UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**ESTABILIDADE FÍSICA E METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO
CETOCONAZOL**

ANDRÉIA CRICCO PERARO

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Erika Rosa Maria Kedor - Hackmann

SÃO PAULO
2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Peraro, Andréia Cricco
P427e   Estabilidade física e metodologia analítica para formulações
farmacêuticas contendo cetoconazol / Andréia Cricco
Peraro. -- São Paulo, 2001.
116p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento
de Farmácia.

Orientador: Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Formulações
farmacêuticas 3. Estabilidade : Medicamento : Análise farmacêutica
I. T. II. Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria, orientador.

615.19015 CDD

ANDRÉIA CRICCO PERARO

ESTABILIDADE FÍSICA E METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO
CETOCONAZOL

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Profa Titular Erika Rosa Maria Kedor Hackmann

Orientadora/ Presidente

Profa Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

1º Examinador

Profa Dra Magali Benjamin de Araújo

2º Examinador

São Paulo, 27 de junho de 2001

**“O Senhor é o meu rochedo,
e o meu lugar forte , a minha
fortaleza , em quem confio “
Salmo 18**

**“ Não basta saber, é preciso aplicar.
Não basta querer, é preciso fazer ”
Goethe**

Aos meus avós maternos Paulo Cricco e
Maria Riberti Cricco e paternos Alcino Peraro e
Alcinda Rogatto Peraro pela existência de meu
melhor presente: meus pais .

À profa Dra Magali Benjamin de Araújo , pela amizade
e pelo primeiro grande incentivo para a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

À Profa Titular Erika Rosa Maria Kedor Hackmann, pela orientação, amizade e colaboração.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos meus pais Ademar Peraro e Durvalina Cricco Peraro, pelo amor, incentivo e força.

Ao meu irmão Luciano Cricco Peraro, pela amizade, auxílio e incentivo.

Ao Adilson Cornélio dos Reis, pelo apoio, incentivo, força e determinação.

À profa Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pela amizade, incentivo e sugestões.

À profa Dra Maria Amélia Barata da Silveira pelo apoio e atenção.

Às amigas Fátima Cristina Franco e Silva, Fernanda Pereira Ribeiro, Maria Rita Rodrigues, Roberta Ribeiro Gonzalez, pelo apoio, companheirismo e paciência.

Aos amigos e colegas de graduação Adalberto Tsutsumi, Diogo Teixeira Carvalho, Flávia Garcia, Irany Mesquita Coelho Moraes, Magda Damares de Oliveira, Monica Silva Coelho Caracillo, Paula Marie Gardino Timmer, Oswaldo Miguel Júnior e Roberto Parise Filho, pelo apoio e companheirismo.

Ao amigo e colega Dr Martin Steppe, pelas sugestões, apoio, companheirismo e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Físico- Químico Adriana Osório, Aldo Adolar Maul, Andréia Montoro Taborianski, Anil Kumar Singh, Beatriz Resende Freitas, Daniella Almança G. C. Oliveira, Elizângela Abreu Dutra, Ixis Ivette Taymes Hidalgo, Maria Gabriela de Araújo, Maria Segunda Aurora Prado e Nájla Mohamed Kassab, pelo auxílio, compreensão, amizade e colaboração.

À Dra Inês de Almeida Gonçalves pelos espectros no infravermelho.

À funcionária Iria Raimunda da Silva pelo carinho, compreensão e colaboração.

Ao prof.Titular João Fernandes Magalhães pelo apoio e incentivo.

Às profas Dra Eliane Orsine e Dra Elizabeth Ap. Gianoto pelas correções e sugestões.

Ao prof Dr Jorge Seferin Martins pelo apoio.

Às funcionárias Luzanira Maciel e Regina Maura Rojas, pela colaboração.

Às colegas Bianca Fedriz de Carvalho e Celina Y. Motizuki pelo auxílio na execução deste trabalho.

Ao colega do Laboratório de Farmacotécnica Marcelo Guimarães, pelo auxílio no estudo das formulações.

À profa Dra Maria Valéria Velasco, pela colaboração e correções.

Às funcionárias do Laboratório de Farmacotécnica Claudinéia e Carla, pelo fornecimento de matérias-primas.

À Elizabete C. S. Paiva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, pela atenção e colaboração.

Às funcionárias da Biblioteca do Conjunto das Químicas Adriana de Almeida Barreiros e Leila Aparecida Bonadio, pela revisão das referências bibliográficas.
Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Benedita E. S. Oliveira, Elaine M. Ychico e Jorge de Lima, pela atenção e colaboração.

Aos Laboratórios ISP, Chemy Union, EMS, pelo fornecimento de matérias-primas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo ,FAPESP, pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Senhor(a) assessor(a) da FAPESP pelas sugestões e correções realizadas durante a execução deste trabalho.

A todos que direta e indiretamente colaboraram pela realização deste trabalho.

RESUMO

O cetoconazol é um derivado imidazólico com atividade antifúngica, empregado no tratamento de grande variedade de infecções cutâneas.

O objetivo deste trabalho foi a padronização e a validação dos métodos analíticos empregando-se a espectrofotometria no ultravioleta (UV) por derivada de primeira ordem e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas sob a forma de creme obtidas no comércio e formuladas em laboratório. O estudo da estabilidade física das formulações obtidas em laboratório foi realizado após o armazenamento sob diferentes condições de tempo, temperatura e umidade.

O método espectrofotométrico no UV por derivada de primeira ordem foi padronizado a 257nm , no intervalo de concentração de 5,0 a 30,0 µg/mL em metanol. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9997, o percentual de recuperação foi de 100,24%. A média do desvio padrão relativo foi de 0,56% para a amostra simulada e 0,41% para a amostra comercial.

A determinação de cetoconazol por CLAE foi realizada empregando-se uma coluna LiChrospher® 100 RP- 18 (5µm) e fase móvel constituída por uma mistura de trietilamina em metanol(1:500) e solução de acetato de amônio em água (1:200) na proporção de 75 : 25 v/v, com vazão de 1,0 mL/min e detecção no UV a 225 nm. O terconazol foi utilizado como padrão interno. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9981, o percentual de recuperação foi de 100,88%, a média do desvio padrão foi de 2,13% para a amostra simulada e 1,25% para a amostra comercial.

A amostra simulada apresentou comportamento pseudoplástico e tixotropia em decorrência das medidas reológicas obtidas experimentalmente.

ABSTRACT

Ketoconazole is an imidazole antifungal agent used in the treatment of great variety of skin infectious diseases.

The aim of this research was the standardization and the validation of two analytical methods, first – derivative ultraviolet (UV) spectrophotometry and high performance liquid chromatography(HPLC) to determine ketoconazole in commercial and simulated cream dosage forms preparations. The validated methods were used to study the stability of the simulated cream after storage under high temperatures and high percentage of humidity.

First – derivative UV spectrophotometry was standardized at 257 nm, in a range of concentration from 5.0 to 30.0 µg/mL in methanol. The coefficient of correlation was 0.9997 and the recovery average was 100.24%. The average relative standard deviation (RSD) was 0.56% for simulated preparation and 0.41 % for commercial preparation.

The determination of ketoconazole by HPLC was performed using a LiChrospher® 100 RP-18(5µm) column, a mobile phase consisting of triethylamine in methanol (1:500) and ammonium acetate solution in water(1:200) 75:25 (v/v), a flow rate of 1.0 mL/min and UV detection at 225nm. Terconazole was used as internal standard. The coefficient of correlation was 0.9981, the recovery average was 100.88%, the average relative standard deviation (RSD) was 2.13% for the simulated preparations and 1.25% for the commercial preparations.

The rheological measurements showed that the simulated preparation presented pseudoplastic and thixotropic behavior.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 GENERALIDADES	4
2.2 ANTIFÚNGICOS	5
2.2.1 Antifúngicos derivados dos imidazóis	6
2.3 CETOCONAZOL	8
2.3.1 Aspectos gerais	8
2.3.2 Síntese	11
2.3.3 Estereoisomeria do cetoconazol	14
2.3.4 Métodos de análise de formulações contendo cetoconazol	15
2.4 EMULSÕES	17
2.4.1 Definição	17
2.4.1.1 Componentes da emulsão	18
2.4.2 Estudo de estabilidade de emulsões	18
2.4.2.1 Reologia	21
2.4.2.2 Tamanho das partículas	22
2.4.2.3 Métodos químicos utilizados no estudo da estabilidade	23
3 OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Material	27
4.1.1 Solventes e Soluções	27
4.1.2 Fármacos empregados como substâncias de referência	27
4.1.3 Matérias-primas	28
4.1.4 Equipamentos e acessórios	28
4.1.5 Formulações estudadas	29
4.1.5.2 Obtenção do creme com cetoconazol a 2%	35
4.1.6 Amostras	36
4.2 Métodos	37
4.2.1 Identificação do cetoconazol matéria-prima	37
4.2.1.1 Ponto de fusão	37
4.2.1.2 Cromatografia em camada delgada	37
4.2.1.3 Espectroscopia no infra - vermelho	37
4.2.1.4 Estudos Termoanalíticos	38
4.2.2 Ensaios espectrofotométricos preliminares	38
4.2.6 Ensaios cromatográficos preliminares	39
4.3 Validação da metodologia analítica	40
4.3.1 Padronização do método espectrofotométrico	40
4.3.1.1 Construção da curva de calibração	41

4.3.1.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	41
4.3.1.3 Aplicação do método padronizado às amostras creme	42
4.3.2 Padronização do método cromatográfico	44
4.3.2.1 Construção da curva de calibração	45
4.3.2.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	45
4.3.2.3 Determinação do limite de detecção e limite de quantificação	47
4.3.2.4 Aplicação do método padronizado às amostras creme	47
4.4 Estabilidade física do cetoconazol em creme	49
4.4.1 Características organolépticas	50
4.4.2 Análise de pH	50
4.4.3 Comportamento reológico	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Identificação do cetoconazol matéria-prima	52
5.1.1 Ponto de fusão	52
5.1.2 Cromatografia em camada delgada	53
5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho	54
5.1.4 Estudos Termoanalíticos	55
5.1.5 Ensaios preliminares com as diferentes formulações do creme com cetoconazol a 2%	56
5.6 Validação da metodologia analítica	59
5.6.1 Padronização do método espectrofotométrico por derivada de 1ª ordem	59
5.6.1.1 Construção da curva de calibração	59
5.6.1.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	61
5.6.1.3 Aplicação do método padronizado às amostras creme	62
5.6.2 Padronização do método cromatográfico	66
5.6.2.1 Construção da curva de calibração	67
5.6.2.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	69
5.6.2.3 Determinação dos Limites de Detecção e Quantificação	70
5.6.2.4 Aplicação do método padronizado às amostras creme	70
5.7 Estabilidade física do cetoconazol em creme	73
5.7.1 Características organolépticas	73
5.7.2 Análise de pH	74
5.7.3 Comportamento reológico	75
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES	101
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO

O cetoconazol é um derivado imidazólico com atividade antifúngica. Foi lançado no Brasil sob a forma de comprimidos, contendo 200 mg de cetoconazol, creme tópico e xampu na concentração de 20 mg/g. O cetoconazol na forma de comprimidos vem sendo substituído por outros antifúngicos administrados por via oral por apresentar alguns efeitos colaterais indesejáveis, como a hepatotoxicidade^{82; 96}. O cetoconazol creme a 2% continua sendo muito utilizado no combate de diversas infecções cutâneas. É ainda eficaz no combate à dermatite seborréica e várias infecções causadas por diferentes espécies de fungos. Recentemente tem sido usado contra acantomebíase disseminada^{88; 91}. O cetoconazol xampu a 2% é muito utilizado no combate à caspa⁴⁴.

No início do século os medicamentos tinham como origem fontes magistrais e officinais e não havia problema com a estabilidade, pois além do número reduzido de matérias-primas, as fórmulas farmacêuticas eram preparadas e imediatamente fornecidas ao paciente o que implicava em pouco ou nenhum tempo de armazenamento. Após a 2ª Guerra Mundial muitos fármacos de origem natural foram isolados, suas fórmulas químicas elucidadas e obtidos por síntese química. Novos fármacos foram sendo sintetizados em número cada vez maior resultando em novas formulações farmacêuticas. O processo da industrialização veio favorecer o arsenal terapêutico, mas trouxe problemas como: mudança na escala de trabalho acarretando tempo de exposição à fatores ambientais, risco de interação física, química e microbiológica. Houve mudanças na comercialização trazendo problemas com o transporte e armazenamento dos produtos farmacêuticos.

A estabilidade de um produto farmacêutico é fator relevante e crítico, principalmente em países de clima variado. Nesse sentido, é marcante a influência do excipiente, principalmente nos medicamentos de uso tópico ³⁴.

A estabilidade é definida como sendo o período de tempo em que um produto mantém sua vida útil, preservando as mesmas propriedades e características que possuía na ocasião de sua fabricação. Dentre os tipos de estabilidade temos a estabilidade:- química, onde cada ingrediente ativo mantém sua integridade e potência declarada, entre os limites especificados;- física, em que as propriedades físicas originais incluindo aparência, uniformidade e suspendibilidade são conservadas; - microbiológica, na qual a esterilidade ou resistência ao crescimento microbológico é mantida de acordo com os requisitos especificados; - terapêutica, em que deve permanecer inalterada a atividade farmacológica do produto e - toxicológica, onde não pode ocorrer aumento significativo da toxicidade⁹⁷.

A degradação de princípios terapêuticos durante o armazenamento e o transporte é o maior problema, principalmente em países de clima tropical. O prazo de validade, que em países de clima temperado funciona como uma maneira adequada de prever degradações, pode não ser o mesmo nos países tropicais, mesmo que o medicamento seja armazenado em materiais de acondicionamento apropriados ⁷⁸.

Diante disto, temos que a introdução constante de novos fármacos na terapêutica, com estruturas químicas das mais variadas, impõe o estudo da estabilidade dos medicamentos visando a garantia de prazos de validade compatíveis com o tempo necessário para a comercialização e com as exigências da legislação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

As micoses são classificadas em superficiais e profundas ou sistêmicas. As micoses superficiais são predominantes e apresentam distribuição universal. São manifestações tegumentares causadas por diferentes espécies e gêneros de fungos que possuem em comum o tropismo para invasão do tegumento cutâneo. Caracterizam-se por produzir lesões na pele, mucosa, pêlos, unhas, dobras periungueais, conduto auditivo externo zonas cutâneo-mucosas, entretanto não invadem os tecidos mais profundos ^{24, 26}. As micoses profundas ou sistêmicas são causadas por organismos que vivem livremente na natureza ou em materiais orgânicos em decomposição. Estas infecções estão freqüentemente limitadas a certas áreas geográficas. Podem ser assintomáticas, desenvolver sintomatologias brandas e em alguns casos podem evoluir para doenças graves ou fatais ⁵⁵.

As micoses superficiais podem ser reunidas em três grandes grupos: dermatofitoses, ceratofitoses e candidíase⁰⁴.

A disseminação de micoses superficiais tem aumentado significativamente por fatores como: convivência em certos ambientes coletivos, reações climáticas(calor, umidade), vestuários(tecidos sintéticos, sapatos apertados) que acumulam o calor e a umidade corporal. Contribuem também para a disseminação destas micoses o emprego, em larga escala, de contraceptivos orais, antibióticos de amplo espectro de ação e, até mesmo, o excesso de higiene com o favorecimento de proliferação de fungos oportunistas ²⁶.

As micoses profundas ou sistêmicas são raras, porém seu índice tem aumentado nos últimos anos devido a infecções por fungos oportunistas⁹².

Os fungos são abundantes na natureza, podendo também estar presentes no organismo humano. Espécies de *Candida* podem estar presentes na mucosa digestiva, no trato respiratório e genital. Outros, como *Cryptococcus* e *Aspergillus* podem ser aspirados pelo homem e não causar doença, devido ao sistema imune celular que o protege^{45, 54}. Entretanto, estados subnutricionais, organismos debilitados (aidéticos, cancerosos, diabéticos), modificações fisiológicas (gravidez), longo tempo de hospitalização e, principalmente, avanços médicos na terapêutica imunossupressora, como a quimioterapia do câncer, ou o tratamento de transplantados renais, contribuem para aumentar o número de pacientes vulneráveis. Estes estados propiciam o desenvolvimento de infecções por fungos oportunistas e são causas freqüentes de morbidade e de morte^{45, 55}.

De uma maneira geral, o homem é acometido pelas micoses, independente de sexo, cor e idade. Somente as micoses superficiais são transmitidas de homem para homem⁴⁵.

2.2 ANTIFÚNGICOS

Por muitas décadas, o desenvolvimento de substâncias antimicóticas foi ofuscado pelo grande impulso dado à bacteriologia⁹⁵.

Antes de 1950, não existia tratamento confiável ou seguro para micoses profundas e a terapêutica das micoses superficiais dependia de preparações tópicas empíricas⁵¹.

O tratamento de infecções por fungos iniciou-se com a descoberta dos antibióticos poliênicos representados pela nistatina e anfotericina B⁵¹. A nistatina foi isolada por HAZEN e BROWN³⁶ do *Streptomyces noursei* em 1949, estando disponível comercialmente desde 1951⁵¹. A anfotericina B foi isolada do fungo *Streptomyces nodosus*, em 1956, por GOLD e colaboradores²⁶.

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.^{27;28;51}

OXFORD e colaboradores⁷⁰ isolaram, em 1938 a griseofulvina. Entretanto sua ação antifúngica só se tornou conhecida em 1958^{27;51}.

Em 1944, WOOLLEY¹⁰³ 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 época.

Uma nova geração de substâncias antifúngicas iniciou-se com produtos sintéticos tais como, a flucitosina, sintetizada por DUSCHINSKY e colaboradores³⁹ em 1957, disponível no comércio desde 1963, e o tolnaftato que foi preparado por MIYASAKI e colaboradores⁶³ em 1963, cuja ação antifúngica foi estudada em 1968⁵¹

JERCHEL e colaboradores revisando as observações de WOOLLEY¹⁰³ verificaram, 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 décadas²³.

2.2.1 Antifúngicos derivados dos imidazóis

Em 1969, houve um grande avanço no tratamento de micoses, com a introdução dos derivados imidazólicos: o clotrimazol, o miconazol, o econazol e em seguida o isoconazol¹⁰¹.

Estes compostos foram as primeiras substâncias com atividade terapêutica contra um grande número de leveduras, dermatófitos, fungos dimórficos e algumas bactérias gram-positivas⁹⁵.

O cetoconazol foi sintetizado em 1978 e introduzido na terapêutica em 1981 por HEERES e colaboradores³⁸. Seu desenvolvimento significou um avanço na quimioterapia antifúngica²⁷.

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, alilamina sintetizada em 1978, é utilizada na terapêutica de infecções dermatofíticas.

Recentemente surgiu um novo antifúngico tópico da classe dos imidazóis, o nitrato de sertaconazol, particularmente ativo contra espécies de *Candida*¹⁵. Outro derivado imidazólico é o voriconazol, que mostrou melhores resultados contra *Candida sp* do que a anfotericina B, fluconazol e itraconazol^{09;22}.

Recentes pesquisas com outros novos derivados imidazólicos têm mostrado bons resultados: eberconazol apresenta maior eficácia contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*, comparando-se com clotrimazol e cetoconazol⁹⁶; o SCH 56592⁰⁵, mostrou melhor atividade antifúngica *in vitro* do que o fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Outro imidazólico o AFK-108, tem mostrado melhor atividade antifúngica *in vitro*, em relação a outros imidazólicos⁴⁰.

2.3 CETOCONAZOL

2.3.1 Aspectos gerais

O cetoconazol é um derivado imidazólico com atividade antifúngica.

Quimicamente é denominado cis-1-acetil-4-{4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxolanil-4-metoxi]fenil}piperazina. Sua fórmula molecular é $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ e seu peso molecular é 531,44⁵¹:

Figura 1- Estrutura química do cetoconazol

Consta da Farmacopéia Americana 24^a edição e apresenta-se como pó branco, levemente amarelado, inodoro, facilmente solúvel em diclorometano, solúvel em ácidos e em metanol, parcialmente solúvel em etanol e praticamente insolúvel na água^{06, 11, 98}.

No Brasil, o cetoconazol, foi lançado no comércio sob a forma de comprimidos, contendo 200mg de cetoconazol, creme tópico contendo 20mg/g e xampu também na concentração de 20mg/g^{16, 50}.

As principais formulações farmacêuticas contendo cetoconazol comercializadas no Brasil estão relacionadas no quadro abaixo ^{17, 50}:

Quadro 1 - Principais formulações farmacêuticas contendo cetoconazol comercializadas no Brasil

Nome comercial	Forma farmacêutica	Laboratório
Candiderm ®	creme	Aché
Candoral ®	comprimidos	Aché
Cetoconazol ®	comprimidos	Bergamo
Cetoconazol ®	comprimidos, creme, xampu	Neo-Química
Cetonax ®	comprimidos, creme, xampu	Janssen-Cilag
Cetonil ®	comprimidos, creme, xampu	Stiefel
Cetozol ®	comprimidos, creme, xampu	Cazi
Ketocon ®	comprimidos	Cibran
Ketonan ®	comprimidos, creme, xampu	Marjan
Miconan ®	comprimidos, creme, xampu	Ativus
Nizoral ®	comprimidos creme, xampu	Janssen-Cilag
Noriderm ®	comprimidos, creme	EMS
Cetoconazol ®	comprimidos	Davidson
Cetoconazol ®	comprimidos	Ducto
Cetoconazol Bunker ®	comprimidos creme xampu	Bunker
Cetozan ®	comprimido creme xampu	Royton
Cetoconazol ®	creme (Medicamento Genérico Lei 9.787/99)	Teuto Brasileiro
Cetoconazol	comprimidos	Teuto Brasileiro
Cetoconazol ®	comprimidos, creme	Green Pharma
Cetoconazol ®	comprimidos, creme, xampu	Honorterápica
Fungal ®	comprimidos, creme, xampu	Farmion
Cetoconazol ®	comprimidos, xampu	Luper
Arcolan ®	creme	Galderma

As associações com cetoconazol mais comercializadas no Brasil são: Candicort® (cetoconazol, betametasona) e Novacort® (cetoconazol, betametasona, sulfato de neomicina) ambas produzidas por Aché Laboratórios S/A e Cetocort® (cetoconazol, betametasona) de Laboratório Teuto Brasileiro^{16, 17, 50}.

O cetoconazol foi o primeiro antifúngico ministrado por via oral. Apresenta amplo espectro de atividade que inclui *Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides* e diversos dermatófitos²⁹. O cetoconazol também tem sido testado em pacientes portadores de câncer de próstata⁸⁹.

O cetoconazol creme a 2% tem sido usado topicamente no tratamento de diversas infecções cutâneas.

O cetoconazol é um agente fungicida contra *Pityrosporum ovale*, um importante fator etiológico na dermatite seborréica. Diversos estudos clínicos têm demonstrado a eficácia do tratamento antifúngico com cetoconazol tópico em dermatite seborréica^{21, 93}. A eficácia do creme com cetoconazol é equivalente ao cetoconazol de uso sistêmico, sem a desvantagem da hepatotoxicidade, causada pelo uso sistêmico repetido³⁰.

Vários estudos provaram uma maior eficácia e segurança do cetoconazol creme a 2% contra dermatite seborréica do que a hidrocortisona creme a 1%, que também é usada para essa finalidade^{47, 68, 73}.

Tinea pedis, *Tinea cruris*, *Tinea corporis* são infecções fúngicas muito comuns. São causadas por uma variedade de organismos e mostram uma resposta muito variável ao tratamento. Estudos demonstraram que o cetoconazol creme a 2% tem sido eficaz e seguro no tratamento dessas infecções. O cetoconazol atua contra as espécies de fungo *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* causadores dessas infecções⁵⁶.

Para a *Tinea pedis*, conhecida como “pé de atleta”, nem sempre os dermatologistas indicam um tratamento tópico, mas estudos provaram que o cetoconazol creme a 2% é muito eficaz contra essa infecção³¹.

SAVIN e HORWITZ⁸² estudaram formulações contendo cetoconazol creme a 2% e creme placebo e ainda compararam com o cetoconazol usado

por via oral contra *Tinea versicolor*. Os resultados mostraram que o cetoconazol é realmente eficaz quando comparado com seu creme placebo, e em comparação com cetoconazol via oral também mostrou maior eficácia contra *Tinea versicolor*. Esses autores verificaram, nesse mesmo trabalho, através de autoradiografia que a penetração do cetoconazol se restringe ao estrato córneo e estrato granuloso, não havendo absorção percutânea.

O cetoconazol creme a 2% mostrou maior eficácia quando comparado com a mesma formulação contendo miconazol⁷².

Diversos estudos foram feitos para o tratamento eficaz de doenças de pele de várias origens e foram conseguidos bons resultados utilizando combinações com dipropionato de beclometasona(0,025%), cetoconazol(2%) e fusidato de sódio(2%)⁸⁵. Combinações de fusidato de sódio, butirato de clobetasona e cetoconazol, foram usadas no tratamento de superinfecção por fungos e por bactérias^{13;18;71}.

Outro uso recente do cetoconazol creme a 2% está sendo no combate a acantomebíase disseminada, doença causada por uma ameba da espécie *Acanthamoeba sp*, que causa infiltrações na pele podendo levar à morte, atacando principalmente pacientes imunocomprometidos^{88;91}.

2.3.2 Síntese

A síntese do cetoconazol é demonstrada no **Esquema 1**.

A 2,4 dicloroacetofenona é submetida a uma ciclização com glicerol na presença do benzeno-1-butanol e do ácido p-toluenossulfônico(**1**), levando à formação do produto (**2**); este pela ação do bromo, transforma-se em cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-bromometil-4-hidroximetil-1,3-dioxolano(**3**), o qual é benzoilado com cloreto de benzoila, resultando o cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-bromometil-4-benzoiloximetil-1,3-dioxolano(**4**). A condensação deste com 1-H-imidazol produz o cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1-H-imidazol-1-metil)-4-benzoloximetil-1,3-dioxolano(**5**), o qual, em meio básico, é debenzoilado, dando cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-metil)-4-hidroximetil-1,3-dioxolano(**6**). A reação do (**6**) com cloreto de metanossulfonila produz o cis-2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-metil)-1,3-

dioxolano-4-metilmetanossulfonato(7). Finalmente, este composto é condensado com 1-acetil-4-(4-hidrofenil)piperazina, por meio de hidreto de sódio em benzeno-dimetilssulfóxido, produzindo o cis-1-acetil-4-{4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazolil-1-metil)-1,3-dioxilanyl-4metoxi]fenil}piperazina(cis I) ³⁸.

Esquema 1- Síntese do cetoconazol(cis I)

2.3.3 Estereoisomeria do cetoconazol

O cetoconazol é um antifúngico com amplo espectro de ação. A base de sua atividade antifúngica é o bloqueio da conversão de lanosterol em ergosterol, necessário para manter a integridade da membrana dos organismos celulares. O ponto específico da intervenção química parece envolver a inibição da enzima do citocromo P-450.

O cetoconazol tem mostrado um efeito inibitório similar na enzima correspondente responsável pela conversão de lanosterol em colesterol em humanos⁸⁰. Em adição a isso, o cetoconazol tem mostrado inibição em inúmeras outras enzimas do citocromo P-450, envolvendo esteroidogêneses e metabolismo de fármacos. Um exemplo bem conhecido é a diminuição de níveis de androgênios em pacientes masculinos que usam cetoconazol por um longo período. O cetoconazol também tem mostrado bloqueio adrenal na esteroidogênese e tem apresentado interferência no metabolismo da testosterona^{08, 47}. Essas propriedades têm levado o cetoconazol a ser utilizado no tratamento contra o câncer de próstata e a síndrome de Cushing⁸⁰.

Essa variedade de ações do cetoconazol, estão relacionadas com seus isômeros, pois estes se diferenciam quanto às propriedades farmacológicas.

O cetoconazol é uma mistura racêmica de cis(2S,4R) e cis(2R,4S) enantiômeros. São numerosas as diferentes propriedades farmacológicas entre esses estereoisômeros.

Os quatro estereoisômeros do cetoconazol agem inibindo as enzimas do citocromo P450. Os isômeros cis(2S,4R) e (2R,4S) são mais potentes inibidores da 14 α -dimetilase do lanosterol de mamíferos do que os diastereoisômeros trans (2R,4R) e (2S,4S), por isso os isômeros cis possuem atividade antifúngica superior. O isômero cis(2S,4R) é três vezes mais potente que seu similar cis (2R,4S)⁸⁰

Diversos estudos buscam a síntese dos 4 estereoisômeros do cetoconazol, para a obtenção de compostos mais puros^{08, 80}.

2.3.4 Métodos de análise de formulações contendo cetoconazol

Para comprimidos contendo cetoconazol, ABOUNASSIF e EL-SHAZLY⁰¹, sugeriram o uso de duas técnicas rápidas e quantitativas. A primeira foi uma titulação potenciométrica em meio não-aquoso, onde o ponto de equivalência foi detectado graficamente por potenciometria diferencial. A segunda técnica foi a ressonância nuclear magnética, envolvendo a integração dos sinais de próton do grupo metila do cetoconazol, usando benzocaína como padrão interno.

DAS¹⁴ propôs para análise de cremes e pomadas contendo cetoconazol, uma rápida identificação e quantificação através da cromatografia em camada delgada e densitometria. O cetoconazol foi separado dos excipientes utilizando uma mistura de proporções iguais de clorofórmio e álcool isopropílico. Em seguida foi aplicado em placa de sílica gel F₂₅₄, utilizando como fase móvel n-hexano : clorofórmio : metanol : dietilamina(50:40:10:1) e quantificado por densitometria.

A espectrofluorimetria foi o método de análise para xampu utilizado por EL-BAYOUMI e colaboradores²⁰. Usou-se um gel-xampu com cetoconazol a 2%.

Para a análise de cremes e comprimidos contendo cetoconazol, foi proposto por EL-SHABOURI e colaboradores¹⁹, a espectrofotometria, baseada na formação de complexo de carga de transferência. Esse complexo foi formado pelo fármaco(cetoconazol) como doador de elétrons e o iodo como receptor. O método apresentou rapidez, simplicidade e sensibilidade.

SADEGHII e SHAMSIPUR⁸¹, sugeriram a extração do cetoconazol contido em creme e comprimido, utilizando uma mistura de 1:1 de um complexo formado por ácido pícrico em pH 2,5 e clorofórmio, e analisados por espectrofotometria em 410nm.

A Farmacopéia Americana 24^a edição⁹⁸, preconiza para comprimidos a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como fase móvel uma mistura de diisopropilamina em metanol 1:500/solução de acetato de amônio

em água 1:200 na proporção de 7:3, coluna C-18 de 30cm x 3,9 mm e detector UV a 225nm.

HACKMANN e colaboradores^{48, 67}, propuseram para a análise de cetoconazol em comprimido e creme, a espectrofotometria direta no ultravioleta, usando como solvente o ácido clorídrico 0,01mol/L e leitura em 222 e 269nm; no mesmo trabalho foi proposta a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase móvel uma mistura de diisopropilamina em metanol 1:500/ solução de acetato de amônio em água 1:200 na proporção a 8:2 e coluna LiChrospher® 100RP-18(5µm) Merck® medindo 12,5 cm x 4mm, detector a 225nm e terconazol como padrão interno.

LOW e WANGBOONSKUL⁵⁷ descreveram um método para análise de cetoconazol comprimido, creme e xampu, utilizando a CLAE. Os autores utilizaram uma coluna de octadecilsílica medindo 200 x 4,6 mm. A fase móvel foi constituída por acetonitrila 60% e ortofosfato dissódico hidrogenado a 20 mM e 0,2% de dietilamina v/v, em pH 4,0., vazão de 1,5 mL/min e detector UV a 232nm

ARRANZ e colaboradores⁰³ pesquisaram recentemente uma nova metodologia de análise para o cetoconazol, aplicando a eletroforese capilar, uma técnica moderna e que apresenta vantagens em comparação com outros métodos, como a alta eficiência em separações, curto tempo de análise, uso de pequenos volumes de amostras e reagentes, alta versatilidade e completa automação. Nesse trabalho os autores conseguiram através da eletroforese capilar, a separação de uma mistura contendo cetoconazol, econazol e clotrimazol. Essa técnica também foi utilizada para a análise de medicamentos que contém esses antifúngicos separadamente, obtendo-se bons resultados, podendo essa técnica ser utilizada no controle de qualidade de amostras que contenham esses antifúngicos.

2.4 EMULSÕES

2.4.1 Definição

Emulsões são preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis.⁷⁴

As emulsões são o tipo mais comum de sistemas de liberação usados em produtos cosméticos. Elas permitem que ampla gama de ingredientes sejam liberados de maneira rápida e conveniente nos cabelos e na pele. Os tipos de emulsões usados são normalmente materiais semi-sólidos formados por uma porção aquosa(hidrófila) e uma porção oleosa(lipofílica). Essas duas porções constituem as fases interna e externa da emulsão. A fase interna é composta pelos materiais que formam as minúsculas partículas dispersas(ou emulsificadas). Normalmente, a fase externa(também chamada de fase contínua) é a mais abundante das duas.⁸⁴

Emulsão O/A e A/O: a mais típica das emulsões é aquela na qual o óleo está disperso na água. Compreensivelmente, ela é chamada de emulsão óleo-em-água(O/A). Um outro tipo de emulsão simples é a emulsão água-em-óleo(A/O), na qual a água torna-se emulsificada. Se uma emulsão é do tipo O/A ou A/O depende de vários fatores, entre os quais a concentração de cada um dos materiais no sistema, o tipo de emulsificante e a técnica empregada no processamento de criação da emulsão.

Emulsões múltiplas: além da emulsão simples, de duas fases, podem ser desenvolvidos sistemas mais complexos. Essas emulsões podem ter várias fases internas e são conhecidas como “emulsões múltiplas”. São verdadeiras emulsões dentro de emulsões. Por exemplo, a água pode ser dispersa num óleo que, posteriormente, é disperso numa outra fase aquosa. Essa é a chamada emulsão água/óleo/água(A/O/A). Outras emulsões múltiplas podem apresentar mais três, quatro ou mais fases internas.

2.4.1.1 Componentes da emulsão

Fase oleosa: esta fase é formada por compostos não polares, tipicamente incompatíveis com a água. Entre tais compostos podemos citar gorduras, óleos e cêra e todos os seus derivados, inclusive alcoóis graxos, ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos, glicerídeos e silicones.

Fase aquosa: esta parte da emulsão é formada pela água e demais materiais hidrófilos do sistema. Podem ser materiais umectantes, como glicerina ou propilenoglicol, polímeros hidrossolúveis que dão espessamento ou dão condicionamento, conservantes, corantes, eletrólitos ou ingredientes característicos, como extratos vegetais ou proteínas hidrolisadas.

Emulsificantes: são os compostos que possibilitam a emulsificação, estabilizando a dispersão da fase interna na fase contínua. São tensoativos que reduzem a tensão superficial entre as fases. Os emulsificantes típicos são moléculas com uma porção hidrófila e uma porção lipofílica. São classificados como aniônicos, catiônicos, não-iônicos ou anfóteros, dependendo da natureza de seu principal grupo hidrossolúvel. Ao serem colocados na água, os emulsificantes têm a tendência de alinhar-se de modo a minimizar a interação entre suas extremidades hidrófilas e lipófilas. Havendo quantidade suficiente de emulsificante, podem formar-se estruturas esféricas chamadas micelas. Essas estruturas são agregados nos quais as caudas lipofílicas orientam-se para o centro da micela e as cabeças hidrofílicas formam a superfície externa.⁸⁴

As emulsões são usadas oralmente, parenteralmente e topicamente (cremes, por exemplo)⁰⁷.

2.4.2 Estudo de estabilidade de emulsões

Os sistemas emulsificados óleo em água ou água em óleo são considerados termodinamicamente instáveis⁷⁹. O uso do agente emulsificante é indispensável para a formação da emulsão, pois exibe a

habilidade de baixar a tensão superficial da água ou de reduzir a tensão interfacial entre duas substâncias imiscíveis ¹⁰² .

As preparações farmacêuticas e cosméticas são planejadas seguindo as orientações técnicas e básicas de boas normas de fabricação e devem permanecer estáveis por vários meses após a sua produção, mesmo quando sujeitas às mais variadas espécies de agressões do meio ambiente, como por exemplo: luz (radiações ultravioleta, visível e infravermelho), altas e baixas temperaturas, oxigênio do ar, estresse mecânico em função do transporte, reações químicas e contaminação microbiana ^{10, 42, 76, 77, 79} .

A emulsão deverá manter suas características originais de forma aceitável por um período finito, o qual normalmente é denominado prazo de validade ^{10, 42, 49, 76, 77, 79} .

O estudo da estabilidade tem por objetivo prever se o produto suportará as condições adversas do ambiente por determinado tempo, em condições normais de armazenamento. Para isso, procede-se ao teste de envelhecimento acelerado do produto. Este teste poderá fornecer antecipadamente uma indicação dos problemas, que poderão ocorrer nas formulações e dizer se o produto é ou não estável ^{10, 42, 49, 64, 69, 76, 77, 79} .

Dentre os fatores que afetam o tempo de vida e merecem atenção especial num planejamento do estudo de estabilidade envolvendo emulsões, destacam-se a temperatura, luz, umidade, efeitos mecânicos, tamanho das partículas, comportamento reológico e eficácia de conservantes ^{46, 77, 102} .

Os estudos sobre a desestabilização das emulsões mostraram que existem quatro mecanismos principais que são a cremagem ou cremação, a floculação, a coalescência e a inversão. Esses mecanismos, embora explicados separadamente, ocorrem simultaneamente na emulsão.

Cremagem: as gotículas em uma emulsão possuem diferentes densidades e estão, portanto, propensas a passar por um processo de desestabilização conhecido como cremagem. Trata-se de um processo segundo o qual as partículas menos densas tendem a ir para o topo. A emulsão fica com duas seções, uma delas tendo maior quantidade da fase

interna e outra com maior quantidade da fase externa. A formação da cremagem representa um problema pouco grave para a estabilidade porque nenhuma das partículas realmente se combina. Esse fenômeno pode ser revertido por agitação.

Floculação: durante este processo as gotículas da fase interna formam uma associação fraca e reversível. O fenômeno é tipicamente causado por uma carga inadequada sobre as micelas, o que reduz a força de repulsão entre elas. As duas partículas permanecem distintas e não há alteração nas dimensões. Isso pode ser demonstrado por meio de duas bolas de bilhar e fazendo-as tocar uma na outra. Enquanto elas se tocam, forma-se uma associação. No entanto, essa associação pode ser facilmente rompida pela remoção de uma das bolas. Da mesma forma a floculação em uma emulsão pode ser revertida por meio da agitação do sistema. Por esse motivo, a floculação é um problema de pouca gravidade para a estabilidade da emulsão.

Coalescência: quando duas gotículas da fase interna se aproximam o suficiente, elas se unem para formar uma gotícula maior. Esse processo representa um problema sério para a estabilidade, por ser irreversível. Quando um número grande de partículas coalesce, o resultado é uma separação completa das duas fases. Existe um fenômeno semelhante chamado “amadurecimento Ostwald” segundo o qual as partículas da fase interna tendem a combinar-se em dimensões iguais. Ele também pode levar à separação das fases.

Inversão: a separação é uma das conseqüências do processo de desestabilização da emulsão e a inversão de fase é outra conseqüência. Quando ocorre a inversão de fase, a fase externa torna-se fase interna e vice-versa. Uma alteração dessas é normalmente indesejável porque as características físicas da emulsão resultante serão diferentes da original. A inversão e a separação de fases promovem a inutilização de uma emulsão.

À medida em que as emulsões se tornam instáveis, sua composição físico-química pode variar. Podem-se usar diferentes métodos para determinar o grau de desestabilização. O método mais simples é o da observação direta, e verificações de viscosidade e de pH. Outros métodos mais sofisticados envolvem técnicas de dispersão de luz, medição de condutividade, avaliação microscópica e até ressonância magnética nuclear(RMN).^{64, 69, 84}

As características reológicas observadas no estudo da estabilidade física das emulsões são viscosidade da fase interna, viscosidade da fase externa, proporção fase-volume, emulsificantes usados e sua quantia, efeitos eletroviscosos, distribuição das partículas. Outros testes realizados são aparência e velocidade de sedimentação⁰⁷.

As razões que podem levar a dispersão e coalescência são a incompatibilidade química entre emulsificante e outro componente, a escolha imprópria do tensoativo, a alta concentração de eletrólitos, a baixa viscosidade e a temperatura⁰⁷.

2.4.2.1 Reologia

A reologia estuda as condições de fluidez e de deformação da matéria, que são influenciados por forças externas. O comportamento reológico do material pode ser medido como resultado dessas forças. Esse estudo envolve a determinação de características complexas das substâncias, como a viscosidade, a consistência, a plasticidade e a elasticidade. A viscosidade é definida como a resistência para o fluxo e é medida pela proporção da força de cisalhamento(força aplicada) e pelo gradiente de velocidade(movimento). Se o gradiente muda durante a aplicação, a mudança da força pode ser descrita por uma curva de fluxo em função do aumento ou diminuição do gradiente de velocidade. Dividindo-se a força de cisalhamento pelo gradiente de velocidade, para cada ponto, resultará a curva de viscosidade^{53;66;86}

A consistência é a propriedade apresentada pelos corpos de resistirem às deformações permanentes que uma dada carga tende a

provocar-lhe. No caso dos corpos fluídos(gases ou líquidos newtonianos) esta resistência à deformação depende da viscosidade do fluido, grandeza física e mensurável. Considerando o oposto destas condições tem-se os corpos sólidos, cuja resistência à deformação só pode ser avaliada empiricamente pela dureza. Tem-se também os líquidos não-newtonianos e os corpos semi-sólidos, como as emulsões. A consistência desse tipo de material deriva da soma e da interferência de fatores como as forças de adesão e de coesão, elasticidade, viscosidade, tixotropia e estrutura micelar.⁷⁶

Os líquidos não-newtonianos e os corpos semi-sólidos podem classificar-se quanto às suas propriedades reológicas em três grupos fundamentais, estabelecidos de acordo com o tipo de escoamento que apresentam quando submetidos a uma força externa: plásticos, pseudoplásticos e dilatantes⁷⁶.

As emulsões são consideradas líquidos não-newtonianos, pois não seguem a lei de Newton de fluidos viscosos, ou seja, não mostram proporcionalidade direta entre força de cisalhamento e gradiente de velocidade. Nesse caso, a viscosidade varia em função de gradiente de velocidade^{53, 62, 90}. Também são consideradas pseudoplásticas, pois mostram uma diminuição na viscosidade quando o gradiente de velocidade aumenta^{99, 100}.

A tixotropia é a capacidade de um sistema em apresentar baixa viscosidade quando sofre cisalhamento e a capacidade de recuperar sua estrutura após determinado período de tempo⁶⁶.

2.4.2.2 Tamanho das partículas

As partículas que compõem a fase interna da emulsão são polidispersas(isto é, apresentam dimensões variáveis), e suas dimensões médias é que são usadas na classificação da emulsão. Por exemplo, se seu diâmetro médio for menor do que 100Å ela passa a ser referida como emulsão micelar. Com o diâmetro de partículas cuja média esteja situada entre 100-2000Å a emulsão passa a ser chamada de microemulsão.

Partículas com diâmetro médio maior formam uma macroemulsão, que é o tipo mais comum utilizado na formação de produtos cosméticos⁸⁴.

Dentre os métodos para avaliar a estabilidade de emulsões, está o exame microscópico, que determina o tamanho, a forma e a distribuição das gotículas da fase dispersa das emulsões.

A distribuição irregular do tamanho e a agregação de partículas, são sinais de alerta quando se avalia o comportamento de um dado sistema em função de seu agente emulsificante^{99,102}. Conseqüentemente, deve-se optar pelas emulsões que forneçam gotículas menores, quando tratadas em condições semelhantes, visto que estas tornam-se mais estáveis quanto menores e mais uniformes forem o tamanho de suas partículas⁴⁹.

A distribuição do tamanho de partículas determina a estabilidade ou instabilidade da emulsão, em função do aumento do tamanho das partículas, desde que estejam dentro dos padrões especificados pela literatura de 0,5 – 10 μm ²⁵.

2.4.2.3 Métodos químicos utilizados no estudo da estabilidade

A instabilidade das emulsões também pode ser resultado da instabilidade química (principalmente hidrólise de tensoativos), destruição microbiana de um componente crítico da emulsão, ou por processos fotoquímicos.⁷⁹

Os ensaios químicos devem estabelecer se as substâncias contidas nas amostras, conservadas em condições adequadas, permanecem inalteradas ou se parcial ou totalmente alteradas. Para isso é necessário identificar a substância e verificar se não há formação de produtos que inicialmente não existiam; em seguida é necessário a determinação quantitativa das substâncias em ensaio e, se possível, seus produtos de alteração. Uma técnica insubstituível para identificação completa das substâncias inalteradas e de seus possíveis produtos de alteração é a cromatografia em camada delgada. Os métodos de análises quantitativas devem ser, por sua vez muito específicos de maneira a poderem distinguir entre fármaco inalterado e produto de degradação: um método que não

garante esta diferenciação não serve para estabelecer se um medicamento é estável. Métodos de análise específicos podem ser conseguidos empregando-se técnicas como cromatografia em papel ou coluna, cromatografia preparativa em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta, espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear ¹².

É sempre recomendável, antes de se tirar conclusões sobre a estabilidade fornecida pelos dados experimentais de laboratório, determinar-se a precisão dos métodos através da estatística. Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um produto farmacêutico. Cada componente quer terapeuticamente ativo ou inativo, pode afetar a estabilidade. Outros fatores, chamados extrínsecos como a temperatura, luz, ar (especificamente o oxigênio, dióxido de carbono e vapores de água), umidade, local de acondicionamento também alteram a estabilidade. Há também os fatores intrínsecos como: incompatibilidade, pH, hidrólise, racemização e oxidação ^{61,97}.

O controle da estabilidade pode ser feito através de estudos preliminares e acelerados. De acordo com a resolução GMC 53/96 do Mercosul ^{41, 65} o programa de estudo de estabilidade deve levar em consideração o mercado para o qual está destinado o produto e as zonas climáticas em que será utilizado. O Brasil se enquadra na zona climática IV^{32, 33, 41} que é definida como quente e úmida, portanto as condições de armazenamento são 30°C- 70% de Umidade Relativa(UR) para estudos preliminares e para estudos acelerados as condições forçadas de armazenamento são 40°C-75% UR para 6 meses ou 50°C-90% de UR para 3 meses. O estudo preliminar da estabilidade pode ser realizado a partir de uma exposição, por breve tempo, em condições drásticas como: autoclavação sucessiva, alta temperatura, luz solar direta, uso de agentes oxidantes e redutores, umidade e centrifugação. Todos esses ensaios deverão ser feitos com produtos do mesmo lote ou lotes diversos, mas com substâncias obtidas pelo mesmo processo de síntese. Esses ensaios podem dar informações sobre a vida média e possíveis alterações, permitindo a

seleção de melhores formulações. No entanto, o estudo acelerado da estabilidade deve ser baseado em: seleção de ensaios de envelhecimento, de acordo com a forma farmacêutica em exame; subdivisão das amostras em material de acondicionamento de diversos tipos para selecionar o mais adequado; esquema de verificação bem definido e o mais específico possível, para conseguir em tempo mais breve e de forma mais segura, a coleta de dados essenciais para avaliação da forma em exame^{34, 35, 37}. O objetivo do estudo acelerado é verificar a necessidade de aumentar a dose do princípio ativo e determinar o prazo de validade da substância analisada^{37, 97}.

3 OBJETIVOS

-Seleção de métodos analíticos para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas sob a forma de creme obtidas no comércio e simuladas em laboratório;

-Validação e padronização da metodologia analítica espectrofotometria derivada no ultravioleta, utilizada para a determinação do cetoconazol em creme;

--Validação e padronização da metodologia analítica cromatografia líquida de alta eficiência, também utilizada para a determinação do cetoconazol em creme;

-Estudo de estabilidade acelerada de formulações farmacêuticas creme contendo cetoconazol;

-Estudo da estabilidade física do cetoconazol em preparações farmacêuticas creme obtidas em laboratório, sob diferentes condições de armazenamento.

-Estudos reológicos das amostras de creme obtidas em laboratório e armazenadas sob diferentes condições de temperatura e umidade em tempos determinados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as matérias-primas de grau farmacêutico.

4.1.1 Solventes e soluções

- acetato de amônio(Merck)
- acetato de etila(Merck)
- acetato de sódio(Merck)
- ácido acético glacial(Merck)
- ácido clorídrico(Merck)
- clorofórmio(Merck)
- diisopropilamina(Merck)
- etanol 96%(Merck)
- metanol para cromatografia(Merck)
- n-hexano(Merck)
- triethylamina(Merck)

4.1.2 Fármacos empregados como substâncias de referência

- cetoconazol padrão (United States Pharmacopeia)
- terconazol matéria-prima(Janssen-Cilag)

4.1.3 Matérias-primas

- Butilidroxitolueno B.H.T.(Galena)
- Cetiol V® oleato de decila(Galena)
- Cetoconazol (Americhem-Laboratórios Prieto S/A(Panamá-Panamá))

teor : 99,73%

- Cetoconazol (Laboratórios Aché) teor : 100,92%
- Cetoconazol (Laboratórios EMS) teor : 99,5%
- Chemynol I® imidazolidiniluréia(Chemmy Union)
- EDTA® (Merck)
- Germal II® diazolidiniluréia(ISP do Brasil)
- Isocil PC® metilcloroisotiazolinona e metilisoclorotiazolinona(Chemmy

Union)

- Lanette N® álcool cetoestearílico; cetoestearilsulfato de sódio(Galena)
- Merguard 1200® metilbromoglutaronitrila e fenoxietanol (Calgon-

Galena)

- Nipagin® metilparabeno(Galena)
- Nipazol® propilparabeno(Galena)
- Polawax® cera autoemulsionante(Galena)
- Propilenoglicol(Galena)
- Vaselina líquida(Galena)

4.1.4 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico com hélice adaptável- Ética
- Balança analítica- OHAUS
- Balança eletrônica BG 200 GEHAKA
- Banho ultrasônico Thornton T14
- Célula DSC50 acoplada com acessório para resfriamento

automático(LTC50) IQ-USP

- Coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100RP 18(5µm)
- Cromatógrafo líquido modelo CG 480, munido de injetor de “loop” fixo

de 20µL

- Detector ultravioleta, modelo CG 435
- Espectrofotômetro infravermelho Bomem, com transformador de Fourier
- Espectrofotômetro UV/Visível Beckmann-DU série70, acoplado a computador e impressora, com cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico
- Estufa Ética regulada a 40°C
- Estufa Fanem regulada a 50°C
- Integrador modelo CG-200
- Manta aquecedora
- Medidor de ponto de fusão (Melting Point SMP1 Stuart Scientific)
- Membrana Millipore®
- Milli Q Plus Milipore® – obtenção de água
- Placas de sílica gel 60 F₂₅₄(Merck)
- pHmetro DM 21 Digimed TE 901
- Potes de plástico de poliestireno capacidade de 30 g
- Potes de vidro tipo III capacidade de 30 g
- Refrigerador Tropical Peabody, mantido a 10°C
- Termobalança Shimadzu modelo TGA-50 IQ-USP
- Termo-higrômetro
- Viscosímetro rotacional Brookfield – RVT com dispositivo para pequenas amostras Spindle SC4-29

4.1.5 Formulações estudadas

As formulações do creme base^{58, 59} para incorporar cetoconazol a 2% preparadas em laboratório e submetidas a estudos preliminares, foram as seguintes:

Formulação 1

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
Nipagin ®	0,15	Metilparabeno	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax ®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina líquida	5,00	Vaselina líquida	Emoliente
Nipazol ®	0,05	Propilparabeno	Conservante

Formulação 2

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	3,00	Propilenoglicol	Umectante
Nipagin ®	0,15	Metilparabeno	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax ®	20,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina líquida	2,00	Vaselina líquida	Emoliente
Nipazol ®	0,05	Propilparabeno	Conservante
Fase C	%p/p		
Ácido cítrico	4,00	Ácido cítrico	Solubilizante
Trietanolamina	5,00	Trietanolamina	Neutralizante de pH

Formulação 3

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
Nipagin ®	0,15	Metilparabeno	Conservante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax ®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina líquida	5,00	Vaselina líquida	Emoliente
Nipazol ®	0,02	Propilparabeno	Conservante
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante
Fase C	%p/p		
Merguard 1200 ®	0,30	Metildibromoglutaronitril e fenoxietanol	Conservante

Formulação 4

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
Nipagin ®	0,15	Metilparabeno	Conservante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Lanette N ®	15,00	Dispersão coloidal de alcoóis graxos e sulfato de cetil-estearila	Base auto-emulsionante
Cetiol V ®	3,00	Oleato de decila	Emoliente
Vaselina líquida	5,00	Vaselina líquida	Emoliente
Nipazol ®	0,02	Propilparabeno	Conservante
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante

Formulação 5

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina Líquida	5,00	Vaselina Líquida	Emoliente
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante
Fase C	%p/p		
Merguard 1200®	0,30	Metildibromoglutaronitril e fenoxietanol	Conservante

Formulação 6

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina Líquida	5,00	Vaselina Líquida	Emoliente
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante
Fase C	%p/p		
Chemynol I®	0,50	Imidazolidiniluréia	Conservante

Formulação 7

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina Líquida	5,00	Vaselina Líquida	Emoliente
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante
Fase C	%p/p		
Germal II®	0,50	Diazolidiniluréia	Conservante

Formulação 8

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
EDTA	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Polawax®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina Líquida	5,00	Vaselina Líquida	Emoliente
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante
Fase C	%p/p		
Chemynol I®	0,50	Imidazolidiniluréia	Conservante
Isocil PC®	0,05	Mistura de isotiazolinonas	Conservante

Formulação 4A

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Lanette N ®	15,00	Dispersão coloidal de alcoóis graxos e sulfato de cetil-estearila	Base auto-emulsionante
Cetiol V ®	3,00	Oleato de decila	Emoliente
Vaselina líquida	5,00	Vaselina líquida	Emoliente
B.H.T.	0,05	Butilidroxitolueno	Antioxidante

Formulação 4B

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
Nipagin ®	0,15	Metilparabeno	Conservante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Lanette N ®	15,00	Dispersão coloidal de alcoóis graxos e sulfato de cetilestearila	Base auto-emulsionante
Cetiol V ®	3,00	Oleato de decila	Emoliente
Vaselina líquida	5,00	Vaselina líquida	Emoliente
Nipazol ®	0,02	Propilparabeno	Conservante

Formulação 4C

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)	%p/p		
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)	%p/p		
Lanette N ®	15,00	Dispersão coloidal de alcoóis graxos e sulfato de cetilestearila	Base auto-emulsionante
Cetiol V ®	3,00	Oleato de decila	Emoliente
Vaselina Líquida	5,00	Vaselina Líquida	Emoliente

As fases A e B foram aquecidas em manta aquecedora à temperatura de 70°C. A fase aquosa(A) foi vertida sobre a oleosa(B) sob constante agitação, com o auxílio de um agitador mecânico com hélice, até atingir consistência. Os componentes da fase C, juntamente com o cetoconazol foram adicionados a uma temperatura em torno de 45°C.

4.1.5.2 Obtenção do creme com cetoconazol a 2%

Em um gral de porcelana triturou-se até pó fino o cetoconazol, exatamente pesado, a fim de se obter concentração de 2%, e adicionou-se uma pequena quantidade de propilenoglicol para solubilizá-lo. Acrescentou-se aos poucos o creme base ao gral contendo cetoconazol e misturou-se para obter uma formulação homogênea.

Na **Formulação 2** foi usado o ácido cítrico para solubilizar o cetoconazol, e trietanolamina para corrigir o pH.

Todas as formulações foram acondicionadas em frascos de plástico e de vidro com capacidade de 30g e submetidas a estudos preliminares em diferentes condições de armazenamento.

4.1.6 Amostras

A formulação que se mostrou mais adequada para os estudos de estabilidade e seleção de métodos de análise foi a **Formulação 6**(amostra simulada):

Formulação 6

Nome comercial		Nome químico	Função
Fase aquosa(A)		%p/p	
Propilenoglicol	5,00	Propilenoglicol	Umectante
EDTA dissódico	0,20	EDTA dissódico	Quelante
Água destilada q.s.p.	100,0		Veículo
Fase oleosa(B)		%p/p	
Polawax ®	15,00	Cera auto-emulsionante	Cera auto-emulsionante não iônica
Vaselina líquida	5,00	Vaselina líquida	Emoliente
B.H.T.	0,05	Butil hidróxitolueno	Antioxidante
Fase C		%p/p	
Chemynol I ®	0,50	Imidazolidiniluréia	Conservante
Cetoconazol	2,00	Cetoconazol	Antifúngico

Dentre as várias amostras de creme com cetoconazol que são comercializadas no Brasil, a amostra utilizada foi o creme com cetoconazol a 2% do Laboratório Teuto(Medicamento Genérico Lei 9.787/99):

Cetoconazol.....20 mg
 Excipiente(Metilparabeno, propilparabeno, álcool etílico, EDTA dissódico, Polawax®, polissorbato 80, propilenoglicol) q.s.p. ....1 g

4.2 Métodos

4.2.1 Identificação do cetoconazol matéria-prima

A identificação do cetoconazol matéria-prima foi realizada de acordo com as monografias encontradas nas Farmacopéias Americana⁹⁸ e Britânica⁰⁶. Para o ensaio de identificação da matéria-prima cetoconazol em cromatografia em camada delgada foram utilizadas as amostras de três diferentes laboratórios(Aché, Americhem, EMS)e nos demais ensaios utilizou-se a matéria – prima cetoconazol do laboratório Americhem.

4.2.1.1 Ponto de fusão

Foi determinado o ponto de fusão da amostra de cetoconazol utilizando o aparelho Melting Point SMP1 Stuart Scientific.

4.2.1.2 Cromatografia em camada delgada

Para a identificação através da cromatografia em camada delgada foram preparadas soluções de amostras de cetoconazol matéria – prima de três laboratórios diferentes na concentração de 10mg/mL em clorofórmio e aplicadas em cromatoplasmas em vidro 20 X 20 cm recobertas com Silica gel 60 F254 Merck e comparadas com uma aplicação do cetoconazol padrão, também na concentração de 10mg/mL. A fase móvel utilizada foi composta pela mistura de n-hexano: acetato de etila: metanol: água: ácido acético glacial(27: 40: 30: 2: 1) . Para a revelação das manchas foi utilizado vapor de iodo^{97, 98}.

4.2.1.3 Espectroscopia no infravermelho

A amostra foi identificada por espectroscopia na região do infravermelho(IV). Primeiramente foi transformada em pastilha de KBr, e

determinada de acordo com as recomendações da literatura¹¹. O espectro obtido foi comparado com um espectro relatado na literatura.

4.2.1.4 Estudos termooanalíticos

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Condições experimentais: cadinho de alumínio(parcialmente fechado), massa de amostra em torno de 1,9mg, atmosfera de nitrogênio(50mL/min), programação de aquecimento desde temperatura ambiente até 600°C, à razão de aquecimento de 10°C/min.

Termogravimetria (TG)

- calibração do instrumento com padrão de oxalato de cálcio.
- condições experimentais: cadinho de platina, massa de amostra em torno de 4,5 a 5 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio(50mL/min), programação de aquecimento desde temperatura ambiente até 900°C, à razão de aquecimento de 10°C/min.

4.2.2 Ensaios espectrofotométricos preliminares

Para a análise do cetoconazol matéria-prima e do cetoconazol creme a 2% por espectrofotometria no UV, foram obedecidas as seguintes condições experimentais: velocidade de 300nm/min, limite de absorbância de 0,000 a 1,000; cubeta de quartzo de 1 cm de espessura.

Os parâmetros utilizados para a análise do cetoconazol matéria-prima foram os seguintes:

- solvente metanol ; concentração de 25µg/mL de cetoconazol matéria-prima; comprimento de onda máximo(λ max) 244 nm;

- solvente metanol ; concentração de 220µg/mL de cetoconazol matéria-prima; λ max de 296 nm;
- solvente ácido clorídrico 0,01 mol/L; concentração de 270µg/mL de cetoconazol matéria-prima; λ max 269nm.

Todas essas análises foram efetuadas por espectrofotometria direta no UV e por espectrofotometria derivada no UV.

As amostras de cetoconazol creme a 2% foram analisadas seguindo os parâmetros abaixo:

- solvente ácido clorídrico 0,01 mol/L; concentração 200µg/mL de cetoconazol ; λ max 269nm – espectrofotometria direta no UV; λ max 218,5nm – espectrofotometria derivada no UV;
- solvente ácido clorídrico 0,01 mol/L; concentração 200µg/mL de cetoconazol ; λ max 269nm – espectrofotometria direta no UV; concentração 25µg/mL; λ max 218,5nm – espectrofotometria derivada no UV;
- solvente metanol; ; concentrações 20µg/mL e 5µg/mL de cetoconazol ; λ max 244nm – espectrofotometria direta no UV; λ max 257nm – espectrofotometria derivada no UV.

4.2.6 Ensaios cromatográficos preliminares

Escolha do solvente

Foram testados os solventes ácido clorídrico 1mol/L ; mistura de diclorometano e metanol(1:1) e metanol.

Fase móvel

Foram testados os seguintes tipos de fase móvel:

- mistura de trietilamina em metanol(1:500) e solução de acetato de amônio em água(1:200) nas proporções de 7:3 e 75:25;
- diisopropilamina em metanol(1:500) e solução de acetato de amônio em água(1:200) nas proporções 7:3 e 8:2.

Colunas cromatográficas empregadas

- coluna cromatográfica Nova Pack C18® 300 mm x 3,9mm;
- coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) em LiChroCART® medindo 4mm x 12,5mm.

4.3 Validação da metodologia analítica

4.3.1 Padronização do método espectrofotométrico

Após terem sido realizados os ensaios preliminares, foram estabelecidos os seguintes parâmetros:

- Intervalo de leitura dos espectros de absorção: 211 – 295 nm.
- λ máximo para o cetoconazol: 244 nm em espectrofotometria direta no UV e 257 nm em espectrofotometria derivada no UV de primeira ordem.
- Velocidade de varredura dos espectros de absorção: 300 nm/min

- Solvente: metanol para cromatografia
- Cubeta de quartzo de 1 cm.
- Assentamento das ordenadas: $\pm 0,500$
- Delta lambda ($\Delta\lambda$): 2 nm
- Método quantitativo: zero – pico
- Ordem da derivada: 1ª

Verificou-se que a derivatização dos espectros no UV direto melhora a visualização dos mesmos. Padronizou-se como método de análise a espectrofotometria derivada no UV.

4.3.1.1 Construção da curva de calibração

Foram pesados 25,0 mg de cetoconazol padrão e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução final de 250,0 µg/mL.

Desta solução a 250,0 µg/mL foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL para balões de 25 mL e completou-se o volume com metanol, obtendo-se concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 µg/mL de cetoconazol em cada balão volumétrico.

As derivadas das leituras das absorbâncias destas soluções foram efetuadas a 257 nm, empregando-se metanol como branco.

4.3.1.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

a) Preparação da solução padrão

Foram pesados 10,0 mg de cetoconazol padrão e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, completou-se o volume do balão com metanol, desta solução transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, completou-se o volume com metanol e obteve-se uma solução de concentração final de 20,0 µg/mL.

b) Preparação da solução da amostra creme simulada(**formulação 6**)

Foram pesados 500,0 mg de creme de cetozonazol a 2%, equivalentes a 10,0 mg de cetozonazol e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, dissolvendo-se o creme com metanol, levou-se a solução 15 minutos em ultrassom e depois completou-se o volume com metanol.

A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo, rejeitando-se os primeiros 10,0 mL e do filtrado transferiu-se uma alíquota de 5,0mL para balão volumétrico de 25,0 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração final correspondente a 20,0µg/mL.

c) Preparo da solução da amostra creme comercial

Essa solução foi preparada conforme item 4.3.1.2b., utilizando a amostra creme comercial de cetozonazol a 2%.

d) Preparo da solução da amostra placebo

Pesou-se 500,0 mg de creme base sem cetozonazol, procedendo-se conforme o preparo da solução amostra de creme com cetozonazol (item 4.3.1.2 b).

e) Preparo da mistura de solução padrão e solução da amostra placebo

Foram pesados 10,0 mg de cetozonazol padrão e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, completou-se o volume do balão com metanol, desta solução transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, e nesse mesmo balão transferiu-se uma alíquota de 5,0mL da solução placebo concentrada, completou-se o volume do balão com metanol.

Todas essas soluções foram analisadas por espectrofotometria derivada no UV.

4.3.1.3 Aplicação do método padronizado às amostras creme

Desvio padrão relativo - Precisão

a) Preparação da solução padrão

Foi utilizada a média aritmética das leituras de 3 soluções padrão de 20 µg/mL preparadas como descrito no item 4.3.1.2.

b) Preparação da solução amostra creme simulada(**formulação 6**)

Foram preparadas 10 soluções de amostra creme simulada de acordo com o descrito no item 4.3.1.2. Todas as soluções com concentração final de 20,0 µg/mL , foram analisadas por espectrofotometria derivada no UV.

c) Preparação da amostra creme comercial

Foram preparadas 10 soluções de amostra creme comercial de acordo com o descrito no item 4.3.1.2. Todas as soluções com concentração final de 20,0 µg/mL, foram analisadas por espectrofotometria derivada no UV.

Teste de recuperação - Exatidão

a) Preparo da solução padrão

Foram pesados 25,0 mg de cetoconazol e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução de concentração final de 250,0 µg/mL.

b) Preparo da solução amostra creme comercial

Foi pesado 1,25 g da amostra creme comercial, equivalente a 25,0 mg de cetoconazol e transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL, dissolvendo-se com metanol em banho de ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução a 250,0 µg/mL.

Filtrou-se essa solução, rejeitando-se os primeiros 10,0 mL, desse filtrado foram coletadas alíquotas para o teste de recuperação.

c) Procedimento

Alíquotas de solução padrão e de amostra creme foram transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL, conforme o procedimento seguinte:

	Amostra creme 250,0 µg/mL	Padrão 250,0 µg/mL	Concentração final
1	1,0 mL	_____	10,0 µg/mL
2	_____	1,0mL	10,0 µg/mL
3	1,0 mL	1,0mL	20,0 µg/mL
4	1,0 mL	1,5 mL	25,0 µg/mL
5	1,0 mL	2,0 mL	30,0 µg/mL

Essas soluções foram analisadas por espectrofotometria derivada no UV.

4.3.2 Padronização do método cromatográfico

Após vários experimentos, foram fixados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: mistura de trietilamina em metanol 1:500 e solução de acetato de amônio em água 1:200 na proporção de 75:25.

A fase móvel foi filtrada em membrana para filtração Millipore® de 0,5µm e degaseificada antes de ser utilizada.

- Vazão: 1,0 mL/min
- Detecção no UV: 225 nm
- Atenuação: 7 A.U.F.S.
- Temperatura ambiente(25°C ± 1°C)
- Volume de injeção: 20 µL
- Coluna: LiChrospher® 100RP-18(5mm) Merck®

- Solvente: metanol

As soluções foram filtradas em unidades filtrantes HV MILLEX® 0,45 µm, antes de serem injetadas no cromatógrafo.

4.3.2.1 Construção da curva de calibração

a) Preparação da solução padrão

Foram pesados exatamente 10,0 mg de cetoconazol e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com metanol, obtendo-se solução de concentração final de 100,0 µg/mL de cetoconazol .

b) Preparo da solução de padrão interno

Foram pesados exatamente 25,0 mg de terconazol e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com metanol, obtendo-se solução de concentração final de 250,0 µg/mL de terconazol .

c) Procedimento

Alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 mL da solução padrão foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e em cada balão de 10,0 mL foi acrescentado uma alíquota de 2,0 mL da solução de padrão interno a 250,0 µg/mL, completou-se o volume de cada balão com metanol, obtendo-se soluções com concentrações de 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 e 80,0 µg/mL de cetoconazol e 50,0µg/mL de terconazol.

4.3.2.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

a) Preparação da solução padrão

Foram pesados 10,0 mg de cetoconazol e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com metanol. Desta solução transferiu-se uma alíquota de 4,0 mL para balão volumétrico de 10,0mL e uma alíquota de 2,0 mL da solução de padrão interno a 250,0µg/mL, completou-se o volume com metanol e obteve-se uma concentração final de 40,0 µg/mL de cetoconazol e 50,0µg/mL de terconazol.

b) Preparação da solução amostra creme simulada(**formulação 6**)

Foi pesado 1,0 g da amostra creme simulada, equivalente a 20,0 mg de cetoconazol e transferido para balão volumétrico de 100,0 mL, adicionou-se cerca de 80,0 mL de metanol e submeteu-se a solução ao banho de ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com metanol. Filtrou-se esta solução, rejeitando-se os primeiros 10,0 mL, do filtrado transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10,0 mL e uma alíquota de 2,0 mL de solução de padrão interno a 250,0 µg/ml, completou-se o volume com fase móvel e obtendo-se uma concentração final de 40,0 µg/mL de cetoconazol e 50,0 µg/mL de terconazol.

c) Preparo da solução amostra placebo

Foi pesado 1,0 g de creme base sem cetoconazol e procedeu-se conforme o preparo da solução amostra creme, sem adicionar padrão interno, descrito anteriormente.

4.3.2.3 Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação

Procedimento:

Foram preparadas soluções contendo 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL de cetoconazol e em cada solução foi acrescentado 50 µg/mL de padrão interno terconazol. Foram efetuadas três determinações para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos a partir das razões entre as áreas de padrão e padrão interno.

O cálculo para o limite de detecção(LD) e limite de quantificação(LQ) foi realizado pelas fórmulas⁹⁴:

$$LD = \frac{\text{Desvio Padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3,3$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio Padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10$$

4.3.2.4 Aplicação do método padronizado às amostras creme

Desvio padrão relativo - Precisão

a) Preparação da solução padrão

Foram preparadas três soluções padrão conforme item 4.3.2.2a.e efetuadas três leituras de cada solução padrão. Utilizou-se a média aritmética dessas leituras como valor do padrão.

b) Preparação da solução de amostra creme simulada(**formulação 6**)

A solução de amostra creme simulada foi preparada conforme descrito no item 4.3.2.2b. Foram realizadas 10 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

c) Preparação da solução de amostra creme comercial

A solução de amostra creme comercial foi preparada conforme descrito no item 4.3.2.2b. Foram realizadas 10 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

Teste de recuperação - Exatidão

a) Preparação da solução padrão

Foram pesados 25,0 mg de cetoconazol padrão e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução de 250,0 µg/mL.

b) Preparação da solução de amostra creme comercial

Foi pesado 1,0 g da amostra creme, equivalente a 20,0 mg de cetoconazol e transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL, adicionou-se cerca de 80,0 mL de metanol e submeteu-se essa solução ao banho de ultrassom por 15 minutos, depois completou-se o volume com metanol. Filtrou-se esta solução contendo 200,0 µg/mL de cetoconazol. Esse filtrado foi utilizado para preparar as soluções diluídas para realizar o teste de recuperação.

c) Preparação da solução de padrão interno

Foram pesados 25,0 mg de terconazol padrão e transferidos para balão volumétrico de 100,0mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução de 250,0µg/mL.

Procedimento:

Alíquotas de solução padrão e de amostra creme foram transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL, conforme procedimento que segue:

	Amostra creme 250,0 µg/mL (filtrado)	Padrão 250,0 µg/mL	Concentração final de cetoconazol
1	4,0 mL	_____	40,0 µg/mL
2	_____	4,0mL	40,0 µg/mL
3	4,0 mL	1,0 mL	50,0 µg/mL
4	4,0 mL	2,0 mL	60,0 µg/mL
5	4,0 mL	3,0 mL	70,0 µg/mL

Em todos os balões volumétricos foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução de padrão interno a 250,0 µg/mL, sendo a concentração final de terconazol(padrão interno) em cada balão 50,0 µg/mL

4.4 Estabilidade física do cetoconazol em creme

a) Condições de armazenamento das amostras

Após o preparo de um lote de 3 kg da **Formulação 6**(amostra simulada), este foi dividido em amostras acondicionadas em frascos de vidro tipo II e frascos plásticos de poliestireno com capacidade de 30 g. Foram feitas coletas dessas amostras após 48 horas do preparo e analisadas quanto às características físicas.

Em seguida, as amostras foram armazenadas em três condições diferentes: 10°C, 40°C e 75%U.R.(umidade relativa)* e 50°C e 90%U.R.**.

*Para atingir a umidade de 75%U.R. e temperatura de 40°C, as amostras foram armazenadas em dessecador contendo solução saturada de acetato de sódio e armazenado em estufa a 40°C. A umidade de 75% foi medida através de termo-higrômetro.

** A umidade de 90%U.R. e temperatura de 50°C foram atingidas adicionando-se água destilada em dessecador e armazenando-o em estufa a 50°C. A umidade de 90%U.R., também foi medida através de termo-higrômetro.

b) Análise das amostras de cetoconazol creme

As amostras a 50°C e 90%U.R. foram coletadas e analisadas nos tempos 7, 14, 28, 42 dias, as amostras a 40°C e 75%U.R. nos tempos 7 e 28 dias e as amostras a 10°C foram analisadas após 1 mês de armazenamento.

As características físicas foram analisadas através de sua aparência, pH e comportamento reológico.

4.4.1 Características organolépticas

As amostras armazenadas à temperaturas diferentes foram observadas em relação a cor e odor em tempos pré – determinados.

4.4.2 Análise de pH

O pH das amostras foi analisado nos tempos e temperaturas determinados. Foram preparadas soluções a 10% da amostra creme⁷⁶. O pH inicial dessa formulação foi de 5,6.

4.4.3 Comportamento reológico

As análises foram realizadas à temperatura ambiente utilizando-se 13,0 g da amostra, em viscosímetro rotacional Brookfield e “spindle” SC4-29. As amostras foram submetidas aos seguintes gradientes de velocidade: 0,125; 0,25; 0,625; 1,25; 2,50; 5,00; 12,50 e 25,00 1/s. O tempo estabelecido para cada leitura do torque foi de 2 minutos.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação do cetoconazol matéria-prima

5.1.1 Ponto de fusão

Cetoconazol	Faixa de fusão °C
Matéria-prima	148 – 154
Padrão USP	148 – 152

5.1.2 Cromatografia em camada delgada

Figura 5 - Cromatografia em camada delgada do cetoconazol

- 1- Padrão cetoconazol
- 2- Matéria-prima (Laboratório EMS)
- 3- Matéria-prima (Laboratório Aché)
- 4- Matéria-prima (Americhem)

O sistema eluente composto pela mistura de n-hexano; acetato de etila; metanol; água; ácido acético glacial(27:40:30:2:1) permitiu a identificação das manchas do cetoconazol padrão e das amostras de matéria-prima cetoconazol. Os Rfs podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Valores de Rf do cetoconazol padrão e das amostras de matéria-prima

Amostra	Rf
Padrão cetoconazol	0,67
Matéria-prima EMS	0,66
Matéria-prima Aché	0,67
Matéria-prima Americhem	0,66

5.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Figura 6- Espectro infravermelho do cetoconazol matéria - prima

5.1.4 Estudos termooanalíticos

Figura 7 - Curva DSC do cetoconazol. Condições: cadinho de alumínio com massa de amostra em torno de 1,9mg, sob atmosfera dinâmica de N₂(50 mL), da temperatura ambiente a 600°C, com razão de aquecimento de 10°C/min.

Figura 8 – Curvas TG/DTG do cetoconazol Condições: cadinho de platina com massa de amostra entre 4,5-5 mg, sob atmosfera dinâmica de N₂(50 mL), da temperatura ambiente a 900°C, com razão de aquecimento de 10°C/min.

5.1.5 Ensaios preliminares com as diferentes formulações do creme com cetoconazol a 2%

Todas as amostras de creme com cetoconazol a 2%, inicialmente possuíam coloração branca. Para cada amostra com cetoconazol submetida à diferentes temperaturas, preparou-se uma amostra de creme sem cetoconazol e submeteu-se às mesmas condições. Todas as amostras de creme base sem cetoconazol, submetidas à diferentes temperaturas, não sofreram alteração de cor.

As tabelas abaixo, indicam quais amostras sofreram alteração de cor, pela influência do tempo e temperatura:

Tabela 2 - Formulações contendo cetoconazol a 2% submetidas a temperatura de 10°C

Tempo(dias)	7	15	30	45	60
Amostras					
Formulação 1	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 2	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 3	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 4	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 5	S A	S A	S A	S A	S A

S A – sem alteração

Tabela 3 - Formulações contendo cetoconazol a 2% mantidas à temperatura ambiente

Tempo(dias)	7	15	30	45	60
Amostras					
Formulação 1	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 2	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea
Formulação 3	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 4	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 5	S A	S A	S A	S A	S A

S A – sem alteração

Tabela 4 - Formulações contendo cetoconazol a 2% submetidas a temperatura de 35°C

Tempo(dias)	7	15	30	45	60
Amostras					
Formulação 1	S A	S A	S A	Levemente rósea	Levemente rósea
Formulação 2	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea
Formulação 3	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 4	S A	S A	S A	S A	S A
Formulação 5	S A	S A	S A	S A	S A

S A – sem alteração

Tabela 5 – Formulações contendo cetoconazol a 2% submetidas à temperatura de 40°C

Tempo(dias)	7	15	30	45	60
Amostras					
Formulação 1	S A	S A	S A	Rósea	Rósea
Formulação 2	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea
Formulação 3	S A	S A	S A	Levemente marrom	Levemente marrom
Formulação 4	S A	S A	S A	Levemente rósea	Levemente rósea
Formulação 5	S A	S A	S A	Levemente amarela	Levemente amarela

S A – sem alteração

Tabela 6 - Formulações contendo cetoconazol a 2% submetidas a temperatura de 50°C

Tempo(dias)	7	15	30	45	60
Amostras					
Formulação 1	S A	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea
Formulação 2	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea
Formulação 3	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom
Formulação 4	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea	Rósea
Formulação 5	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela

S A – sem alteração

Tabela 7 - Amostras submetidas à temperatura de 50°C e mantidas à temperatura ambiente por 1 mês

Temperatura	Ambiente	50°C
Amostras		
Formulação 4A	S A	S A
Formulação 4B	S A	Levemente rósea
Formulação 4C	S A	S A
Formulação 6	S A	S A
Formulação 7	S A	S A
Formulação 8	S A	S A

S A – sem alteração

5.6 Validação da metodologia analítica

5.6.1 Padronização do método espectrofotométrico por derivada de 1ª ordem

5.6.1.1 Construção da curva de calibração

Os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração são descritos na **Tabela 8**. A **Figura 9** mostra a curva de calibração do cetoconazol obtida a 257 nm em espectrofotometria no UV derivada e a **Figura 10** mostra a sobreposição dos espectros derivados no UV utilizados para a obtenção da curva de calibração.

Tabela 8 Valores experimentais utilizados na construção da curva de calibração do cetoconazol para o método espectrofotométrico.

Concentração de leitura (µg/mL)	dA/dλ *
5,00	0,0075
10,0	0,0148
15,0	0,0228
20,0	0,0304
25,0	0,0375
30,0	0,0444

*média de três determinações

Figura 9 Curva de calibração do cetoconazol em metanol.

λ max 257nm. Ordem da derivada: 1^a.

Dados estatísticos: $b = 0,001487$; $a = 0,0002133$;

$Se = 0,000378$; $Ser = 1,44\%$; $r = 0,9997$.

Figura 10 - Sobreposição dos espectros de absorção do cetoconazol (5,0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$ em metanol). λ max 257 nm. Ordem da derivada: 1^a. Método zero pico.

5.6.1.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

A **Figura 11** mostra a sobreposição dos espectros de absorção do placebo(A), padrão e placebo(B), padrão(C) e amostra de cetoconazol creme simulada(**formulação 6**) (D) em metanol.

Figura 11 Sobreposição dos espectros de absorção do placebo(A), padrão 20 µg/ml e placebo(B), padrão 20 µg/mL(C) e amostra de cetoconazol creme 20 µg/mL(D) em metanol. λ max 257 nm. Velocidade de varredura: 300 nm/min. Ordem da derivada = 1^a.

5.6.1.3 Aplicação do método padronizado às amostras creme

Desvio padrão relativo - Precisão

Os resultados obtidos com a aplicação do método espectrofotométrico a amostra creme com cetoconazol simulada (**formulação 6**) estão representados na **Tabela 9** e os resultados do tratamento estatístico estão resumidos na **Tabela 10**. Já os resultados referentes a amostra comercial estão representados nas **Tabelas 11 e 12**.

Figura 12 - Espectro de absorção no ultravioleta da amostra simulada de cetoconazol creme. Concentração de 20µg/mL em metanol. Ordem da derivada=1^a. λ max 257nm.

Tabela 9 Resultados obtidos na determinação do teor do cetoconazol presente na amostra creme simulada(**formulação 6**) empregando o método espectrofotométrico derivado de primeira ordem

Amostra creme Valor Teórico 20µg/mL	Valor encontrado µg/mL	Teor percentual (%)
1	20,264	101,32
2	20,132	100,66
3	20,462	102,31
4	20,330	101,65
5	20,330	101,65
6	20,264	101,32
7	20,330	101,65
8	20,264	101,32
9	20,132	100,66
10	20,462	102,31

Tabela 10 Resultados da análise estatística na amostra de creme com cetoconazol simulada(**formulação 6**) pelo método espectrofotométrico derivado de primeira ordem

Desvio padrão	Desvio padrão RSD%	Intervalo de confiança %
0,566	0,56	101,49 ± 0,402

Figura 13 - Espectro de absorção no ultravioleta da amostra comercial de cetoconazol creme. Concentração de 20µg/mL em metanol. Ordem da derivada=1^a. λ max 257nm.

Tabela 11 Resultados obtidos na determinação do teor do cetoconazol presente na amostra creme comercial empregando o método espectrofotométrico derivado de 1^a ordem

Amostra creme Valor Teórico 20µg/mL	Valor encontrado µg/mL	Teor percentual (%)
1	20,46	102,30
2	20,59	102,95
3	20,59	102,95
4	20,66	103,30
5	20,59	102,30
6	20,66	103,30
7	20,46	102,30
8	20,59	102,95
9	20,46	102,30
10	20,46	102,30

Tabela 12 Resultados da análise estatística na amostra de creme com cetoconazol comercial pelo método espectrofotométrico derivado de 1ª ordem

Desvio padrão	Desvio padrão relativo RSD%	Intervalo de confiança %
0,41819	0,41	102,76 ± 0,2991

Teste de recuperação para o método espectrofotométrico - Exatidão

A **Tabela 13** apresenta os resultados do teste de recuperação na amostra de creme comercial com cetoconazol.

Tabela 13 Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método espectrofotométrico derivado de 1ª ordem para a amostra de creme com cetoconazol.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado(µg/mL)	Quantidade de padrão recuperado*(µg/mL)	Recuperação (%)
1	10,0	10,34	103,36
2	15,0	15,00	100,00
3	20,0	19,47	97,35

*média de três determinações

5.6.2 Padronização do método cromatográfico

Figura 14 Cromatograma do cetoconazol padrão(A)40 μ g/mL e do terconazol padrão interno 50 μ g/mL.Solvente: metanol. Condições cromatográficas: Fase móvel: mistura de trietilamina e metanol(1:500) em solução de acetato de amônio(1:200)75:25. Coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP-18 12,5mmX4mm. Vazão:1mL/min. Detecção no UV: 225 nm.

Figura 15 Cromatograma da amostra de cetoconazol creme comercial(A)40 μ g/mL e do terconazol padrão interno 50 μ g/mL.Solvente: metanol. Condições cromatográficas: Fase móvel: mistura de trietilamina e metanol(1:500) em solução de acetato de amônio(1:200)75:25 Coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP-18 12,5mmX4mm. Vazão:1mL/min. Detecção no UV: 225 nm.

Figura 16 Cromatograma da amostra de cetoconazol creme simulada(**formulação 6**) (A)40 μ g/mL e do terconazol padrão interno 50 μ g/mL.Solvente: metanol. Condições cromatográficas: Fase móvel: mistura de trietilamina e metanol(1:500) em solução de acetato de amônio(1:200)75:25 Coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP-18 12,5mmX4mm. Vazão:1mL/min. Detecção no UV: 225 nm.

5.6.2.1 Construção da curva de calibração

A **Figura 17** representa a curva de calibração do cetoconazol. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração são descritos na **Tabela 14**.

Figura 17 Curva de calibração do cetoconazol. Concentrações de 20 a 80 µg/mL de cetoconazol e 50µg/mL de terconazol padrão interno. Fase móvel: mistura de trietilamina em metanol(1:500) em solução de acetato de amônio em água(1:200)75:25. Dados estatísticos: $b = 0,02328$; $a = -0,06066$; $Se = 0,0163$
Ser = 1,48%; $r = 0,99809$

Tabela 14 Resultados experimentais utilizados na construção da curva de calibração pelo método cromatográfico.

Concentração de leitura µg/mL	Razão das áreas AP/API*
20,0	0,43337
30,0	0,64810
40,0	0,83808
50,0	1,08589
60,0	1,29394
70,0	1,60948
80,0	1,81286

*média de três determinações para cada concentração

AP = área do padrão

API = área do padrão interno

5.6.2.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

A **Figura 18** mostra os cromatogramas do placebo(creme base sem cetozonazol)(A), da mistura de cetozonazol padrão com creme placebo(B) e do cetozonazol creme amostra simulada(**formulação 6**)(C).

Figura 18 Cromatograma A creme placebo sem cetozonazol; Cromatograma B mistura de cetozonazol padrão 40 μ g/mL ,creme placebo e padrão interno 50mg/mL; Cromatograma C: cetozonazol creme 40 μ g/mL e padrão interno 50 μ g/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel: mistura de trietilamina e metanol(1:500) em solução de acetato de amônio(1:200)75:25. Coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP-18 12,5mmX4mm. Vazão:1,0mL/min. Detecção no UV: 225nm.

5.6.2.3 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os valores obtidos para a determinação dos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15 Valores obtidos para a determinação dos limites de detecção e quantificação pelo método cromatográfico

Parâmetro	Cetoconazol
limite de detecção($\mu\text{g/mL}$)	1,02
limite de quantificação($\mu\text{g/mL}$)	3,41

5.6.2.4 Aplicação do método padronizado às amostras creme

Desvio padrão relativo – Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação quantitativa das amostras comercial e simulada(**formulação 6**) de creme com cetoconazol através da cromatografia líquida de alta eficiência(CLAÉ) podem ser observados nas **Tabelas16 e 17**.

Tabela 16 Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da amostra de creme com cetoconazol(comercial) por CLAE e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração de cetoconazol (40µg/mL)	Porcentual obtido(%)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo RSD %	Intervalo de confiança %
1	38,86	97,15			
2	38,96	97,41			
3	39,84	99,61			
4	39,03	97,57			
5	39,54	98,84	1,2241	1,25	98,23 ± 0,8756
6	39,22	98,04			
7	38,60	96,49			
8	39,88	99,71			
9	40,00	100,00			
10	39,00	97,49			

Tabela 17 Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da amostra simulada de creme(formulação 6) com cetoconazol por CLAE e análise estatística.

Amostra	Concentração de cetoconazol (40µg/mL)	Porcentual obtido(%)	Desvio padrão	Desvio padrão Relativo RSD%	Intervalo de confiança %
1	43,36	108,39			
2	44,27	110,67			
3	43,18	107,94			
4	44,98	112,45			
5	44,76	111,91	2,3188	2,13	108,79 ± 1,66
6	42,56	106,41			
7	42,31	105,77			
8	43,39	108,48			
9	43,79	109,49			
10	42,58	106,45			

Teste de recuperação para o método cromatográfico – Exatidão

A **Tabela 18** apresenta os resultados do teste de recuperação na amostra comercial de creme com cetoconazol.

Tabela 18 Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para a amostra comercial de creme com cetoconazol.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado*($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
1	10,0	10,09	100,90
2	20,0	20,06	100,30
3	30,0	30,43	101,44

*média de três determinações

5.7 Estabilidade física do cetoconazol em creme

5.7.1 Características organolépticas

Todas as amostras(**formulação 6**) mantiveram a cor branca inicial, bem como seu odor. As amostras a 50°C analisadas nos tempos 7,14 e 28 dias mostraram mudanças em sua consistência, tornaram-se mais líquidas, com aspecto de loção. As amostras de 42 dias a 50°C tornaram-se ainda mais líquidas. As amostras a 50°C durante 63 dias, tornaram-se totalmente líquidas. As amostras a 40°C e a 10°C não sofreram mudanças.

5.7.2 Análise de pH

O pH inicial das amostras simuladas(**formulação 6**) foi de 5,6. A **Tabela 18** mostra os valores de pH dessas amostras nos determinados tempo e temperatura.

Tabela 19 Resultados obtidos pela medida de pH das amostras de creme cetoconazol simuladas

Condições de armazenamento	10°C		40°C – 75%UR		50°C – 90% UR	
dias	plástico	vidro	plástico	vidro	plástico	vidro
7	-----	-----	5,8	5,8	5,6	5,6
14	-----	-----	-----	-----	5,6	5,6
28	-----	-----	5,5	5,5	5,6	5,7
30	5,4	5,4	-----	-----	-----	-----
42	-----	-----	-----	-----	5,6	5,6
60	5,6	5,6	-----	-----	-----	-----
63	-----	-----	5,3	5,3	5,7	5,7

----- não foi determinado

5.7.3 Comportamento reológico

Os resultados dos estudos reológicos das amostras de cetoconazol creme, armazenadas nas condições: 10°C, 40°C – 75%UR e 50°C – 90%UR podem ser observados nas **Tabelas 20 a 41** e nas **Figuras 19 a 30**.

Tabela 20 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e analisadas 48 horas após seu preparo

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	5,0	20000	100000	0,125	12500
1,0	6,5	10000	65000	0,25	16250
2,5	10,5	4000	42000	0,625	26250
5,0	15,0	2000	30000	1,25	37500
10	20,0	1000	20000	2,50	50000
20	24,0	500	12000	5,00	60000
50	32,5	200	6500	12,50	81250
100	42,5	100	4250	25,00	106250
100	43,0	100	4300	25,00	107500
50	33,0	200	6600	12,50	82500
20	24,5	500	12250	5,00	61250
10	18,5	1000	18500	2,50	46250
5,0	14,0	2000	28000	1,25	35000
2,5	9,0	4000	36000	0,625	22500
1,0	5,5	10000	55000	0,25	13750
0,5	4,0	20000	80000	0,125	10000

*Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Tabela 21 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e analisadas 48 horas após seu preparo

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	5,0	20000	100000	0,125	12500
1,0	6,5	10000	65000	0,25	16250
2,5	10,5	4000	42000	0,625	26250
5,0	14,5	2000	29000	1,25	36250
10	20,0	1000	20000	2,50	50000
20	24,0	500	12000	5,00	60000
50	33,0	200	6600	12,50	82500
100	44,0	100	4400	25,00	110000
100	43,0	100	4300	25,00	107500
50	32,0	200	6400	12,50	80000
20	24,0	500	12000	5,00	60000
10	18,5	1000	18500	2,50	46250
5,0	13,5	2000	27000	1,25	33750
2,5	9,0	4000	36000	0,625	22500
1,0	5,5	10000	55000	0,25	13750
0,5	4,0	20000	80000	0,125	10000

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações.

Tabela 22 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 40°C e 75%UR por 7 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	6,5	20000	130000	0,125	16250
1,0	8,75	10000	87500	0,25	21875
2,5	13,75	4000	55000	0,625	34375
5,0	19,25	2000	38500	1,25	48125
10	24,25	1000	24250	2,50	60625
20	28,00	500	14000	5,00	70000
50	39,50	200	7900	12,50	98750
100	50,75	100	5075	25,00	126875
100	51,75	100	5175	25,00	129375
50	31,75	200	6350	12,50	79375
20	22,75	500	11375	5,00	56875
10	17,50	1000	17500	2,50	43750
5,0	13,5	2000	27000	1,25	33750
2,5	9,25	4000	37000	0,625	23125
1,0	6,00	10000	60000	0,25	15000
0,5	4,25	20000	85000	0,125	10625

Tabela 23 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 40°C e 75%UR por 7 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	6,75	20000	135000	0,125	16875
1,0	8,50	10000	85000	0,25	21250
2,5	13,25	4000	53000	0,625	33125
5,0	19,50	2000	39000	1,25	48750
10	25,75	1000	25750	2,50	64375
20	31,00	500	15500	5,00	77500
50	39,00	200	7800	12,50	97500
100	52,75	100	5275	25,00	131875
100	53,00	100	5300	25,00	132500
50	39,50	200	7900	12,50	98750
20	29,00	500	14500	5,00	72500
10	23,00	1000	23000	2,50	57500
5,0	17,00	2000	34000	1,25	42500
2,5	11,75	4000	47000	0,625	29375
1,0	7,25	10000	72500	0,25	18125
0,5	5,50	20000	110000	0,125	13750

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações.

Tabela 24 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 50°C e 90%UR por 7 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	3,25	20000	65000	0,125	8125
1,0	3,75	10000	37500	0,25	9375
2,5	5,75	4000	23000	0,625	14375
5,0	9,25	2000	18500	1,25	23125
10	12,0	1000	12000	2,50	30000
20	14,0	500	7000	5,00	35000
50	18,75	200	3750	12,50	46875
100	23,75	100	2375	25,00	59375
100	22,5	100	2250	25,00	56250
50	17,25	200	3450	12,50	43125
20	12,75	500	6375	5,00	31875
10	10,00	1000	10000	2,50	25000
5,0	7,75	2000	15500	1,25	19375
2,5	5,00	4000	20000	0,625	12500
1,0	3,00	10000	30000	0,25	7500
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000

Tabela 25 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 50°C e 90%UR por 7 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	2,75	20000	55000	0,125	6875
1,0	3,25	10000	32500	0,25	8125
2,5	5,50	4000	22000	0,625	13750
5,0	8,50	2000	17000	1,25	21250
10	10,25	1000	10250	2,50	25625
20	12,00	500	6000	5,00	30000
50	15,75	200	3150	12,50	39375
100	20,75	100	2075	25,00	51875
100	19,5	100	1950	25,00	48750
50	14,5	200	2900	12,50	36250
20	10,5	500	5250	5,00	26250
10	8,75	1000	8750	2,50	21875
5,0	6,50	2000	13000	1,25	16250
2,5	4,75	4000	19000	0,625	11875
1,0	3,00	10000	30000	0,25	7500
0,5	1,75	20000	35000	0,125	4375

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações.

Tabela 26 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 50°C e 90%UR por 14 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	2,75	20000	55000	0,125	6875
1,0	3,5	10000	35000	0,25	8750
2,5	6,5	4000	26000	0,625	16250
5,0	9,00	2000	18000	1,25	22500
10	10,00	1000	10000	2,50	25000
20	11,75	500	5875	5,00	29375
50	17,50	200	3500	12,50	43750
100	23,25	100	2325	25,00	58125
100	27,00	100	2700	25,00	67500
50	14,75	200	2950	12,50	36875
20	9,50	500	4750	5,00	23750
10	7,75	1000	7750	2,50	19375
5,0	6,25	2000	12500	1,25	15625
2,5	4,75	4000	19000	0,625	11875
1,0	2,50	10000	25000	0,25	6250
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000

Tabela 27 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 50°C e 90%UR por 14 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	3,25	20000	65000	0,125	8125
1,0	4,00	10000	40000	0,25	10000
2,5	7,00	4000	28000	0,625	17500
5,0	10,25	2000	20500	1,25	25625
10	12,00	1000	12000	2,50	30000
20	14,25	500	7125	5,00	35625
50	20,00	200	4000	12,50	50000
100	28,75	100	2875	25,00	71875
100	33,50	100	3350	25,00	83750
50	18,25	200	3650	12,50	45625
20	12,25	500	6125	5,00	30625
10	9,50	1000	9500	2,50	23750
5,0	7,75	2000	15500	1,25	19375
2,5	5,50	4000	22000	0,625	13750
1,0	3,50	10000	35000	0,25	8750
0,5	2,25	20000	45000	0,125	5625

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações.

Tabela 28 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 40°C e 75%UR por 28 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	7,00	20000	140000	0,125	17500
1,0	8,75	10000	87500	0,25	21875
2,5	13,75	4000	55000	0,625	34375
5,0	19,50	2000	39000	1,25	48750
10	27,75	1000	27750	2,50	69375
20	34,50	500	17250	5,00	86250
50	42,00	200	8400	12,50	105000
100	61,75	100	6175	25,00	154375
100	60,50	100	6050	25,00	151250
50	43,00	200	8600	12,50	107500
20	32,25	500	16125	5,00	80625
10	25,00	1000	25000	2,50	62500
5,0	18,25	2000	36500	1,25	45625
2,5	12,50	4000	50000	0,625	31250
1,0	7,75	10000	77500	0,25	19375
0,5	5,75	20000	115000	0,125	14375

Tabela 29 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 40°C e 75%UR por 28 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	7,25	20000	145000	0,125	18125
1,0	9,25	10000	92500	0,25	23125
2,5	14,75	4000	59000	0,625	36875
5,0	2075	2000	41500	1,25	51875
10	28,50	1000	28500	2,50	71250
20	34,00	500	17000	5,00	85000
50	42,50	200	8500	12,50	106250
100	56,00	100	5600	25,00	140000
100	56,25	100	5625	25,00	140625
50	41,75	200	8350	12,50	104375
20	30,00	500	15000	5,00	75000
10	23,00	1000	23000	2,50	57500
5,0	17,00	2000	34000	1,25	42500
2,5	11,75	4000	47000	0,625	29375
1,0	7,75	10000	77500	0,25	19375
0,5	5,50	20000	110000	0,125	13750

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Tabela 30 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 50°C e 90%UR por 28 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	2,25	20000	45000	0,125	5625
1,0	3,00	10000	30000	0,25	7500
2,5	4,75	4000	19000	0,625	11875
5,0	6,00	2000	12000	1,25	15000
10	8,00	1000	8000	2,50	20000
20	9,25	500	4625	5,00	23125
50	12,5	200	2500	12,50	31250
100	26,0	100	2600	25,00	65000
100	17,0	100	1700	25,00	42500
50	14,75	200	2950	12,50	36875
20	9,25	500	4625	5,00	23125
10	7,25	1000	7250	2,50	18125
5,0	4,75	2000	9500	1,25	11875
2,5	2,75	4000	11000	0,625	6875
1,0	1,75	10000	17500	0,25	4375
0,5	1,00	20000	20000	0,125	2500

Tabela 31 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 50°C e 90%UR por 28 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	3,50	20000	70000	0,125	8750
1,0	4,50	10000	45000	0,25	11250
2,5	6,25	4000	25000	0,625	15625
5,0	8,75	2000	17500	1,25	21875
10	13,25	1000	13250	2,50	33125
20	15,00	500	7500	5,00	37500
50	20,75	200	4150	12,50	51875
100	26,00	100	2600	25,00	65000
100	26,00	100	2600	25,00	65000
50	19,00	200	3800	12,50	47500
20	13,00	500	6500	5,00	32500
10	9,50	1000	9500	2,50	23750
5,0	6,25	2000	12500	1,25	15625
2,5	4,25	4000	17000	0,625	10625
1,0	2,75	10000	27500	0,25	6875
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000

*Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Tabela 32 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 10°C e por 30 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	5,00	20000	100000	0,125	12500
1,0	7,00	10000	70000	0,25	17500
2,5	10,5	4000	42000	0,625	26250
5,0	16,0	2000	32000	1,25	40000
10	26,0	1000	26000	2,50	65000
20	31,5	500	15750	5,00	78750
50	36,0	200	7200	12,50	90000
100	40,0	100	4000	25,00	100000
100	38,5	100	3850	25,00	96250
50	25,5	200	5100	12,50	63750
20	18,0	500	9000	5,00	45000
10	13,5	1000	13500	2,50	33750
5,0	10,0	2000	20000	1,25	25000
2,5	6,00	4000	24000	0,625	15000
1,0	4,00	10000	40000	0,25	10000
0,5	3,00	20000	60000	0,125	7500

Tabela 33 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 10°C por 30 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	5,00	20000	100000	0,125	12500
1,0	6,50	10000	65000	0,25	16250
2,5	10,0	4000	40000	0,625	25000
5,0	14,5	2000	29000	1,25	36250
10	23,5	1000	23500	2,50	58750
20	25,5	500	12750	5,00	63750
50	35,5	200	7100	12,50	88750
100	46,0	100	4600	25,00	115000
100	42,5	100	4250	25,00	106250
50	31,5	200	6300	12,50	78750
20	22,0	500	11000	5,00	55000
10	16,5	1000	16500	2,50	41250
5,0	12,0	2000	24000	1,25	30000
2,5	7,50	4000	30000	0,625	18750
1,0	5,00	10000	50000	0,25	12500
0,5	3,50	20000	70000	0,125	8750

*Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Tabela 34 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 50°C por 42 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	3,00	20000	60000	0,125	7500
1,0	4,00	10000	40000	0,25	10000
2,5	5,50	4000	22000	0,625	13750
5,0	8,00	2000	16000	1,25	20000
10	11,5	1000	11500	2,50	28750
20	12,0	500	6000	5,00	30000
50	14,5	200	2900	12,50	36250
100	19,0	100	1900	25,00	47500
100	17,5	100	1750	25,00	43750
50	13,5	200	2700	12,50	33750
20	10,0	500	5000	5,00	25000
10	8,00	1000	8000	2,50	20000
5,0	5,5	2000	11000	1,25	13750
2,5	4,00	4000	16000	0,625	10000
1,0	2,50	10000	25000	0,25	6250
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000

Tabela 35 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 50°C por 42 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000
1,0	3,00	10000	30000	0,25	7500
2,5	5,00	4000	20000	0,625	12500
5,0	7,00	2000	14000	1,25	17500
10	9,00	1000	9000	2,50	22500
20	9,50	500	4750	5,00	23750
50	16,0	200	3200	12,50	40000
100	22,5	100	2250	25,00	56250
100	18,0	100	1800	25,00	45000
50	14,0	200	2800	12,50	35000
20	8,00	500	4000	5,00	20000
10	6,50	1000	6500	2,50	16250
5,0	4,00	2000	8000	1,25	10000
2,5	3,50	4000	14000	0,625	8750
1,0	1,50	10000	15000	0,25	3750
0,5	1,00	20000	20000	0,125	2500

*Os resultados obtidos representam a média de duas determinações.

Tabela 36 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 10°C por 60 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	7,00	20000	140000	0,125	17500
1,0	8,50	10000	85000	0,25	21250
2,5	13,0	4000	52000	0,625	32500
5,0	18,5	2000	37000	1,25	46250
10	26,5	1000	26500	2,50	66250
20	33,0	500	16500	5,00	82500
50	43,0	200	8600	12,50	107500
100	60,0	100	6000	25,00	150000
100	55,5	100	5550	25,00	138750
50	41,0	200	8200	12,50	102500
20	28,5	500	14250	5,00	71250
10	22,0	1000	22000	2,50	55000
5,0	15,5	2000	31000	1,25	38750
2,5	10,0	4000	40000	0,625	25000
1,0	6,00	10000	60000	0,25	15000
0,5	4,50	20000	90000	0,125	11250

Tabela 37 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 10°C por 60 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	6,00	20000	140000	0,125	15000
1,0	8,50	10000	85000	0,25	21250
2,5	13,0	4000	52000	0,625	32500
5,0	19,0	2000	37000	1,25	47500
10	26,0	1000	26500	2,50	65000
20	30,5	500	16500	5,00	76250
50	43,5	200	8600	12,50	109375
100	53,0	100	5300	25,00	132500
100	54,5	100	6000	25,00	136250
50	37,5	200	8200	12,50	93750
20	27,0	500	14250	5,00	67500
10	21,0	1000	22000	2,50	52500
5,0	15,5	2000	31000	1,25	38750
2,5	10,0	4000	40000	0,625	25000
1,0	6,00	10000	60000	0,25	15000
0,5	4,50	20000	90000	0,125	11250

*Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Tabela 38 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 40°C por 63 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	8,00	20000	160000	0,125	20000
1,0	10,0	10000	100000	0,25	25000
2,5	15,0	4000	60000	0,625	37500
5,0	21,5	2000	43000	1,25	53750
10	31,0	1000	31000	2,50	77500
20	39,5	500	19750	5,00	98750
50	48,0	200	9600	12,50	120000
100	69,0	100	6900	25,00	172500
100	70,5	100	7050	25,00	176250
50	43,5	200	8700	12,50	108750
20	35,0	500	17500	5,00	87500
10	26,0	1000	26000	2,50	65000
5,0	18,5	2000	37000	1,25	46250
2,5	13,0	4000	52000	0,625	32500
1,0	8,00	10000	80000	0,25	20000
0,5	6,00	20000	120000	0,125	15000

Tabela 39 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 40°C por 63 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	7,50	20000	150000	0,125	18750
1,0	9,50	10000	95000	0,25	23750
2,5	14,5	4000	58000	0,625	36250
5,0	20,5	2000	41000	1,25	51250
10	27,0	1000	27000	2,50	67500
20	36,0	500	18000	5,00	90000
50	45,5	200	9100	12,50	113750
100	62,0	100	6200	25,00	155000
100	61,0	100	6100	25,00	152500
50	42,0	200	8400	12,50	105000
20	34,0	500	17000	5,00	85000
10	25,0	1000	25000	2,50	62500
5,0	17,5	2000	35000	1,25	43750
2,5	12,0	4000	48000	0,625	30000
1,0	7,50	10000	75000	0,25	18750
0,5	5,50	20000	110000	0,125	13750

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Tabela 40 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de vidro e armazenadas a 50°C por 63 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000
1,0	3,50	10000	35000	0,25	8750
2,5	4,50	4000	18000	0,625	11250
5,0	6,00	2000	12000	1,25	15000
10	8,00	1000	8000	2,50	20000
20	12,5	500	6250	5,00	31250
50	19,0	200	3800	12,50	47500
100	24,0	100	2400	25,00	60000
100	24,5	100	2450	25,00	61250
50	18,5	200	3700	12,50	46250
20	10,0	500	5000	5,00	25000
10	7,00	1000	7000	2,50	17500
5,0	5,00	2000	10000	1,25	12500
2,5	4,00	4000	16000	0,625	10000
1,0	3,00	10000	30000	0,25	7500
0,5	2,00	20000	40000	0,125	5000

Tabela 41 Resultados reológicos das amostras de creme embaladas em frascos de plástico e armazenadas a 50°C por 63 dias.

Velocidade (rpm)	Torque*	Fator	Viscosidade (cps)*	Gradiente de velocidade(1/s)	Força de cisalhamento (N/m ²)
0,5	3,50	20000	70000	0,125	8750
1,0	4,00	10000	40000	0,25	10000
2,5	6,00	4000	24000	0,625	15000
5,0	6,50	2000	13000	1,25	16250
10	9,50	1000	9500	2,50	23750
20	12,0	500	6000	5,00	30000
50	20,0	200	4000	12,50	50000
100	25,0	100	2500	25,00	62500
100	27,5	100	2750	25,00	68750
50	21,5	200	4300	12,50	53750
20	14,0	500	7000	5,00	35000
10	9,00	1000	9000	2,50	22500
5,0	6,50	2000	13000	1,25	16250
2,5	5,00	4000	20000	0,625	12500
1,0	3,50	10000	35000	0,25	8750
0,5	2,50	20000	50000	0,125	6250

* Os resultados obtidos representam a média de duas determinações

Figura 19 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 10°C . Embalagem de vidro

Figura 20 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 10°C . Embalagem de plástico.

Figura 21 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 40°C e 75% UR. Embalagem de vidro.

Figura 22 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 40°C e 75% UR. Embalagem de plástico.

Figura 23 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenada a 50°C e 90% UR. Embalagem de vidro.

Figura 24 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 50°C e 90% UR. Embalagem de plástico.

Figura 25 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetonaazol armazenado a 10°C. Embalagem de vidro.

Figura 26 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetonaazol armazenado a 10°C. Embalagem de plástico.

Figura 27 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 40°C e 75% UR. Embalagem de vidro.

Figura 28 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 40°C e 75% UR. Embalagem de plástico.

Figura 29 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenada a 50°C e 90% UR. Embalagem de vidro.

Figura 30 Representação gráfica das medidas reológicas do creme com cetozonazol armazenado a 50°C e 90% UR. Embalagem de plástico.

6 DISCUSSÃO

O cetoconazol é um derivado imidazólico com propriedades antifúngicas, encontrado no mercado brasileiro nas formas farmacêuticas comprimido, creme e xampu. O cetoconazol apresenta como efeito colateral a hepatotoxicidade ^{82;96}. Com o surgimento de novos antifúngicos menos tóxicos, o cetoconazol vem sendo substituído, principalmente na forma de comprimidos, pelos derivados menos tóxicos. Entretanto outras formas farmacêuticas como creme, tem seu uso aumentado ^{31;56;71;72;82;85} e já a forma farmacêutica xampu, vem sendo muito utilizada no auxílio ao combate a caspa ⁴⁴.

A matéria-prima cetoconazol utilizada na preparação dos cremes foi devidamente identificada através dos testes de identificação recomendados pelas Farmacopéia Americana 24ed., Farmacopéia Britânica e CLARKE'S ^{06,11, 98}.

O ponto de fusão estava dentro da faixa de fusão indicada na literatura.

No teste de identificação por cromatografia em camada delgada, foram utilizadas matérias-primas cetoconazol de três laboratórios diferentes, e comparadas com amostra do padrão de cetoconazol, sua coloração e seus Rfs coincidiram.

O espectro na região do infravermelho da amostra de cetoconazol foi condizente com o espectro encontrado na literatura ¹¹.

A análise térmica da amostra de cetoconazol foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica e a pureza do cetoconazol matéria-prima. A análise térmica inclui todos os métodos em que uma propriedade física de certa substância é medida em função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a um aumento programado de temperatura ⁴³.

Na curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) pode-se observar um pico endotérmico com temperatura em torno de 149 a 152°C e ΔH em torno de 104 a 114J/g que ocorre numa faixa de temperatura em que a curva de termogravimetria(TG)e sua derivada (DTG) não mostram perda de massa. Este evento é característico da fusão da substância, e os dados termoanalíticos são concordantes com àqueles da literatura⁹⁸ que indicam faixa de fusão de 148 - 152°C para o cetoconazol. Aproximadamente à 350°C o material fundido é volatilizado , a perda de massa é evidenciada na curva TG(entre 310 - 400°C).

A curva TG/DTG evidencia que o cetoconazol é termoe estável até 300°C e apresenta perda de massa entre 300 e 400°C.

Através desses resultados verifica-se, que o cetoconazol matéria-prima é um produto muito estável, sem considerá-lo dentro de uma formulação.

Para avaliação da estabilidade de formulações contendo cetoconazol, foram preparadas oito formulações na forma de creme com cetoconazol a 2% e submetidas a diferentes condições de armazenamento. Procurou-se utilizar os mesmos componentes de formulações preparadas no comércio. Inicialmente desenvolveu-se a **Formulação 1**, que após duas semanas em estufa a 50°C e 45 dias em estufa a 40°C, mostrou coloração rósea.

Na **Formulação 2**, com o objetivo de melhorar a solubilidade do cetoconazol para incorporá-lo na formulação, dissolveu-se o cetoconazol em ácido cítrico e corrigiu-se o pH da formulação com trietanolamina, mas em uma semana os cremes apresentaram coloração rósea; somente o creme que estava armazenado a temperatura de 10°C, não sofreu alteração de cor.

Resolveu-se testar a **Formulação 3**. Acrescentou-se à formulação mais um conservante(Merguard 1200®), um antioxidante(B.H.T.) e um quelante(EDTA), todos com a finalidade de melhorar a estabilidade da formulação. Com uma semana armazenados em estufa a 50°C, mostraram coloração marrom.

Após esses testes, resolveu-se mudar a base emulsionante Polawax® para Lanette®; A **Formulação 4** foi submetida a diferentes estudos, para observar mudanças físicas, na tentativa de utilizar-se esse creme base. Depois de 7 dias em estufa, o creme mudou para a coloração rósea. Devido à essas mudanças de coloração, testou-se os componentes em estufa a 50°C, separadamente com cetoconazol, para verificar se há interação entre o cetoconazol e algum componente. Preparou-se também as formulações **4A, 4B** e **4C** para observar possíveis alterações devido a presença de conservantes, antioxidante e quelante. Primeiramente obteve-se uma formulação idêntica a **4**, depois uma formulação sem o uso de conservantes(Nipagin® e Nipazol®)**4A**, outra formulação sem o uso de antioxidante(B.H.T.) e quelante(EDTA) **4B** e por último uma formulação isenta de conservantes, antioxidantes e quelantes denominada **4C**. Essas formulações foram armazenadas em estufa a 50°C por um mês. A formulação **4B** mostrou coloração rósea, indicando uma possível interação entre o cetoconazol e os conservantes utilizados.

Na **Formulação 5**, retirou-se os conservantes Nipagin® e Nipazol® e se utilizou o conservante Merguard 1200®. Após uma semana em estufa a 50°C, adquiriu coloração amarela.

Todos os componentes utilizados no preparo dessas formulações foram pesados e colocados em frascos individualmente com cetoconazol, nas mesmas concentrações usadas no preparo da formulação. Esses frascos contendo cada um dos componentes individualmente com cetoconazol, foram submetidos a uma temperatura de 50°C, também por 1 mês. Os frascos contendo cetoconazol, Nipagin® e Nipazol® adquiriram coloração rósea e os frascos contendo cetoconazol e Merguard 1200® coloração marrom.

A partir desses resultados, verificou-se que a coloração rósea pode ser devido a uma possível interação do cetoconazol com os conservantes Nipagin® e Nipazol® a altas temperaturas. A coloração marrom e amarela pode ser devido a presença do conservante Merguard 1200®, que é muito volátil e não suporta as temperaturas das estufas usadas nesse estudo.

Dentre as formulações **6**, **7** e **8**, nenhuma sofreu alteração de cor . Como um dos objetivos desse trabalho é a obtenção de uma formulação estável, estas três formulações mostraram-se mais adequadas, porque além de não sofrerem alteração de cor a altas temperaturas, possuem conservantes que são compatíveis com todos os componentes, e os agentes antioxidante e quelante estão em concentrações indicadas pela literatura⁷⁵, garantindo proteção antimicrobiana e antioxidante.

As amostras **1**, **2**, **3**, **4** e **5** foram armazenadas nas temperaturas: ambiente, 10,35,40 e 50°C por 60 dias. Já as amostras **4A**, **4B**, **4C**, **6**, **7** e **8** foram submetidas a temperatura de 50°C por até 1 mês^{62;83}.

Todos os testes com as formulações **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **4A**, **4B** e **4C**(descritas em Material e Método item 4.1.5) e com os componentes separados, foram realizados em frascos plásticos e frascos de vidro, não havendo nenhuma diferença nos resultados.

Após a realização destes testes com todas as amostras, a formulação escolhida foi a **6**, pois todos os seus componentes são facilmente encontrados e aceitos no mercado e não sofreram alterações nos testes realizados.

Na tentativa de padronizar uma metodologia para analisar as formulações contendo cetoconazol, foram utilizados os métodos espectrofotométricos no ultravioleta(UV) direto e derivada e a cromatografia líquida de alta eficiência(CLAÉ).

Foram testados em espectrofotometria direto e derivada no UV os solventes ácido clorídrico 1mol/L; 0,1mol/L e 0,01mol/L; etanol e metanol para a análise do creme contendo cetoconazol. O solvente ácido clorídrico 0,01mol/L proporcionou bons resultados para a análise do cetoconazol matéria-prima em espectrofotometria derivada no UV no λ 218,5 nm e a 269nm em espectrofotometria direta. Para a análise do creme com cetoconazol utilizando-se essa metodologia, os resultados indicaram interferência dos excipientes nesses picos de absorção.

Com o solvente etanol os resultados foram insatisfatórios, pois não obteve-se bons picos de absorção, descartando-se seu uso para a análise do creme com cetoconazol.

O solvente metanol foi utilizado para a padronização do método espectrofotométrico, apresentando melhores resultados com a derivada de 1ª ordem do que com o método direto, por isso essa foi a metodologia escolhida. Estabeleceram-se os seguintes parâmetros: intervalo de leitura dos espectros de absorção: 211 – 295 nm; λ máximo 257 nm; velocidade de varredura dos espectros de absorção: 300 nm/min; solvente: metanol para cromatografia; cubeta de quartzo de 1 cm; assentamento das ordenadas: $\pm 0,500$; delta lambda ($\Delta\lambda$): 2 nm; método quantitativo: zero – pico; ordem da derivada: 1ª. Construiu-se a curva de calibração nas concentrações 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$. Não houve interferência dos excipientes, mostrando que o solvente metanol realiza uma boa extração do cetoconazol nessa formulação. Esse método mostrou bons resultados de precisão e exatidão, através dos resultados de desvio padrão relativo (RSD) e do teste de recuperação. Foram realizados testes com amostras comercial e simulada. O coeficiente de correlação linear foi de 0,9997, o percentual de recuperação foi de 100,24%. A média do desvio padrão relativo foi de 0,56% para a amostra simulada e 0,41% para a amostra comercial.

A análise do cetoconazol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi realizada de acordo com a técnica descrita na Farmacopéia Americana 24ª edição com algumas modificações. Os parâmetros foram: mistura de trietilamina (substituindo a diisopropilamina preconizada pela Farmacopéia Americana) em metanol (1:500) e solução de acetato de amônio em água (1:200) na proporção de 7:3 como fase móvel; coluna Nova Pack C18® 300 x 3,9mm; detecção no UV a 225nm. Não foi possível obter a vazão recomendada pela Farmacopéia Americana que é de 3mL/min, o equipamento utilizado foi compatível com vazão de 0,55mL/min. Foi preparada uma solução de cetoconazol a 20 $\mu\text{g/mL}$ em diclorometano e metanol (1:1), obtendo-se um cromatograma para o cetoconazol com tempo de retenção muito alto, cerca de 24 min, o que inviabilizou esse sistema.

Com a fase móvel recomendada pela Farmacopéia Americana diisopropilamina em metanol (1:500) acetato de amônio em água(1:200), na proporção 7:3, obteve-se tempo de retenção em torno de 9 min para o cetoconazol e 15 min para o padrão interno terconazol. Alterando-se a proporção dessa fase móvel para 8:2, obteve-se melhores tempos de retenção para o cetoconazol e terconazol.

O metanol apresentou melhores resultados de precisão e exatidão, quando comparado com o ácido clorídrico, por isso foi escolhido como o solvente para a extração do creme.

As duas fases móveis testadas podem ser empregadas na aplicação da metodologia, mas para a realização desse trabalho, foi utilizada a fase móvel[mistura de trietilamina em metanol 1:500 em solução de acetato de amônio em água 1:200(75:25)], pois a trietilamina é um produto mais acessível do que a diisopropilamina. Os resultados obtidos foram: coeficiente de correlação linear = 0,9981, percentual de recuperação = 100,88%, média do desvio padrão =2,13% para a amostra simulada e 1,25% para a amostra comercial.

Portanto as duas metodologias analíticas: espectrofotometria derivada no UV e cromatografia líquida de alta eficiência podem ser utilizadas para a determinação do teor de cetoconazol em creme.

A estabilidade do cetoconazol é um assunto que tem sido discutido por diversos autores. SKIBA e colaboradores⁸⁷ avaliaram a estabilidade do cetoconazol em formulações aquosas, em função do pH e da concentração do antioxidante butilidroxidotolueno(BHT), e verificaram que a formulação mais estável apresentou pH 7 e 0,1% de BHT e seu tempo de prateleira foi estipulado em 15 meses.

Na formulação estudada no presente trabalho, o pH é 5,6 e a concentração de BHT é de 0,05%, mas são utilizados conservante imidazolidiniluréia e quelante EDTA, o que pode aumentar a estabilidade química e microbiológica da formulação.

Em outra pesquisa, realizada por KUMER e colaboradores⁵², foi estudada a estabilidade do cetoconazol em soluções etanólicas. As soluções foram armazenadas em frascos de vidro transparente e âmbar, ambos em temperatura ambiente e a 8°C por 29 dias. As amostras foram avaliadas pela cromatografia líquida de alta eficiência. Durante esse período não houve diminuição significativa na concentração de cetoconazol.

Outro estudo de estabilidade utilizando cetoconazol foi realizado por ALLEN E ERICKSON III⁰². Foram preparadas soluções de cetoconazol a 20mg/mL em solução de uma mistura 1:1 de Ora-Sweet e Ora-Plus e xarope de cereja. Essas soluções foram armazenadas a 5°C e 25°C, ao abrigo da luz, durante 60 dias e analisadas por CLAE. Estas soluções também se mostraram estáveis.

No presente trabalho, visando avaliar a estabilidade física do creme, que é uma emulsão O/A, foram feitas análises reológicas das amostras, mostrando que essa formulação tem comportamento não-newtoniano pseudoplástico, pois de acordo com as análises representadas graficamente, a viscosidade diminui com o aumento do gradiente de velocidade, em todas as amostras. Não houve diferença significativa na viscosidade em relação às amostras armazenadas em frasco de plástico e frasco de vidro.

A tixotropia das amostras a 48 horas permaneceu praticamente a mesma, verificando-se que essas amostras tem a capacidade de recuperar sua estrutura após determinado período de tempo. As amostras armazenadas a 10°C e 40°C tiveram um pequeno aumento na tixotropia, comparando-se com as amostras de 48 horas, e as amostras a 50°C, tiveram uma diminuição na tixotropia. Observando-se os gráficos de reologia(**Figuras 19 a 24**) pode-se verificar que as amostras analisadas no período de 7 dias até 63 dias , já não apresentaram grande diferença nos valores de tixotropia, isso provavelmente deve-se a uma maturação da formulação.

Analisando os resultados reológicos através das **Tabelas 19 a 41**, verificou-se uma variação da viscosidade entre as amostras armazenadas

10°C, 40°C – 75%U.R. e 50°C – 90% U.R.. As amostras armazenadas a 10°C tiveram um pequeno aumento na viscosidade após 60 dias. As amostras armazenadas a 40°C – 75%U.R. tiveram um aumento da viscosidade em relação ao tempo de armazenamento, já as amostras a 50°C – 90% U.R. sofreram uma diminuição na viscosidade, comparando-se com as amostras iniciais.

As características organolépticas cor e odor, foram mantidas iguais aos resultados iniciais, o odor da emulsão é característico e a cor branca. A aparência das amostras armazenadas a 10°C e 40°C não foi alterada, mas as amostras armazenadas a 50°C por 42 dias começaram a se liqüefazerem e àquelas a 50°C por 63 dias tornaram-se totalmente líquidas.

O pH de todas as amostras não teve alteração significativa, mantendo-se numa faixa de 5,3 a 5,8.

Os resultados obtidos através dos estudos de estabilidade física, mostraram que não houve diferença significativa entre as amostras armazenadas em frascos de plástico e frascos de vidro, porém pode-se considerar que os frascos de vidro suportam condições mais drásticas de temperatura e umidade, pois alguns frascos de plásticos armazenados a 50°C – 90% U.R., sofreram rachaduras.

7 CONCLUSÕES

- O cetoconazol matéria-prima foi devidamente identificado pelos métodos indicados pelas Farmacopéias Americana e Britânica;
- De acordo com as curvas de DSC e TG/DTG o cetoconazol matéria-prima é um produto estável até cerca de 300°C;
- Formulações farmacêuticas creme contendo cetoconazol na presença de conservantes metilparabeno, propilparabeno apresentam coloração rósea e de metildibromoglutaronitril e fenoxietanol coloração marrom a altas temperaturas;
- A **Formulação 6** apresentou boa aparência, cor e odor característicos. Manteve-se na mesma faixa de pH, quando submetida a diferentes condições de armazenamento;
- A **Formulação 6** após ter sido submetida a diferentes condições de armazenamento apresentou comportamento pseudoplástico e tixotropia, o que foi verificado através dos resultados de reologia;
- A espectrofotometria derivada no UV de primeira ordem mostrou precisão, exatidão, especificidade e linearidade pelos resultados de desvio padrão relativo, teor de recuperação, interferência do placebo e coeficiente de correlação linear;

- A CLAE através dos resultados de desvio padrão relativo, teor de recuperação, interferência do placebo e coeficiente de correlação linear também apresentou precisão, exatidão, especificidade e linearidade
- As duas metodologias podem ser utilizadas para análise de cetoconazol em creme a 2%.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 01.ABOUNASSIF, M.A., EL-SHAZLY, B.E.D.M. D₁-differential potentiometric and ¹H-NMR spectrometric determinations of ketoconazole and its formulations. Anal. Lett., New York, v.22, n.10, p.2233-2247, 1989.
- 02.ALLEN Jr., L.V., ERICKSON III, M.A. Stability of ketoconazole, metolazone, metronidazole, procainamide hydrochloride, and spironolactone in extemporaneously compounded oral liquids. Am. J. Health-Syst. Pharm., Bethesda, v.53, p.2073-2078, 1996.
- 03.ARRANZ, A., ECHEVARRIA, C., MOREDA, J.A., CID, A., ARRANZ, J.F. Capillary zone electrophoretic separation and determination of imidazolic antifungal drugs. J. Chromatogr., A, Amsterdam, v.871, p.399-402, 2000.
- 04.AZULAY, D.R. Micoses superficiais. Rev. Bras. Med., São Paulo, v.44, n.10, p.5-16, 1987.

*Referências de acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas(ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index(CASSI)2000.

- 05.BARCHIESI, F., FOTHERGILL, A.W., DI FRANCESCO, L.F., CASELLI, F., RINALDI, MG., SCALISE, G. *In vitro* activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.44, n.1, p.226-229, 2000.
06. BRITISH Pharmacopeia 1993: addendum 1996. London: Her Majesty's Stationary Office, 1996. p.1561-1562.
- 07.CARSTENSEN, J.T. Drug stability: principles and practices. New York: Marcel Dekker,1990. 520p.
- 08.CHAPMAN, D.R., BAUER, L. Synthesis of diastereomeric ketoconazole analogs [1]. J. Heterocycl. Chem., Odessa, v.27, p.2063-2068, 1990.
- 09.CHAVEZ, M., BERNAL, S., VALVERDE, A., GUTIERREZ, M.J., QUINDOS, G., MAZUELOS, E.M. *In vitro* activity of voriconazole (UK-109, 496), LY303366 and other antifungal agents against oral *Candida* spp isolates from HIV-infected patients. J. Antimicrob. Chemother., Oxford, v.44, n.5, p.697-700, 1999.
10. CHAFETZ, L. Stability indicating assay methods for drugs and their dosage forms. J. Pharm. Sci., New York, v.60, n.3, p.335-345, 1971.
- 11.CLARKE, E.C.G. Isolation and identification of drugs. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.696-697.
- 12.CONNORS, K.A., AMIDON, G.L., STELLA, V.L. Chemical stability of pharmaceuticals a handbook for pharmacists. New York: John Wiley, 1986. 847p.

13. CRISTIANI, T. Experience with the combination of an anti-inflammatory steroid, an antibacterial agent and an antimycotic agent in the topical treatment of skin diseases of various origins. Curr. Ther. Res., Belle Mead, v.37, n.2, p.225-229, 1985.

14. DAS, S.K. Rapid identification and quantification of clotrimazole, miconazole and ketoconazole in pharmaceuticals creams and ointments by thin-layer chromatography-densitometry. J. AOAC Int., Gaithersburg, v.79, n.3, p.656-659, 1996.

15. DE LUNARDO, M.C., MUZARD, G., GUERIN, V., THOMAS, J.L. Pharmacokinetic characteristics of a new antifungal imidazole: sertaconazole nitrato. J. Mycol. Med., Paris, v.9, n.3, p.137-142, 1999.

16. DEF 96/97: dicionário de especialidades farmacêuticas. 25.ed. Rio de Janeiro: Publicações Médicas, 1996. p.271.

17. DEF 99/2000: dicionário de especialidades farmacêuticas. 28.ed. Rio de Janeiro: EPUC, 1999. p.275-277.

18. DONADINI, A., BERARDESCA, E. Clinical trial with an extempore combination of sodium fusidate, ketoconazole and clobetasone butyrate in the treatment of a variety of skin diseases Curr. Ther. Res., Belle Mead, v.37, n.2, p.241-247, 1985.

- 19.EL-SHABOURI, S.R., EMARA, K.M., KASHABA, P.Y., MOHAMED, A.M.
Charge-transfer complexation for spectrophotometric assay of certain
Imidazole antifungal drugs. Anal. Lett., New York, v.31, n.8, p.1367-
1385, 1998.
- 20.EL-SHANAWANY, A.A., EL-BAYOUMI, A., EL-SADEK, M.E., EL-
SATTAR, A.A. Synchronous spectrofluorimetric determination of
famotidine, fluconazole and ketoconazole in bulk powder and in
pharmaceutical dosage forms. Spectrosc. Lett., New York, v.30, n.1,
p.25-46, 1997.
- 21.FARR, P.M., SHUSTER, S. Treatment of seborrhoeic dermatitis with
topical ketoconazole, Lancet, London, v.2, n.8414, p.1271-1272, 1984.
[Letter].
- 22.FROMTLING, R.A. Advances in antifungal chemotherapy. Drug News &
Perspect., Barcelona, v.11, n.9, p.582-595, 1998.
- 23.FROMTLING, R.A. Imidazoles as medically important antifungal agents:
an overview, Actual. Med., Granada, v.20, n.7, p.325-349, 1984.
- 24.FUNGAEMIA. Lancet, London, v.2, n.8345, p.323, 1983. [Letter].
- 25.GARRET, R.E. Stability of oil - in - water emulsions. J. Pharm. Sci., New
York, v.154, n.11, p.1557-1570, 1965.
- 26.GOLD, W., STOUT, H.A., PAGANO, J.F., DONOVICK, R. Amphotericins
A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. Antibiot.
Annu., New York, p.579-586, 1955/1956.

- 27.GOODMAN, L.S., GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.637-639, 708, 799-805.
- 28.GRAYBILL, J.R., CRAVEN, P.C. Antifungal agents used in systemic mycoses: activity and therapeutic use. Drugs, Auckland, v.25, p.41-62, 1983.
- 29.GRAYBILL, J.R., DRUTZ, D.J. Ketoconazole: a major innovation for treatment of fungal disease. Ann. Intern. Med., Philadelphia, v.93, n.6, p.920-923, 1980.
- 30.GREEN, C.A., FARR, P.M., SHUSTER, S. Treatment of seborrhoeic dermatitis with ketoconazole. II. Response of seborrhoeic dermatitis of the face, scalp and trunk to topical ketoconazole. Br. J. Dermatol., Oxford, v.116, p.217-221, 1987.
- 31.GREER, D.L. Topical treatment for mocassi-type tinea pedis. J. Am. Acad. Dermatol., Saint Louis, v.16, n.3., p.554-558, 1987.
- 32.GRIMM, W. Extension of the Internacional Conference on Harmonization Tripartite Guideline for Stability Testing of new drug substances and products to countries of climatic zones III and IV. Drug Dev. Ind. Pharm., New York, v.24, n.4, p.313-325, 1998.
- 33.GRIMM, W., KARL, T. Stability testing of drug products: scientific criteries, guidelines and official state requirements in Europe, Japan and USA. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1987. 238p.

34. GRIMM, W. Storage conditions for stability testing: long term testing and stress tests (part 1) Drugs Made Ger., Aulendorf, v.28, p.196-202, 1985.
35. GRIMM, W. Storage conditions for stability testing: long term testing and stress tests (part 2) Drugs Made Ger., Aulendorf, v.29, p.39-47, 1986.
36. HANZEN, E.L., BROWN, R. Two antifungal agents produced by a soil actinomycetes. Science, Washington, v.112, n.2911, p.243, 1950.
37. HARTMANN, V., KRUMMEN, G., SCHNABEL, G., BETHKE, H. Techniques of stability testing and shelf-life predictions. Pharm. Ind., Aulendorf, v.44, n.1, p.71-79, 1982.
38. HEERES, J., BACKX, L.J.J., MOSTMANS, J.H., VAN CUTSEM, J. Antimycotic: imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. J. Med. Chem., Columbus, v.22, n.8, p.1003-1005, 1979.
39. HEIDELBERG, C., DUSCHINSKY, R. 5-fluorouracil. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.52, abstr. n.2100, 1958.
40. HORI, K., SAKAGUCHI, A., KUDOH, M., ISHIDA, K., AOYAMA, Y., YOSHIDA, Y. Structure-activity relationships of a new antifungal imidazole, AFK-108, and related compounds. Chem. Pharm. Bull., Tokyo, v.48, n.1, p.60-64, 2000.
41. ICH Q2b. Text on validation of analytical procedure: methodology. Disponível em < [http : // www.ich.org](http://www.ich.org) > Acesso em 20 mar.1994.

- 42.IDSON, B. Stability testing of emulsions. Drug Cosmet. Ind., Cleveland, v.143, p.35-38, 1988.
- 43.IONASHIRO, M., GIOLITO, I. A nomenclatura em análise térmica. Parte II. Cerâmica (Florence), Milan, v.34, n.225, p.163-164, 1988.
- 44.JASS, H.E. OTC drugs products for the control of dandruff, seborrheic dermatitis and psoriasis. Cosmet. Toiletries, Carol Stream, v.98, n.2, p.64-69, 1983.
- 45.JAWETZ, P.A., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A. Microbiologia médica. 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.264-284.
46. KALLIOINEN, S., HELENIUS, K., YLIRUUSI, J. Influence of storage time and temperature on the stability of some emulsions creams. Pharmazie, Eschborn, v.49, p.500-504, 1994.
- 47.KATSAMBAS, A., ANTONIOU, CH., FRANGOULI, E., AVGERINO, G., MICHAILIDIS, D., STRATIGOS, J. A double-blind trial of treatment of seborrhoeic dermatitis with 2% ketoconazole cream compared with 1% hydrocortisone cream. Br. J. Dermatol., Oxford, v.121, p.353-357, 1989.
- 48.KEDOR-HACKMANN, E.R.M., NERY, M.M.F., SANTORO, M.I.R.M. Determination of ketoconazole in pharmaceuticals preparations by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography. Anal. Lett. New York, v.27, n.2, p.363-376, 1994.
- 49.KLEIN, K. Improving emulsions stability. Cosmet. Toiletries, Carol Stream, v.99, n.3, p.121-126, 1984.

- 50.KOROLKOVAS, A. Dicionário terapêutico Guanabara: 1998-1999. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.18.17-18.18.
- 51.KOROLKOVAS, A. Essentials of medicinal chemistry. 2.ed. New York: Willey, 1988. p.680-699.
52. KUMER, K.P., OKONOMAH, A.D., BRADSHAW, W.G., SOLIMAN, K.F.A. Stability of ketoconazole in ethanolic solutions. Drug. Dev. Ind. Pharm., New York, v.17, n.4, p.577-580, 1991.
- 53.LABA, D. The flow of cosmetics and toiletries. In: LABA, D., ed. Rheological properties of cosmetics and toiletries. New York: Marcel Dekker, 1993. p.1-8. (Cosmetic science and thecnology series, v.13).
- 54.LACAZ, C.S. Infecções por agentes oportunistas. São Paulo: Edgard Blücher: Edusp, 1977. p.83-102.
- 55.LACAZ, C.S. Micologia médica. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 1977. p.421-423.
- 56.LESTER, M. Ketoconazole 2 percent cream in the treatment of *Tinea pedis*, *Tinea cruris*, and *Tinea corporis*. Cutis, New Jersey, v.55, p.181-183, 1995.
57. LOW, A.S., WANGBOONSKUL, J. An HPLC assay for the determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations. Analyst, Cambridge, v.124, p.1589-1593, 1999.
- 58.MAIA CAMPOS, P.M.B.G., GONÇALVES, E.M.B. Formulário dermocosmético 1. São Paulo: Tecnopress, 1995. p.52-53.

59. MAIA CAMPOS, P.M.B.G., BONTEMPO, E.M.B.G., LEONARDI, G.R. Formulário dermocosmético 2. São Paulo: Tecnopress, 1999. p.54, 82, 113, 133, 135.
60. MAJUMDAR, T.D. Discussions on an ideal fungicide and report on the clinical trial with a new antimycotic drug. Curr. Med. Pract., Bombay, v.14, p.2-6, 1970.
61. MARTIN, A. Kinetics. In : MARTIN, A. Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.284-323.
62. MINER, P.E. Emulsion rheology: creams and lotions. In: LABA, D., ed. Rheological properties of cosmetics and toiletries. New York: Marcel Dekker, 1993. p.313-370. (Cosmetics science and technology series, v.13)
63. MIYAZAKI ET AL. Tolnaftato. U.S.Pat.3.334.126. 1967. Apud: Merck Index. 11.ed. Rahway: Merck, 1989. p.1499.
64. MOLLICA, J.A., AHUJA, S., COHEN, J. Stability of pharmaceuticals. J. Pharm. Sci., New York, v.67, n.4, p.443-465, 1978.
65. MORETTO, L.D. Estabilidade de produtos farmacêuticos: de acordo com resolução GMC 53/96 do Mercosul. São Paulo: SINDUSFARM, 1997. 7p. [Palestra]
66. NAË, H.D. Introduction to rheology. In: LABA, D., ed. Rheological properties of cosmetics and toiletries. New York: Marcel Dekker, 1993. p.9-33 (Cosmetic science and technology series, v.13).

67. NERY, M.M.F. "Determinação analítica do cetoconazol em medicamentos". São Paulo, 1992. , 119p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
68. NEUWALD, F. Rheological studies of new cream bases with the Brookfield synchroelectric viscometer. J. Soc. Cosmet. Chem., New York, v.17, n.4, p.213-233, 1966.
69. NUDELMAN, N.E.S. Estabilidad de medicamentos. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. 187p.
70. OXFORD, A.E., RAISTRICK, H., SIMONART, P. Studies in the biochemistry of microorganisms griseofulvin, $C_{17}H_{17}O_6Cl$ a metabolic product of penicillium griseo-fulvum dierckx. Biochem. J., London, v.33, p.240-248, 1939.
71. PAZZAGLIA, A. Therapeutic effects and tolerance of an extempore combination of an antibacterial, an anti-inflammatory, and an antimycotic cream in skin diseases of various origins. Pharmatherapeutica, Newbury, v.4, n.2, p.122-125, 1985.
72. PERSHING, L.K., CORLETT, J., JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.38, n.1, p.90-95, 1994.
73. PIÉRARD, G.E., PIERARD-FRANCHIMONT, C., VAN CUTSEM, J., RURANGIRWA, A., HOPPENBROWERS, M.L., SCHROOTEN, P. Ketoconazole 2% emulsion in the treatment of seborrheic dermatitis Int. J. Dermatol., Hagerstown, v.30, n.11, p.806-809, 1991.

- 74.PINHO, J.J.R.G., STORPIRTIS, S. Formação e estabilidade física das emulsões. Cosmet. Toiletries, Ed. Port., São Paulo, v.10, 1998.
- 75.PRESERVATION, presevative encyclopedia update. Cosmet. Toiletries, Carol Stream, v.108, p.85-88, 1993.
- 76.PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica. 5ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v.1, p.435-463.
- 77.QUACK, J.M., RENE, A.K., KRYPZAK, W. Esting the stability of cosmetics emulsions. Cosmet. Toiletries, Ed. Port. São Paulo, v.5, n.5, p.39-43, 1993.
- 78.REMINGTON: the sciences and practice of pharmacy. 19.ed. Easton: Mack, 1995. p.639-647.
- 79.RIEGER, M. Teste de estabilidade para macroemulsões Cosmet. Toiletries, Ed. Port., São Paulo, v.8, p.47-53, 1996.
- 80.ROSTEIN, D.M., KERTESZ, D.J., WALKER, K.A.M., SWINNEY, D.C. Stereoisomers of ketoconazole: preparation and biological activity. J. Med. Chem., Columbus, v.35, n.15, p.2818-2825, 1992.
- 81.SADEGHI, S., SHAMPISPUR, M. A new extrative-spectrophotometric method for the determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations. Anal. Lett., New York, v.31, n.15, p.2691-2705, 1998.
- 82.SAVIN, R.C., HORWITZ, S.N. Double-blind comparison of 2% ketoconazole cream and placebo in the treatment of tinea versicolor. J. Am. Acad. Dermatol., Saint Louis, v.15, n.3, p.500-503, 1986.

- 83.SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. To test or not test. Cosmet. Toiletries, Carol Stream, v.108, n.7, p.47-50, 1993.
- 84.SCHUELLER, R., ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions. Cosmet. Toiletries, Carol Stream, v.113, n.9, p.39-44, 1998.
- 85.SCREMIN, S. Treatment of skin diseases of various origins with a multi-action drug combination. Pharmatherapeutica, Newbury, v.4, n.5, p.296-299, 1985.
- 86.SHAATH, N.A. The analysis of sunscreen chemicals: quality control procedures for sunscreen chemicals. Cosmet. Toiletries, Carol Stream, v102, n.2, p.69-81, 1987.
- 87.SKIBA, M., SKIBA-LAHIANI, M., MARCHAIS, H., DUCLOS, R., ARNAUD, P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.198, p.1-6, 2000.
- 88.SLATER, C.A., SICKEL, J.Z., GASPARI, A.A. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. N. Engl. J. Med., Boston, v.331, n.2, p.85-87, 1994.
- 89.SMALL, E.J., BARON, A.D., FIPPIN, L., APODACA, D. Ketoconazole retains activity in advanced prostate cancer patients with progression despite flutamide withdrawal. J. Urol., Baltimore, v.157, n.4, 1997.
- 90.SORIANO, M.M.J., CONTRERAS, M.J.F. FLORES, E.S. The rheological analysis applied to the physical stability study of two dermopharmaceutical formulas. Boll. Chim. Farm., Milan, n.9, p.556-567, 1996.

91. STEPAN, O., JANTZ, M., JUDSON, M.A. Sucessful treatment of widely disseminated acanthomoebiasis South. Med. J., Birmingham, v.92, n.1, p.55-57, 1999.
92. STEWART, J.C., FERGUSON, J., DAVEY, P. New antifungal and antiviral chemotherapy. Br. Med. J., London, v.286, p.1802-1805, 1983.
93. STRATIGOS, J.D., ANTONIOU, C., KATSAMBAS, A., BÖHLER, K., FRITSC, P., MICHAELIDIS, D. Ketoconazole 2% cream versus hydrocortisone 1% cream in the treatment of seborrheic dermatitis. J. Am. Acad. Dermatol., Saint Louis, v.19, n.5, p.850-853, 1988.
94. SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. Pharm. Thecnol., Marina Del Rey, n.6, p.12-20, 1998.
95. SYMOENS, J., CAUWENBERGH, G. Ketoconazole: a new step in the managment of fungal disease. Prog. Drug. Res., Basel, v.27, p.63-84, 1983.
96. TORRES-RODRIGUES, J.M., MENDES, R., LOPEZ-JODRA, O., MORERA, Y., ESPASSA, M., JIMENEZ, T., LAGUNAS, C. *In vitro* susceptibilities of clinical yeast isolates to the new antifungal eberconazole compared with their susceptibilities to clotrimazole and ketoconazole. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.43, n.5, p.1258-1259, 1999.
97. UNITED States Pharmacopeia: USP 23. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1994. p.864, 1957-1963.
98. UNITED States Pharmacopeia: USP 24. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.945-946.

- 99.VIRTANEN, S., YLIRUUSI, J., SELKÄINAHO, E., NISKANEN, M., NISKANEN, T. Effect of different storage tempertures on the rheological characteristics and droplet size of non-ionic emulsifier containing emulsions. Pharmazie, Eschborn, v.48, p.48-53, 1993.
- 100.VIRTANEN, S., YLIRUUSI, J., SELKÄINAHO, E. Estimation of the stability of different emulsions using the EM 490 emulsion stability tester, Pharmazie, Eschborn, v.48, p.38-42, 1993.
- 101.WARNOCK, D.W., SPELLER, D.C.E. Antifungals today. J. Antimicrob. Chemother., Oxford, v.10, p.164-167, 1982.
- 102.WILKINSON, J.B., MOORE, R.J. Cosmetologia de Harry. Madrid: Diaz de Santos, 1990. p.249-288, p.747-779, 807-837.
- 103.WOOLLEY, D.W. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. J. Biol. Chem., Baltimore, v.152, p.225-232, 1944.