINAT, R.; ZULLIGER, H.W. Stability indicating HPLC method for the determination of econazole nitrate in cream and lotion formulations. **Arzneimittel-Forschung**, v.34, n.5, p.551-553, 1984.
22. CLARKE, E.C.G.; MOFFAT, A.C.; JACKSON, J.V.; MOSS, M.S.; WIDDOP, B.; GREENFIELD, E.S., eds. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.579, 762, 938.
23. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6.ed. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1995. 279p.
24. DE MUTH, J.E. **Basic statistics and pharmaceutical statistical applications**. 2.ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2006. 714p. (Biostatistics, 16).
25. DI PIETRA, A.M.; ANDRISANO, V.; GOTTI, R.; CAVRINI, V. On-line post-column photochemical derivatization in liquid chromatographic-diode-array detection analysis of binary drug mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, n.8/10, p.1191-1199, 1996.
26. DONG, Y.; REN, X.; HUANG, A.; SUN, Y.; SUN, Z. Chiral separation of bencynonate and econazole by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. **Journal of High Resolution Chromatography: HRC**, v.21 n.7, p.421-423, 1998.
27. EARNEST, C.M. Thermal analysis of clays, minerals and coal. **Analytical Chemistry**, v.56, p.1471A, 1984.
28. 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, n.8, p.1367-1385, 1998.
29. EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strarsbourg: Council of Europe, 2004. p.1493-1494. (European treaty series, n.50).

-
-
30. FROMTLING, R.A. Imidazoles as medically important antifungal agentes: an overview. **Drugs of Today**, v.20, n.7, p.325-349, 1974.
 31. GAGLIARDI, L.; DE ORSI, D.; CHIMENTI, P.; PORRA, R.; TONELLI, D. HPLC determination of imidazole antimycotis in antidandruff cosmetic products. **Analytical Sciences**, v.19, n.8, p.1195-1197, 2003.
 32. GARFIELD, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. 2.ed. Arlington: AOAC International, 1991. p.74-76.
 33. GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica: Parte II. **Cerâmica**, v.34, p.163-164, 1988.
 34. GODEFROI, E.F.; HERES, J.; VAN CUTSEM, J.; JANSSEN, P.A.J. The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenethylimidazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.12, p.784, 1969.
 35. GOLD, W.; STOUT, H.A.; PAGANO, J.F.; DONOVICK, R. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vivo* studies. **Antibiotics Annual**, v.1955-1956, p.579-586, 1956.
 36. GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas de terapêutica**, 20 edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2000. p.1647.
 37. GRAYBILL, J.R.; CRAVEN, D.C. Antifungals agents used in systemic mycoses, activity and therapeutic use. **Drugs**, v.25, n.1, p.41-62, 1983.
 38. GRILLOT, R.; LEBEAU, B. Systemic antifungal agents. In: BRYSKIER, A., ed. **Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals**. Washington: American Society for Microbiology, 2005. cap.52, p.1260-1274.
 39. GUO, L.-X.; JIN X.; ZHAO H.Q.; MENG N. Determination of econazole nitrate in plasma by RP-HPLC after different administration. **Zhongguo Yao Xue Hui**, v.42, n.13, p.1014-1016, 2007.
 40. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION – ICH. **Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1)**. International Conference on Harmonization, 1996. Disponível em <http://www.ich.org/LOB/MEDIA417.pdf> Acesso em: 07 jul. 2007.
 41. JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica**. 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.264-284.

-
42. JUNGINGER, H.; AKKERMANN, A.A.M.D.; HEERING, W. The ratio of interlamellary fixed water in O/W creams. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.35, p.45-57, 1984.
 43. KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.41, n.1, p.7-13, 1991.
 44. KHANKARI, R.K.; LAW, D.; GRANT, D.J.W. Determination of water-content in pharmaceutical hydrates by differential scanning calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, v.82, p.117-127, 1992.
 45. KHASHABA, P.N.Y.; EL-SHABOURI, S.R.; EMARA, K.M.; MOHAMED, A.M. Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.22, n.2, p.363-376, 2000.
 46. KITAMURA, K.; MAJIMA, R. Determination of salicylic in aspirin powder by second derivative ultraviolet spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.55, n.1, p.54-56, 1983.
 47. KORANY, M.A.; BEDAIR, M.; HODA MAHGOUB, H.; EL-SAYED, M.A. Second derivative spectrophotometric determination of acetaminophen and phenacetin in presence of their degradation products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.69, n.4, p.608-611, 1986.
 48. KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2.ed. New York: Wiley-Interscience, 1988. p.680-699.
 49. KUBLIN, E.; KANIEWSKA, T. Determination of antimycotic substances, derivatives of imidazole, by gas chromatographic method. **Chemia Analityczna**, v.41, n.1, p.19-25, 1996.
 50. KUBLIN, E.; KANIEWSKA, T. Identification and determination of antimycotic substances, derivatives of imidazole, by HPLC. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v.53, n.3, p.208, 1998.
 51. LACAZ, C.S. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.
 52. LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1996. p.15-18.

-
-
53. LIN, X.; ZHU, C.; HAO, C. Enantioseparation in capillary electrophoresis using 2-O-(2-hydroxybutyl)- β -CD as a chiral selector. **Electrophoresis**, v.26, n.20, p.3890-3896, 2005.
54. LIU, J.Y.; DONG, Y.Y.; WANG, T.S.; LIU, H.W.; HUANG, A.J.; SUN, Y.L.; SUN, Z.P. Separation of chiral drugs with sulfobutylether- β -cyclodextrin by capillary zone electrophoresis. **Chinese Chemical Letters**, v.10, n.1, p.39-42, 1999.
55. MACKENZIE, R.C. Nomenclature in thermal analysis. **Thermochimica Acta**, v.28, p.1-6, 1979.
56. MASSACCESI, M. Two-phase titration of some imidazole derivatives in pharmaceutical preparations. **Analyst**, v.111, p.987-989, 1986.
57. MAZZEO, P.; QUAGLIA, M.G.; SEGNALINI, F. Determination of salicylic acid in acetylsalicylic acid by second derivative U.V. spectrophotometry. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.34, p.470-472, 1982.
58. MEDENDORP, J.P.; PAUDEL, K.S.; LODDER, R.A.; STINCHCOMB, A.L. Near infrared spectrometry for the quantification of human dermal absorption of econazole nitrate and estradiol. **Pharmaceutical Research**, v.24, n.1, p.186-193, 2007.
59. MEDENDORP, J.; YEDLURI, J.; HAMMELL, D.C.; JI, T.; LODDER, R.A.; STINCHCOMB, A.L. Near-infrared spectrometry for the quantification of dermal absorption of econazole nitrate and 4-cyanophenol. **Pharmaceutical Research**, v.23, n.4, p.835-843, 2006.
60. MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 30.ed. Whitehouse Station: MERCK, 2001. p.619.
61. MILLS III, T.; ROBERSON, J.C.; FISHER, B.A.J., eds. **Instrumental data for drug analysis**. 2.ed. New York: Elsevier, 1987. p.810-811. (Elsevier Series in Forensic and Police Science).
62. MINAMI, P.S. **Micologia**: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses. São Paulo: Manole, 2003. p.4-5.
63. MIYASAKI. **Tolnaftato**. U.S. Pat. 3.334.126, 1 ago. 1967. 6p. *apud* Merck Index, 1989. p.1499.
64. MORIN, N.; CORNET, S.; GUINCHARD, C.; ROULAND, J.-C.; GUILLAUME, Y.C. HPLC retention and inclusion of imidazole derivatives using hydroxypropyl- β -

- cyclodextrin as a mobile phase additive. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.23, n.5, p.727-739, 2000.
65. MORIN, N.; GUILLAUME, Y.C.; ROULAND, J.C. A simple model for RPLC retention and selectivity of imidazole enantiomers using β -cyclodextrin as chiral selector. **Chromatographia**, v.48, n.5/6, p.388-394, 1998.
66. MOTHE, C.G. **Síntese, caracterização e estudo termoanalítico de resinas fenólicas obtidas a partir do líquido da casca de castanha de caju**. São Paulo, 1992. 174p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
67. NOBLE, D. DSC balance out. **Analytical Chemistry**, v.67, p.323A-327A, 1995.
68. PEYRIN, E.; GUILLAUME, Y.C. Peculiarities of the mechanism of retention of imidazole derivatives when using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as mobile phase additive. **Chromatographia**, v.49, n.11/12, p.691-698, 1999.
69. POPOVIC, G.; CAKAR, M.; VUCICEVIC, K.; VLADIMIROV, S.; AGBABA, D. Comparison of HPTLC and HPLC for determination of econazole nitrate in topical dosage forms. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v.17, n.2, p.109-112, 2004.
70. QUATTROCCHI, O.A.; ABELAIRA DE ANDRIZZI, S.I.; LABA R.F. Validación de métodos. In: _____. **Introducción a la HPLC: aplicación y práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, 1992. cap.12, p.301-328.
71. REMINGTON: the science and practice of pharmacy. 20.ed. Baltimore: Lippincott William & Wilkins, 2000. p.1554.
72. RIBANI, M.; GRESPAN, B.C.B.; COLLINS, C.H.; FONTES JARDIM, I.S.C.; COSTA, M.L.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
73. SANTORO, M.I.R.M.; AURORA-PRADO, M.S.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Electroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.36, n.1, p.579-611, 1994.
74. SILVA, P. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. p.1081-1086.
75. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

-
76. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: John Wiley, 1997. p.21-57.
77. SUNSHINE, J. **Handbook of spectrophotometric data of drugs**. Boca Raton: CRC, 1981. p.5. (CRC series in analytical toxicology).
78. SYMOENS, J.; CAUWENBERGH, G. Ketoconazole a new step in the management of fungal disease. **Progress in Drug Research**, v.27, p.63-84, 1983.
79. TORIBIO, L.; DEL NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; ALONSO, C.; JIMENEZ, J.J. Enantiomeric separation of several antimycotic azole drugs using supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1144, n.2, p.255-261, 2007.
80. UNITED STATES Pharmacopeia: USP 30. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. p.2011. 12601
81. VAN EECKHAUT, A.; BOONKERD, S.; DETAEVERNIER, M.R.; MICHOTTE, Y. Development and evaluation of a linear regression method for the prediction of maximal chiral separation of basic drug racemates by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.903, n.1/2, p.245-254, 2000.
82. WARNOCK, D.W.; SPELLER, D.C.E. Antifungals today. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.10, p.164-167, 1982.
83. WOOLOEY, D.W. Some biological effects produced by benzimidazoles and their reversal by purines. **Journal of Biological Chemistry**, v.152, p.225-232, 1944.
84. YANG, X.-L.; XI, Z.-F.; SHENG, J.-F. Determination of compound econazole nitrate cream by reverse phase ion-pair gradient elution HPLC. **Chinese Journal of Antibiotics**, v.29, n.7, p.403-405, 2004.
85. ZAHOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. The potential ofazole antifungals against latent/persistent tuberculosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, p.200-203, 2006.
86. ZAHOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Azole antifungals as novel chemotherapeutic agents against murine tuberculosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.261, p.181-186, 2006.