

Desenvolvimento de método espectrofotométrico para análise quantitativa de cetoconazol em xampus

Spectrophotometric method to quantitative ketoconazol analysis in shampoos

Karin dos Santos Proença, Robson Vicente M. de Oliveira, Marcos Moisés Gonçalves & Marta Maria D. C. Vila

RESUMO – O cetoconazol é bastante utilizado para tratamento e controle da caspa, na forma de xampus ou loções capilares. Diversos métodos são descritos em literatura para a dosagem do cetoconazol, no entanto, verificam-se carências em métodos analíticos simples e de baixo custo, como os métodos espectrofotométricos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de método analítico simples e de baixo custo para determinação de cetoconazol em xampus. A determinação foi realizada em comprimento de onda de 267nm, na faixa de 3 a 5mg/mL apresentando exatidão de 109,3 a 95,3%, precisão de 1,1%, limite de detecção de $1,2 \times 10^{-3}$ mg/ml e limite de quantificação de $4,1 \times 10^{-3}$ mg/ml. Pelos resultados obtidos, o método pode ser aplicado na análise de cetoconazol em xampus.

PALAVRAS-CHAVE – Cetoconazol, xampu, método espectrofotométrico.

SUMMARY – Ketoconazole is an active agent in shampoos or lotions for control and dandruff treatment. The literature presents several methods for ketoconazole determinations. However it is necessary to know more simple and low cost analytical methods employing spectrophotometer method for its set up. This work shows a simple and low cost ketoconazole dosage method for shampoos. The wavelength used was 267nm in the range 3 to 5mg/mL, accuracy 95.3 to 109.3%, precision 1.07%, detection limit 1.2×10^{-3} mg/ml and quantification limit equal to 4.1×10^{-3} mg/mL. From these results we conclude that the spectrophotometer method can be applied as a dosage method for ketoconazole in shampoos.

KEYWORDS – Ketoconazol, shampoo, spectrophotometer method.

INTRODUÇÃO

O cetoconazol é um derivado imidazólico com atividade antimicrobiana sintetizado pela primeira vez por pesquisadores da Janssen Indústria Farmacêutica e Química Ltda e introduzido na terapêutica no final dos anos 70. Possui fórmula mínima $C_{26}H_{28}Cl_2Na_4O_4$ e massa molecular de 531,4 D, sendo encontrado na forma de pó branco cristalino (Farmacopéia Brasileira, 1988; The United States Pharmacopeia, 2005). Apresenta grande potencial terapêutico para infecções fúngicas sistêmicas e superficiais (Tavares, 2001), sendo bastante utilizado no tratamento e combate à caspa.

Topicamente, o cetoconazol é comumente veiculado em xampus ou loções capilares nas concentrações de 1 e 2% (Bonadeo, 1982; Bulmer & Bulmer, 1999), sendo, a concentração de 2% a mais efetiva para o tratamento da caspa e dermatite seborréica (Padilha, 1995). Contudo, existem alguns estudos que demonstram sua eficácia para o tratamento da caspa, a partir da concentração de 0,5% (Lozano & Soto, 1994).

A ação antifúngica do cetoconazol ocorre pela sua ação inibitória sobre a enzima do citocromo P450 res-

ponsável pela síntese e degradação dos ácidos graxos e esteróides endógenos nas células animais, vegetais e seres unicelulares, como o lanosterol (Hume & Kerker, 1983; Tavares, 2001). Essa atividade promove interferência na síntese do ergosterol na membrana de fungos sensíveis e, como consequência, ocorre alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, que passa a perder cátions, proteínas e outros elementos vitais, ocorrendo por fim, o rompimento da membrana.

A dosagem do cetoconazol, tanto em medicamentos e formulações cosméticas como em fluidos biológicos, pode ser realizada através de diversos procedimentos analíticos envolvendo métodos titulométricos (The United States Pharmacopeia, 2005); espectrofotométricos (Oliveira, 1999) e métodos cromatográficos (Al Meshal, 1989; Heyden *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2004).

Para a determinação de cetoconazol em xampus, os métodos comumente citados são basicamente os que envolvem a cromatografia líquida de alta eficiência (Heyden *et al.*, 2002; Nguyet *et al.*, 2003; Nguyet *et al.*, 2004). No entanto, a disponibilidade de métodos analíticos simples que envolvam aparelhagem de baixo custo e fácil manuseio para a determinação do ceto-

Recebido em 15/5/2007

¹Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba

²Professores do Curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba

conazol, pode facilitar a detecção de problemas na manipulação de xampus, tais como sua dissolubilidade em função do pH e degradação, como observados por alguns autores (Staub & Bergold, 2004; Staub *et al.*, 2002). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de método analítico espectrofotométrico para determinação de cetoconazol em xampus.

MATERIAL E MÉTODOS

As formulações de xampu e o método de doseamento espectrofotométrico foram adaptados do trabalho de Oliveira (1999) e Low e Wangboonskul (1999).

• Formulações de xampu com cetoconazol a 2% p/v

As formulações de xampu a 2% p/v foram preparadas segundo as Boas Práticas de Manipulação, utilizando matérias-primas de grau farmacêutico, cujas porcentagens estão discriminadas na **Tabela I**.

• Extração do cetoconazol das formulações de xampu e preparo das soluções

Alíquotas de 10mL das amostras de xampus com cetoconazol 2% p/v (equivalente a 50mg de cetoconazol) foram transferidas para balão volumétrico de 100mL onde receberam 70mL de metanol sendo submetidas à agitação mecânica à temperatura ambiente durante 30min tendo em seguida o volume completado com metanol e a solução filtrada em papel. As soluções-padrão foram obtidas substituindo-se as formulações de xampu por exatamente 50mg de cetoconazol. O branco foi obtido pelo mesmo processo de extração empregando-se, no entanto, xampu isento de cetoconazol.

• Doseamento espectrofotométrico

As soluções metanólicas obtidas do xampu de cetoconazol 2% p/v ou do princípio ativo foram colocadas em cubetas de quartzo e os valores de absorvância foram detectados em espectrofotômetro (Femto, modelo 482) após exposição à radiação ultravioleta no comprimento de 267nm. As análises foram realizadas em triplicata.

• Validação

Para a validação do método foram seguidas as determinações da Agência Nacional de Vigilância Sani-

tária (ANVISA) (Brasil, 2003), com a construção da curva de calibração e obtenção dos parâmetros exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e robustez.

A curva de calibração foi construída utilizando-se 6 diferentes concentrações do cetoconazol, partindo-se de 0,5mg/mL até 3mg/mL, com incrementos de 0,5mg/mL.

A exatidão foi obtida pela relação entre a concentração média experimental dividida pela concentração teórica média multiplicada por 100 de acordo com a **equação 1**. O ensaio foi realizado empregando-se 9 determinações dentro do intervalo linear obtido.

$$\text{Exatidão} = (\text{Valor médio obtido} \times 100) / \text{Valor teórico} \quad (1)$$

Para a determinação da precisão, foi calculado o Coeficiente de Variação (CV%) expresso pelo valor de desvio-padrão dividido pela concentração média determinada multiplicando-se por 100, conforme a **equação 2**. Para tanto, utilizou-se a concentração de 0,5mg/mL com 6 determinações.

$$\text{CV \%} = (\text{DP} \times 100) / \text{Conc média} \quad (2)$$

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados matematicamente através da relação entre desvio-padrão médio dos valores do branco, utilizando-se multiplicador apropriado e dividindo-se por "a" que é a inclinação da curva de calibração, como indicado nas **equações 3 e 4** (Brasil, 2003).

$$\text{LD} = (\text{DP médio} \times 3) / a \quad (3)$$

$$\text{LQ} = (\text{DP médio} \times 10) / a \quad (4)$$

Para a verificação de robustez, foram considerados os parâmetros tempo de agitação da amostra (de 10 a 30min), tempo de preparo de amostra e armazenamento em temperatura ambiente (25°C) e a 40°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a identificação do comprimento de onda mais adequado para as condições experimentais, foram realizadas leituras de amostra da solução-padrão de cetoconazol em todo o espectro (**Figura 1**), sendo o compri-

TABELA I
Composição da formulação do xampu de cetoconazol a 2% p/v

Matéria-prima	% p/v
Lauril éter sulfato de sódio	20,00
Lauril sulfato de trietanolamina	5,00
Dietanolamida de ácido graxo de coco	3,00
Solução aquosa de ácido cítrico 20% p/v	q.s.
Solução aquosa de trietanolamina 20 % p/v	q.s.
Metilparabeno	0,18
Propilparabeno	0,02
Propilenoglicol	0,80
Cetoconazol	2,00
Água desionizada	qsp 100,00

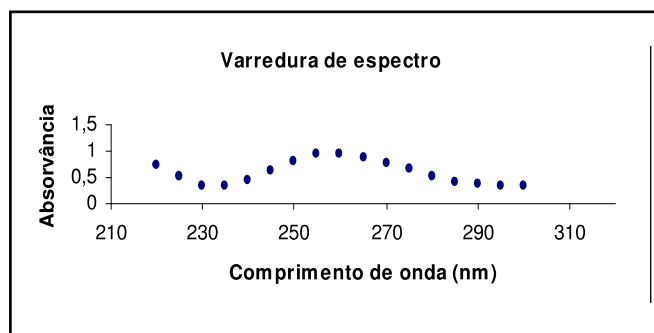


FIG. 1 - Varredura de espectro referente à solução-padrão de cetoconazol

mento de 267nm considerado o mais adequado para a análise do princípio ativo cetoconazol.

Contudo, verificaram-se interferências de matérias-primas da formulação, principalmente a solução conservante (metilparabeno e propilparabeno) e o sobrenadante dietanolamida de ácido graxo de côco. Sendo assim, foi necessário o procedimento para a extração do ativo cetoconazol das amostras de xampus e foram avaliados os métodos de extração de Sadeghi e Shamsipur (1998), Kedor-Hackmann e colaboradores (1994) e de Low e Wangboonskul (1999). A metodologia de Low e Wangboonskul (1999) apresentou os melhores resultados, sendo o escolhido para a extração do cetoconazol.

A curva de calibração foi obtida empregando-se as concentrações de 0,5mg/mL; 1mg/mL; 1,5mg/mL; 2mg/mL; 2,5mg/mL e 3mg/mL. A curva obedeceu a equação $A = 0,0349C + 1,8827$, onde A = absorvância e C = concentração de cetoconazol. Obteve-se coeficiente de correlação com $r = 0,9955$, indicando linearidade aceitável na faixa estudada, segundo as especificações da ANVISA (Brasil, 2003).

O método apresentou exatidão entre 109,3 a 95,3%, como indicam os resultados da Tabela II. Desse modo, o método pode ser considerado exato, pois, segundo Rebani e colaboradores (2004), os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 e 120% com precisão de até $\pm 20\%$ dependendo da matriz e teor de princípio ativo.

TABELA II
Valores de exatidão para as concentrações de cetoconazol (n = 9)

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração obtida (mg/mL)	Exatidão (%)
0,50	0,49	98
1,00	1,03	103
1,50	1,43	95,3
2,00	2,43	97,2
3,00	3,28	109,3

O ponto da curva de calibração escolhido para a verificação da precisão foi o de 0,5mg/mL em função de ser o valor de concentração mais baixo e desse modo, mais susceptível às variações. Como se obteve o valor de 1,1% de CV%, o método é preciso uma vez que a legislação brasileira (Brasil, 2003) considera aceitável um valor de até 5%.

Os valores de LD e LQ foram de $1,2 \times 10^{-3}$ mg/mL e $4,1 \times 10^{-3}$ mg/mL, respectivamente, demonstrando que o método pode ser aplicado para análise em amostras de xampu na concentração avaliada.

Para a verificação da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações no procedimento analítico, isto é, a robustez, foi avaliada a influência do tempo de agitação e tempo de armazenamento da amostra em temperatura ambiente e a 40°C. Como disposto na Tabela III, pode-se verificar que o método não sofre interferência em relação ao tempo de agitação, indicando a possibilidade de simplificação do método no preparo das amostras, ao invés dos 30min, a agitação poderá ser de 10min. Já em relação ao tempo de armazenamento e temperatura,

verificou-se uma ligeira variação nos resultados. Desse modo, o método de extração deve ser realizado com agitação de 10min e as amostras mantidas à temperatura ambiente.

TABELA III
Valores médios de concentração obtidos nos ensaios em diferentes tempos de agitação, armazenamento em temperatura ambiente e armazenamento à 40°C efetuados como ensaio de robustez (n = 3)

Parâmetro	Tempo	Concentração mg/ mL
Agitação	10 min	0,497
	20 min	0,501
	30 min	0,502
Armazenamento à temperatura ambiente (25°C)	0 dias	0,499
	2 dias	0,508
	4 dias	0,563
Armazenamento à 40°C	0 dias	0,499
	2 dias	0,513
	4 dias	0,580

CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico proposto mostrou-se adequado para a análise de cetoconazol em xampus, apresentando adequados parâmetros analíticos, podendo assim ser uma alternativa mais econômica quando comparado aos métodos cromatográficos, normalmente empregados nesse tipo de análise.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UNISO pelo apoio financeiro e bolsa PROBIC.

REFERÊNCIAS

- Al-Meshal, M. A. Determination of ketoconazole in plasma and dosage forms by high performance liquid chromatography and microbiological method. *Analytical Letters*. 1989 22(10): 2249-2263.
- Bonadeo, I. *Cosmética, ciencia y tecnologia*. Madrid: Ciencia, 1982
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003.
- Bulmer, A. C. & Bulmer, G. S. The antifungal action of dandruff shampoos. *Mycopathologia*. 1999 147 (2): 63-65.
- Farmacopéia Brasileira. São Paulo: Atheneu Editora, 1988, 4ª ed.
- Heyden, Y. V.; Nguyet, A. N. M.; Detaevernier, M. R.; Massart, D. L.; Plaizire-Vercammen, J. Simultaneous determination of ketoconazole and formaldehyde in a shampoo: liquid chromatography method development and validation. *Journal of Chromatography*. 2002 A 958: 191-201, 2002.
- Hume A. L.; Kerkering, T. M. New drug evaluations: ketoconazole. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1983 17:169-174.
- Kedor-Hackmann, E. R. M.; Nery M. M. F.; Santoro, M. I. R. M. Determination of ketoconazole in pharmaceutical preparations by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*. 1994 27(2):363-376.
- Low, A. S.; Wangboonskul, J. A HPLC assay for determination of ketoconazole in common pharmaceutical preparations. *Analyst*. 1999 124:1589-1593.
- Lozano, O. W.; Soto, R. F. G. Estudio clinico de ketoconazol 0.5 por ciento shampoo vs: placebo em el tratamiento de la dermatitis seborreica. *Revista Mex. Dermatol.* 1994 38(5 supl):59-60.
- Nguyen, A. M.; Nederkassel, A. M.; Tallieu, L.; Kuttatharmakul, S.; Hund, E.; Hu, Y.; Smeyers-Verbeke, J.; Heuden, Y. V. Statistical method comparison: short and long column liquid chromatography assays of ketoconazole and formaldehyde in shampoo. *Anal. Chim. Acta*. 2004 516:87-106.

12. Nguyen, A M. Tallieu, L.; Plaizire-Vercammen, J.; Massart, D.L.; Heyden Y.V. Validation of na HPLC method on short columns to assay ketoconazole and formaldehyde in shampoo. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003 32(1):1-9.
13. Oliveira, R. V. M. Avaliação do sistema conservante em xampu anticaspa com cetoconazol a 2%. 1999. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
14. Padilha, S. L. Tratamiento de pitiriasis capitis com shampoo de ketoconazol 1 por ciento y 2 por ciento vs disulfuro de selenio. Rev. Mex. Dermatol. 1995 39(1): 22-5.
15. Rebani, M; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim. Nova. 2004 27(5): 771-780.
16. Sadechi, S. & Shamsipur, M. A new extractive spectrophotometric method for the determination of ketoconazole from pharmaceutical preparations. Analytical Letters. 1998 31(15):2691-2705.
17. Staub, I.; Adams, A. I. H.; Bergold, A. M.; Froehlich, P.E. Avaliação da integridade da formula do xampu de cetoconazol. Infarma 2002 14 (1/2): 74-76.
18. Staub, I.; Bergold, A. M.; Determination of ketoconazole in shampoo by high performance liquid chromatography. Acta Farm Bonaerense 23 (3): 387-390, 2004.
19. Tavares, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos, 3a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001, p 870-872.
20. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005, 28a ed.

Endereço para correspondência
Marta Maria D. C. Vila
Universidade de Sorocaba
Rodovia Raposo Tavares, km 92,5
e-mail: marta.vila@uniso.br