



# Estudo de metodologia analítica para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas

Santos, J.L. <sup>1\*</sup>; Ribeiro, Y. A. <sup>1</sup>; Salgado, H.R.N. <sup>1</sup>; Chung, Man Chin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, UNESP Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara – SP

Recebido 25/05/2009 / Aceito 22/09/2009

## RESUMO

**Cetoconazol é um antifúngico sintético, derivado imidazólico de amplo espectro de ação, efetivo no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas. Foram estudadas diferentes metodologias para análise do cetoconazol em especialidades farmacêuticas diversas usando espectrofotometria no ultravioleta, no infravermelho e análise térmica. Os resultados mostram que a espectrofotometria ultravioleta é um método rápido, prático e econômico e apontam que outros métodos como a espectrofotometria no infravermelho e análise térmica são uma alternativa à análise do cetoconazol em diferentes especialidades farmacêuticas.**

*Palavras-chave:* Cetoconazol. Antifúngico. Métodos analíticos. Análise térmica. Análise espectrofotométrica.

## INTRODUÇÃO

O cetoconazol (Figura 1) de nome químico *cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-yl-metil)1,3-dioxolan-4-yl]metoxi]fenil]piperazina, sintetizado em 1979, foi o primeiro azol a ser administrado oralmente para tratamento de infecções sistêmicas por fungos (Pandeewaran & Elango, 2009).

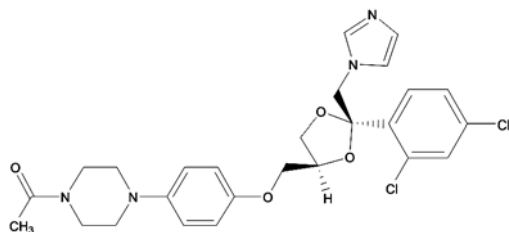


Figura 1: Estrutura química do cetoconazol (CAS 65277-42-1).

*Autor correspondente:* Jean Leandro dos Santos - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Rodovia Araraquara/Jau Km1 - Araraquara - CEP: 14801-902 - jeanleandrosantos@yahoo.com.br

Nos últimos 30 anos, houve um aumento constante nas infecções fúngicas sistêmicas. Um dos fatores deste aumento foi o uso generalizado de agentes antimicrobianos de amplo espectro para eliminar ou reduzir as populações bacterianas não-patogênicas que competem normalmente com os fungos. Outro fator foi o aumento do número de indivíduos com redução das respostas imunes devido à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou, em alguns casos, à ação de fármacos imunossupressores e agentes quimioterápicos, que levaram à prevalência maior das infecções oportunistas, isto é, infecções por fungos que são normalmente inócuos ou facilmente dominados em indivíduos imunologicamente competentes (Castro-Puyana et al., 2005; Maninder & Usha, 2008; Ekiert & Krzek, 2009).

A avaliação da qualidade dos antifúngicos, bem como de todos os fármacos e medicamentos, é da maior importância e, portanto, deve corresponder à descrição estabelecida nos códigos oficiais. Entre as análises a que são submetidos incluem-se os ensaios de identificação, pureza, atividade, métodos de doseamento, entre outros. Dentre os métodos de análise do cetoconazol descritos na literatura encontram-se espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (Kedor-Hackmann et al., 1994; Vertzoni et al., 2006).

Os métodos termoanalíticos, principalmente a termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) vêm se tornando ferramentas cada vez mais úteis no estudo das propriedades físicas e químicas de compostos de interesse farmacêutico (Marciniec et al., 2004; Santana et al., 2008). Esses métodos são aplicados nas análises quali e quantitativa no controle de qualidade de matérias-primas, precursores, fármacos e excipientes e, também, em formas farmacêuticas (Salgado et al., 2005).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e comparar metodologias espectrofotométricas e termoanalíticas para análise do cetoconazol padrão e presente em especialidade farmacêutica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Cápsulas contendo cetoconazol (dilúente lactose) foram gentilmente cedidas pela Farmácia-Escola “Prof. Dr. Antônio Alonso Martinez” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara. Cetoconazol substância referência, gentilmente cedida pela empresa Knoll Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda com pureza igual a 99,9%. Ácido clorídrico (Chemis), brometo de potássio (Merck).

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram realizados em espectrofotômetro UV-Visível Hitachi, modelo U-2001 (Japão), equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura. As leituras foram realizadas na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm e os espectros sobrepostos.

Os espectros de absorção no infravermelho, na região de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu (Japão).

As curvas TG e DTA foram obtidas através do módulo de análise térmica simultâneo, SDT 2960, da TA Instruments (EUA). Os termopares para análise e referência são de Pt/Pt/Rh 13%, com sensibilidade da balança de 0,1  $\mu\text{g}$  e precisão de 1%, com capacidade de peso de 200 mg e sensibilidade  $\Delta T$  (DTA) de 0,001°C.

As curvas DSC foram obtidas através do módulo DSC 2910, da TA Instruments, capaz de operar de -150°C a 725°C. Os termopares diferenciais são de cromel-constantan, e o termopar de amostra de cromel-alumel com precisão calorimétrica de 1%, precisão de temperatura +/- 0,1°C, reprodutibilidade de +/- 0,05°C, razão de aquecimento programável de 0,01 a 200°C  $\text{min}^{-1}$ , sensibilidade máxima de 0,2 mW, tamanho de amostra de 0,5 a 100 mg, volume da amostra de 10 mL. O sistema foi calibrado com relação a linha base e a temperatura com índio (padrão de alta pureza).

### Métodos

*Espectrofotometria na região UV* (Kedor-Hackmann et al., 1994)

Foram transferidos 100 mg de cetoconazol para béquer de 200 mL, em seguida foram adicionados 150 mL de HCl 0,01 M, com agitação por 10 minutos. Este material foi transferido para balão volumétrico de 200 mL com adição de HCl 0,01 M até completar o volume. Obteve-se assim a solução com concentração de 500 mg/mL. A partir dessa solução foram preparadas soluções contendo 200 mg/mL e 10 mg/mL para obtenção dos espectros de absorção UV em HCl 0,01 M. Também foi obtido o espectro da solução de em HCl 0,01 M. Esta metodologia foi utilizada para análise de especialidades farmacêuticas encontradas no mercado.

*Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier*

Foi homogeneizado em gral 1 mg das amostras em 100 mg de KBr. Prepararam-se pastilhas que posteriormente foram analisadas no espectrofotômetro infravermelho.

### Análise térmica

As amostras foram pulverizadas e dessecadas a 95°C/8h. Foram pesados analiticamente 9 mg de cada uma das amostras e colocadas em cadinho de alumínio para realização das análises. Cada amostra foi analisada separadamente em aparelho de DSC, previamente calibrado com razão de aquecimento de 20°C/min; variação de temperatura de 40-450°C e vazão de nitrogênio de 90 mL/min. A faixa da temperatura utilizada foi de 0° a 1200°C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 90 mL/min) e de nitrogênio (vazão de 90 mL/min), razão de aquecimento de 20°C/min.

## RESULTADOS

*Espectrofotometria na região UV* (Kedor-Hackmann et al., 1994)

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que formulações contendo cetoconazol podem ser analisadas por espectrofotometria ultravioleta. Usando esta técnica, os valores máximos de absorção foram observados no comprimento de onda 222 nm para solução de cetoconazol a 10 mg/mL e a 269 nm para solução de cetoconazol a 200 mg/mL. As curvas analíticas foram construídas de 4 a 13 mg/mL a 222 nm, e de 100 a 280 mg/mL a 269 nm em gráficos de concentração versus absorvância. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A análise da variância (ANOVA) foi realizada para verificação da linearidade do método. A análise efetuada a 222 nm apresentou equação de regressão:  $y = 1,0298x + 0,5965$  e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9997. Na análise a 269 nm estes valores foram:  $y = 0,0025x + 0,00336$  e  $r^2 = 0,9998$ , respectivamente.

Dessa forma, foi analisado o medicamento manipulado pela Farmácia-Escola, que possui como único excipiente a lactose. No comprimento de onda de 269 nm encontrou-se 97,3% de cetoconazol.

Os valores médios da estimativa de desvio padrão foram de 0,8 e 1,3%. Os valores médios de recuperação foram de 100,7% e 101,2% nos medicamentos da Farmácia-Escola. Essa metodologia apresentou linearidade e especificidade e mostrou-se útil, rápida e econômica.

*Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier*

O espectro no infravermelho (Figura 2) do cetoconazol padrão apresenta em 3010  $\text{cm}^{-1}$  a deformação axial da ligação C-H presente nos sistemas aromáticos do cetoconazol. O estiramento axial da carbonila da amida é observado em 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Já os estiramentos axiais referentes à ligação C=C dos sistemas aromáticos são observados em 1600, 1507 e 1466  $\text{cm}^{-1}$ . O estiramento axial assimétrico da ligação C-O-C é observado em 1240  $\text{cm}^{-1}$ , e em 1258  $\text{cm}^{-1}$  é observado o estiramento axial da ligação C-N.

Estes mesmos estiramentos aparecem na análise do medicamento fornecido pela Farmácia-Escola, que apresenta ainda os estiramentos dos grupos funcionais presentes no excipiente lactose, destacando o estiramento axial da ligação O-H em 3300  $\text{cm}^{-1}$ , que se apresenta larga,

devido à formação de ligação hidrogênio intramolecular possível de se realizar na estrutura da lactose.

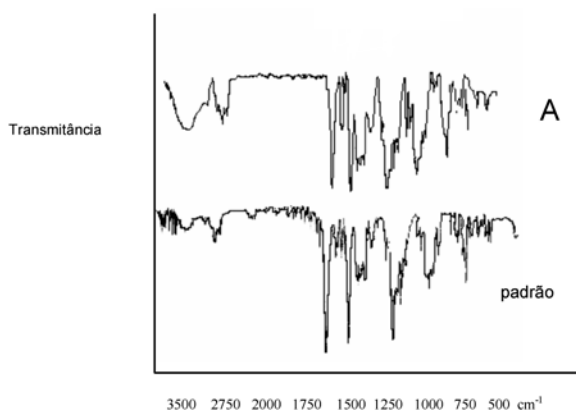


Figura 2: Espectro no infravermelho do cetoconazol padrão; A: medicamento cetoconazol

### Análise térmica

#### Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Segundo dados da literatura a faixa de fusão do cetoconazol encontra-se entre 148°-152°C (Marciniec et al., 2004). A curva DSC do cetoconazol padrão mostra (Figura 3) pico endotérmico de fusão na temperatura de 153°C e pico exotérmico de decomposição em 362°C.

A curva DSC do medicamento (Figura 4), fornecido pela Farmácia-Escola, mostra pico endotérmico na temperatura de 151°C. Ademais, pode-se observar em 148°C associado ao pico endotérmico de fusão do cetoconazol, a desidratação da lactose. Em 220°C há um pico endotérmico referente à fusão da lactose. Após esse pico, observa-se um pico endotérmico em 243°C e um pico exotérmico em 315°C, referente à decomposição térmica da lactose fundida. Em 361°C observa-se o pico exotérmico de decomposição do cetoconazol.

#### Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A curva TG do cetoconazol padrão (Figura 5) mostra perda de massa em duas etapas sendo a primeira etapa em 375°C e a segunda 485°C. As perdas de massa correspondem aos dois picos exotérmicos que são relativos à decomposição do cetoconazol. A curva TG do cetoconazol medicamento (Figura 6) mostra perda de massa em três etapas, ocorrendo uma alteração entre 250°C e 375°C.

Na temperatura de 150°C a curva DTA do cetoconazol padrão mostra um pico endotérmico, mas não se observa perda de massa na curva TG sendo, portanto, este pico corresponde à fusão do cetoconazol. Ademais, pode-se observar a presença de dois picos exotérmicos (380 e 588°C) atribuídos à decomposição do composto fundido (Figura 5).

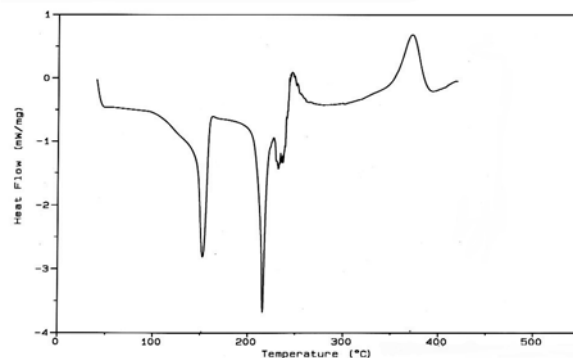


Figura 3: Curva DSC do cetoconazol padrão. Razão de aquecimento: 10°C/min, em atmosfera de N<sub>2</sub>. Massa: 3,700mg.

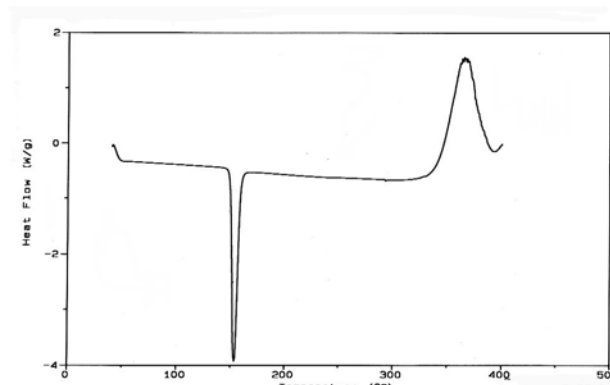


Figura 4: Curva DSC do medicamento fornecido pela Farmácia Escola. Razão de aquecimento: 10°C/min, em atmosfera de N<sub>2</sub>. Massa: 3,700mg.

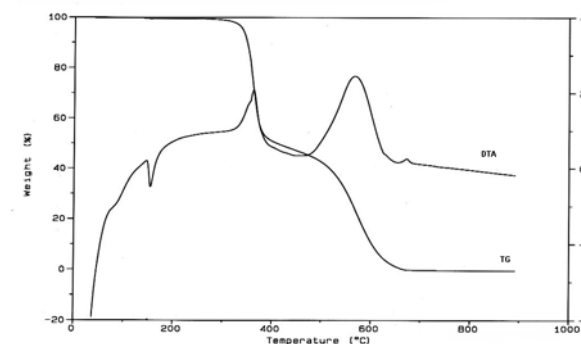


Figura 5: Curva TG/DTA do cetoconazol padrão. Razão de aquecimento: 10°C/min, em atmosfera de N<sub>2</sub>. Massa: 6,4572mg.

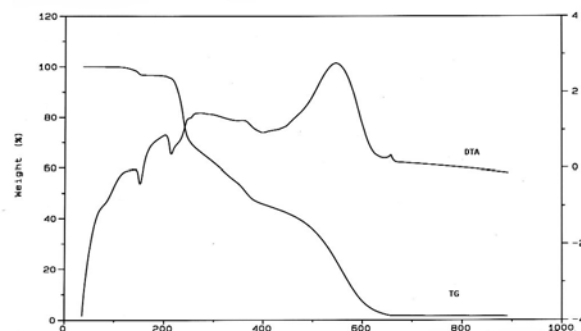


Figura 6: Curva TG/DTA do medicamento fornecido pela Farmácia Escola. Razão de aquecimento: 10°C/min, em atmosfera de N<sub>2</sub>. Massa: 6,4572mg.

A curva DTA (Figura 6) mostra dois picos endotérmicos, sendo o primeiro pico na temperatura de 150°C, pela comparação com a curva DTA do cetoconazol padrão, corresponde à fusão do mesmo. O segundo pico endotérmico e os dois picos exotérmicos correspondem às perdas de massa mostrados na curva TG do medicamento (Figura 6).

## DISCUSSÃO

A determinação de métodos analíticos para análise de antifúngicos é de fundamental importância. Entre os métodos de análise encontrados na literatura e utilizados na análise do cetoconazol o procedimento descrito na metodologia por espectrofotometria ultravioleta mostrou ser econômica e rápida. Nesta, foram construídas curvas nas concentrações entre 1 a 21 mg/mL para determinação a 222 nm, e entre 20 a 460 mg/mL a 269 nm. A linearidade foi encontrada entre 4 a 13 mg/mL a 222 nm, e entre 100 a 280 mg/mL a 269 nm. A precisão do método, sob condições fixadas, foi determinada pela estimativa do desvio padrão, por aplicação do método à amostra em condições idênticas. Os valores médios da estimativa de desvio padrão de 0,8 e 1,3% demonstraram que o método possui boa precisão quando analisado no mesmo dia e em dias diferentes. São aceitáveis valores de desvio padrão relativo igual ou abaixo de 5%. A exatidão foi realizada pela técnica de adição de padrão e avaliada pelo teste de recuperação, onde quantidades conhecidas da substância química de referência foram adicionadas ao medicamento. Os valores médios de recuperação de 100,7% e 101,2% nos medicamentos da Farmácia-Escola indicam recuperação adequada. Valores de percentagem de recuperação entre 98% e 102% são aceitáveis (Camilo et al., 2008; Kedor-Hackmann et al., 1994).

A espectrofotometria no infravermelho é uma alternativa à identificação do cetoconazol em especialidades farmacêuticas. O espectro de infravermelho é característico para cada substância. Portanto, duas substâncias que não são enantiômeros, apresentam espectros diferentes. A análise cuidadosa dos estiramentos característicos de determinados grupos funcionais permite a identificação da estrutura de moléculas (Pandeewaran & Elango, 2009). Neste estudo a técnica foi utilizada de forma qualitativa, a fim de verificar a presença do cetoconazol em formas farmacêuticas sólidas. Foi possível observar os estiramentos das funções químicas do fármaco cetoconazol e distingui-los do excipiente do medicamento da Farmácia-Escola. Estes dados demonstram que a espectrofotometria no infravermelho é uma ferramenta útil na caracterização do cetoconazol em especialidade farmacêutica.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica na qual a diferença no fluxo de calor na amostra e substância de referência são medidas como função da temperatura da amostra enquanto as duas estão submetidas a um programa de temperatura controlada. A DSC tem se tornado a mais usada de todas as técnicas térmicas, na área farmacêutica, para estudar: compatibilidade fármaco-fármaco e fármaco-excipiente em pré-formulações; polimorfismo, compostos de inclusão e dispersões sólidas; determinação de pureza química; análise de formas farmacêuticas sólidas e controle de qualidade (Storti, 2003).

A curva DSC do medicamento fornecido pela Farmácia-Escola mostra a presença dos picos endotérmicos de fusão e exotérmicos de decomposição do cetoconazol. O deslocamento do pico endotérmico em relação à curva DSC do cetoconazol padrão ocorre devido à presença da lactose presente na formulação. Através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise térmica diferencial (DTA) foi possível a identificação do cetoconazol matéria-prima e do fármaco presente no medicamento.

A termogravimetria (TG) permite registrar as variações de massa em função do tempo do ciclo de aquecimento ou arrefecimento e/ou temperatura. Sua aplicação é limitada, pois, nem todos os eventos que ocorrem durante aquecimento de uma amostra, são acompanhados de mudanças de massa. Esta técnica é utilizada principalmente para avaliar: estabilidade térmica dos materiais; cinética de decomposição; estabilidade oxidativa; efeito da atmosfera sobre os materiais (Santana et al., 2008).

A curva TG do cetoconazol medicamento aponta uma possível interação com a lactose, presente como excipiente. Devido à impossibilidade de separar a etapa da perda de massa do cetoconazol padrão e cetoconazol medicamento não foi possível quantificar o fármaco pela técnica de termogravimetria.

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica que inclui métodos analíticos que determinam propriedades físicas de substâncias em função de modificações na temperatura, quando estas são submetidas a programas de temperatura controlada. Esta técnica envolve o aquecimento e/ou arrefecimento simultâneo da amostra e da substância de referência (contidas no mesmo forno) e à mesma velocidade. A variação de temperatura entre a amostra e a substância de referência se dá em função da natureza desta e da temperatura em que se encontra o forno (Wendlandt, 1986). A curva DTA possibilita a identificação do cetoconazol.

A análise térmica mostrou-se como uma nova alternativa analítica qualitativa à análise do cetoconazol em formulação farmacêutica.

## AGRADECIMENTOS

À Farmácia-Escola da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara e à Knoll Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, pelo fornecimento das amostras utilizadas no trabalho.

À Bolsa PAE e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## ABSTRACT

*Study of analytical methodology for ketoconazole determination in pharmaceutical preparation*

**Ketoconazole is a synthetic broad-spectrum oral and topical antifungal drug derived from imidazole, effective in the treatment of superficial mycoses and systemic infections. In this study we have tested several methods to analyze ketoconazole in various pharmaceutical products containing this drug, employing techniques such as UV and IR spectrophotometry and thermal analysis. The results showed that UV spectrophotometry is a fast, practical and economical method and indicated**

**that other methods, such as IR spectrophotometry and thermal analysis, could be good alternative methods for ketoconazole analysis in certain pharmaceutical forms.**

*Keywords:* Ketoconazole. Antifungal. Analytical methods. Thermal analysis. Spectrophotometric analysis.

## REFERÊNCIAS

- Camilo FC, Rodrigues PO, Wagner TM. Validação de um método analítico para análise simultânea de estavudina (D4T), lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) em matéria prima. *Rev Elet Farm.* 2008; 5(2):22-9.
- Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML. Enantiomeric separation of ketoconazole and terconazole antifungals by electrokinetic chromatography: Rapid quantitative analysis of ketoconazole in pharmaceutical formulations. *Electrophoresis* 2005; 26(20):3960-8.
- Ekiert RJ, Krzek J. Determination of azole antifungal medicines using zero-order and derivative UV spectrophotometry. *Acta Pol Pharm.* 2009; 66(1):19-24.
- Kedor-Hackmann ERM, Nery MMF, Santoro MIRM. Determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Anal Lett.* 1994; 27(2):363-76.
- Maninder J, Usha A. Isolation, characterization and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV positive patients. *J Commun Dis.* 2008; 40(3):177-81.
- Marciniak B, Kozak M, Dettlaff KJ. Thermal analysis in evaluation of the radiochemical stability of some fungicidal drugs. *J Therm Anal Calorim.* 2004; 77(1):305-17.
- Pandeewaran M, Elango KP. Electronic, Raman and FT-IR spectral investigations of the charge transfer interactions between ketoconazole and povidone drugs with iodine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2009; 72(4):789-95.
- Salgado HRN, Ribeiro YA, Ribeiro CA, Schapoval EES. Análise térmica do esparfloxacino. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2005; 26(2):119-23.
- Santana DP, Fonseca SGC, Bedor DCG, Leal LB, Silva JA. Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA contendo lapachol. *Rev Cienc Farm Básica Apl.* 2008; 29(3):261-6.
- Storti MPB. Identificação da flutamida em formulações farmacêuticas por análise térmica e espectrofotometria. [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2003.
- Vertzoni MV, Reppas C, Archontaki HA. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of ketoconazole in canine plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006; 839:62-7.
- Wendlandt, WW. *Thermal analysis.* 3rd ed. New York: Wiley-Interscience; 1986. p.18-25.

