



## Validação de metodologia por UV/VIS para quantificação de cetoconazol em comprimidos

### Quantitative determination of ketoconazole tablets by absorption spectrophotometry in the ultraviolet region

Recebido em 23/07/2012

Aceito em 30/10/2012

Alexandre Machado Rubim<sup>1,2,\*</sup>, Marcos Roberto dos Santos<sup>1,3</sup>, Luciane Varini Laporta<sup>1,2</sup>, Jaqueline Bandeira Rubenick<sup>1</sup> & Tatieli Sampaio dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Franciscano, Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Santa Maria, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Química, Santa Maria, Brasil

#### RESUMO

O cetoconazol é um antifúngico de amplo espectro de ação, indicado para o tratamento de infecções superficiais e sistêmicas. Metodologia espectrofotométrica UV/VIS foi desenvolvida para quantificação de cetoconazol em comprimidos, utilizando-se ácido clorídrico 0,1 M como diluente e comprimento de onda para detecção de 223 nm. Os parâmetros de seletividade, intervalo, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez foram analisados durante seu desenvolvimento. O método demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato e robusto para a quantificação de cetoconazol em comprimidos. Ao comparar os resultados obtidos com os resultados da metodologia oficial, no qual utiliza cromatografia a líquido de alta eficiência, não houve diferença significativa entre os valores ( $p=0,05$ ). Sendo assim, pode-se concluir que a metodologia validada, é de fácil execução, rápida e de baixo custo, podendo ser utilizada pelos laboratórios que não possuem equipamentos sofisticados, ou como rotina nas análises de controle de qualidade.

**Palavras-chave:** Cetoconazol, Desenvolvimento, Validação

#### ABSTRACT

Ketoconazole is a broad spectrum antifungal, indicated for the treatment of infection superficial and systemic. Methodology spectrophotometric was developed for quantification of ketoconazole in tablets, utilizing hydrochloride acid 0.1 M as diluent and a wavelength of 223 nm. The parameters of selectivity, interval, linearity, detection and quantification limits, precision, accuracy and robustness were analyzed during development. The method proved to be selective, linear, precise, accurate and robust for the quantification of ketoconazole in tablets. By comparing the results with the results of the official methodology, which uses high performance liquid chromatography, there was no significant difference between the values ( $p=0.05$ ). Thus it can be concluded that the method validated, is easy, fast and low cost, can be used by the laboratories that do not have sophisticated equipment, or as a routine analysis in quality control.

**Keywords:** Ketoconazole, Development, Validation

#### INTRODUÇÃO

As infecções micóticas representam um dos principais problemas sanitários em nível mundial, sendo responsável por cerca de 10% a 15% das infecções hospitalares transmitidas a pacientes internados, chegando a ser fatal em vários casos, além de causar 5% a 10% das consultas

dermatológicas (Vera & Cervera, 2001). O cetoconazol (Figura 1) é um derivado imidazólico apresentando atividade antimicótica ampla, ser absorvido por via oral e capaz de manter níveis sanguíneos mais elevados (Tavares, 1996).

\* Contato: Alexandre Rubim, Centro Universitário Franciscano, Rua dos Andradas, 1614, prédio 4, sala S011, Santa Maria - RS, Cep: 97010-032, telefone: (55) 3220 1226, E-mail: rubim9@hotmail.com

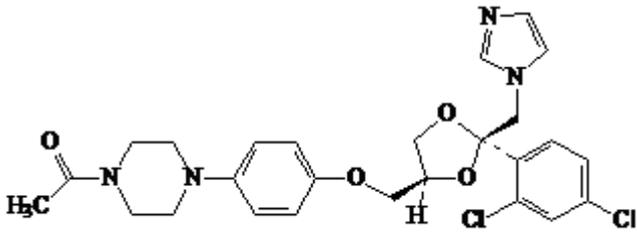


Figura 1. Estrutura química do cetoconazol

Utilizado no tratamento de infecções ginecológicas, pneumonia fúngica e na profilaxia de micoses em pacientes imunodeprimidos (Goodman & Gilman, 2005) o cetoconazol possui ação a partir da inibição da biossíntese do ergosterol, um importante componente para formação da membrana celular fúngica (Carazo *et al.*, 1999). No mercado nacional apresenta-se nas formas de comprimidos, creme dermatológico e xampu (Korolkovas, 2011). Dentre os métodos analíticos de análise para quantificação de cetoconazol descritos na literatura encontram-se: método potenciométrico (Aboun-assif & El-shzly, 1989), espectrofotométrico (Kedor-hackmann *et al.*, 1994; Kelani & Bebawy, 1997), cromatográfico (Abdelmoety *et al.*, 2002; Heyden *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2009) e por eletroforese capilar (Velikinac *et al.*, 2004).

A literatura descreve apenas avaliação microbiológica por difusão em ágar para cetoconazol xampu (Staub *et al.*, 2005). As Farmacopeias Americana e Brasileira descrevem como metodologia oficial, para o doseamento de cetoconazol comprimidos, a cromatografia a líquido de alta eficiência (FB 5, 2010; USP 35, 2012).

O desenvolvimento de metodologia analítica alternativa, como técnica espectrofotométrica, representa uma grande vantagem para laboratórios de controle de qualidade que não possuem equipamentos sofisticados como cromatógrafo para tal procedimento (Souza *et al.*, 2006). Devido a inexistência na literatura de uma metodologia mais simples e menos onerosa, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de um método analítico para o doseamento de cetoconazol em comprimidos, através da espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. O método proposto será comparado estatisticamente com a metodologia oficial, no intuito de disponibilizar uma nova alternativa de análise quantitativa que possibilite assegurar o controle de qualidade deste fármaco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra, substância química de referência (SQR) e reagentes

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados comprimidos de cetoconazol Nizoral<sup>®</sup> 200 mg, adquiridos no comércio local. Cetoconazol Substância Química de Referência (SQR) - Lote 1033 - Farmacopeia Brasileira. Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

### Equipamentos

Espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu, modelo 1650PC, duplo feixe), Cromatógrafo a líquido de alta eficiência equipado com bomba de LC-10AD, detector com compri-

mento de onda variável UV/Vis modelo SPD-10Avp, controlador SLC-10Dvp, integrador automático com software Class VP<sup>®</sup>, injetor automático SIL-10-Avp e forno para coluna CTO-10Asvp (SHIMADZU).

### Validação da metodologia analítica

O método proposto foi validado conforme Resolução RE 899, The United States Pharmacopeia e International Conference on Harmonization (Brasil, 2003; ICH, 1994; The United States Pharmacopeia, 2012).

### Seletividade

Para avaliação da seletividade foram preparadas soluções de cetoconazol SQR, amostra dos comprimidos e placebo simulado, na concentração 4,0 µg/mL, utilizando como diluente ácido clorídrico 0,1 M. Para cada solução preparada, o espectro de varredura foi obtido na faixa de 200 a 400 nm, utilizando o diluente como solução de compensação.

### Intervalo e Linearidade

Cerca de 25,0 mg de cetoconazol SQR exatamente pesados foram transferidos para balão volumétrico de 250 mL, com auxílio de ácido clorídrico 0,1 M. Desta solução, transferiram-se alíquotas para balões volumétricos de 50 mL obtendo concentrações finais de 0,5 a 8,0 µg/mL. A leitura foi efetuada em 223 nm, utilizando ácido clorídrico como branco. Este procedimento foi realizado em triplicata. A equação da reta foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e avaliada por análise de variância (ANOVA).

### Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O LD e o LQ do cetoconazol foram determinados a partir da curva analítica e calculados como  $3x\sigma/S$  e  $10x\sigma/S$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica.

### Precisão

A precisão foi avaliada através do estudo de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada partindo-se de três tomadas de ensaio da amostra, contendo o equivalente a 25,0 mg de cetoconazol, obtendo-se soluções nas concentrações de finais de 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL, realizados no mesmo dia e pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi obtida pela análise da amostra em três dias diferentes, por dois analistas diferentes, sendo as mesmas realizadas em triplicata, na concentração de 4,0 µg/mL. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) e, ainda, comparou-se os mesmos utilizando-se ANOVA.

### Exatidão

A exatidão, expressa em porcentagem, foi avaliada a partir da adição e recuperação de quantidades conhecidas de cetoconazol SQR, na amostra. Foram preparadas soluções nas concentrações finais de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 µg/mL, sendo a concentração da amostra constante de 2,0 µg/mL. O procedimento foi realizado em triplicata.

### Robustez

Para avaliar a robustez da metodologia, variou-se a marca do reagente ácido clorídrico (Nuclear® e Carlo Erba®), sua concentração, (0,08 M e 0,2 M) e o comprimento de onda de leitura (219 e 227 nm).

### Comparação de metodologias

Preparo da amostra para quantificação pelo método espectrofotométrico.

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, pesou-se o equivalente a 25,0 mg de cetoconazol e diluiu-se para 250 mL, com ácido clorídrico 0,1 M. Filtrou-se. Transferiu-se 2 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com o mesmo diluente, de modo a se obter solução final na concentração de 4,0 µg/mL. A leitura foi efetuada em 223 nm, utilizando ácido clorídrico como branco.

### Preparo da amostra para quantificação pelo método cromatográfico

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, pesou-se o equivalente a 0,1 g de cetoconazol e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 30 mL de metanol deixando em banho de ultrassom durante 30 minutos, após completa solubilização completou-se o volume com o mesmo solvente. Após filtração, diluiu-se o filtrado até concentração de 0,1 mg/mL utilizando metanol como solvente. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel composta por mistura de metanol e acetato de amônio a 0,5% (p/v) (95:5), fluxo de 1 mL/min, coluna octadecilsilano 250 x 4,6 mm (10 µm), volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de detecção de 225 nm (Farmacopeia Brasileira, 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seletividade

De acordo com a Resolução RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003), especificidade / seletividade “é a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz”. A seletividade do método foi avaliada através da pesquisa de possíveis interferentes dos excipientes dos comprimidos na determinação quantitativa do cetoconazol. De acordo com os espectros obtidos para a SQR, amostra e placebo (Figura 2) podemos observar que o método foi específico, demonstrando não haver interferência dos excipientes no comprimento de onda máxima de absorção (223 nm).

### Intervalo e linearidade

A linearidade é a “habilidade do método analítico em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente nas amostras, em um determinado intervalo de concentração”. O intervalo e a linearidade foram obtidos através da elaboração da curva analítica. De acordo com a RE 899, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação é de 0,99, sendo obtido um valor de 0,9997 para o intervalo e de 0,9999 para a curva analítica (Brasil, 2003).

A curva obtida nos permite inferir que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito, podendo ser utilizada para a extrapolação dos valores obtidos com a solução amostra (Figura 3).

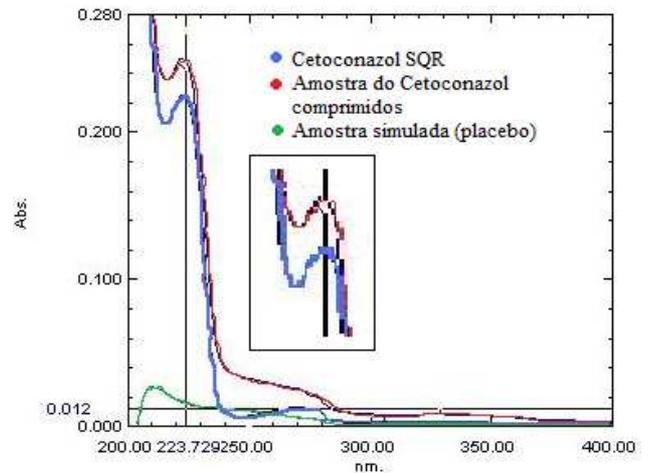


Figura 2. Espectro de absorção de cetoconazol SQR, amostra de cetoconazol comprimidos e amostra simulada dos excipientes (placebo) para determinação da seletividade do método

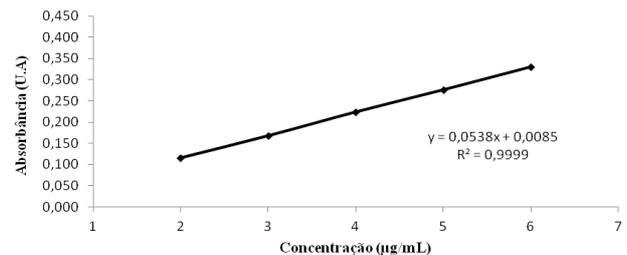


Figura 3. Representação gráfica da curva analítica média do cetoconazol, por método espectrofotométrico a 223 nm, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como diluente

### Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O Limite de Detecção (LD) é a “menor concentração de analito que pode ser detectada, não sendo necessariamente quantificada como um valor exato”, enquanto o Limite de Quantificação (LQ) é a “menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão” (ICH, 1994). Para o método desenvolvido, o limite de quantificação foi determinado em 0,52 µg/mL e limite de detecção foi estimado em 0,15 µg/mL.

### Precisão

A precisão do método analítico determina o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuada várias vezes em uma amostra homogênea. O valor de DPR (%), preconizado para este estudo é de 2,0%, segundo a The United States Pharmacopeia (2012), e de 5,0%, segundo a resolução RE nº 899 (Brasil, 2003). Conforme descrito na Tabela 1, o valor médio obtido nesta análise foi de 101,20% e desvio padrão relativo de 0,80%.

A precisão intermediária foi determinada em três dias diferentes por dois analistas. Os valores experimentais obtidos para as determinações da precisão intermediária de

cetoconazol comprimidos encontram-se descritos na Tabela 2. O desvio padrão relativo médio, para este ensaio foi de 1,28%.

Tabela 1. Resultados obtidos na análise da repetibilidade do método espectrofotométrico para cetoconazol comprimidos

Concentração da Amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)	Média $\pm$ DP	DPR (%)
2	100,93	102,48	1,39
	102,79		
	103,72		
4	101,15	100,53	0,71
	100,68		
	99,75		
6	100,91	100,60	0,31
	100,29		
	100,60		
Teor médio (%)		101,20	
DPR (%)		0,80	
ANOVA		<i>F calculado</i>	<i>F tabelado*</i>
Entre concentrações		4,20	5,1432

Tabela 2. Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de cetoconazol comprimidos, por método espectrofotométrico.

Dia	n	Analista 1	Analista 2	Média $\pm$ desvio padrão	DPR (%)
		Teor (%)	Teor (%)		
1	1	105,33	100,68	101,38 $\pm$ 1,40	1,37
	2	101,15	101,15		
	3	103,01	96,96		
2	1	104,87	105,33	104,09 $\pm$ 0,99	0,95
	2	102,54	103,94		
	3	103,94	103,94		
3	1	104,40	104,40	102,62 $\pm$ 1,55	1,52
	2	101,15	102,08		
	3	101,15	102,54		
Teor médio (%)				102,69	
DPR (%)				1,28	
ANOVA		<i>F calculado</i>		<i>F tabelado*</i>	
Inter-dias		1,96		3,68	
Inter-dias analista 1		0,59		5,14	
Inter-dias analista 2		2,06		5,14	

Os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária e da repetibilidade foram avaliados estatisticamente por ANOVA, a fim de determinar se houve diferença significativa entre as respostas encontradas nas diferentes concentrações e dias analisados. Conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2,  $F_{\text{calculado}}$  foi menor do que o  $F_{\text{tabelado}}$ , indicando que não há diferença significativa entre os resultados encontrados ( $p=0,05$ ). Esta análise foi realizada no sentido de complementar a avaliação do ensaio, porém cabe ressaltar que os critérios que estabelecem o aceite da precisão do método estão preconizados na Resolução RE n° 899, anteriormente citada.

### Exatidão

A exatidão do método analítico representa o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito. Os resultados experimentais médios, obtidos para os testes de exatidão, estão descritos na Tabela 3. Os limites preconizados para este teste são de 98% a 102% (Brasil, 2003; ICH, 1994;

USP 35, 2012).

Tabela 3. Valores experimentais médios obtidos para o teste de exatidão do cetoconazol, por método espectrofotométrico

Amostra	Concentração final	Média da quantidade de SQR recuperada	
	( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	(%)
R1	3	2,98	99,44
R2	4	4,0	100,00
R3	5	5,02	100,34
R4	6	6,03	100,56

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que para todas as concentrações experimentais utilizadas, os teores percentuais de recuperação encontram-se dentro dos limites especificados, o que permite concluir a adequada exatidão do método.

### Robustez

A robustez corresponde a capacidade de um método de resistir a pequenas modificações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o seu uso normal (Brasil, 2003). Os parâmetros analíticos modificados não apresentaram mudanças significativas no teor da amostra e da SQR, sendo que as variações foram inferiores a 1%, confirmando-se assim a robustez do método analítico.

### Comparação de metodologias analíticas

Os comprimidos de cetoconazol foram quantificados pelo método oficial e o método validado neste trabalho. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 4. Os limites especificados pela Farmacopeia Brasileira (2010), para esse fármaco são de, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da quantidade declarada de cetoconazol.

Tabela 4. Resultados obtidos no doseamento dos comprimidos de cetoconazol, pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico

Métodos	Resultados (%)	Média (%)	DPR (%)
Espectrofotométrico	101,15	100,53	0,71
	100,69		
	99,75		
Cromatográfico	100,44	100,30	0,13
	100,25		
	100,20		

Os resultados experimentais obtidos no doseamento do cetoconazol comprimidos foram comparados estatisticamente por teste *t*-Student a fim de avaliar a intercambiabilidade entre eles. Os resultados da análise comparativa demonstraram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com os diferentes métodos ( $p=0,05$ ) para a forma farmacêutica em estudo, sendo assim, o método analítico desenvolvido pode ser intercambiável com o método oficial em análises quantitativas do cetoconazol comprimidos.

## CONCLUSÃO

As condições analíticas estabelecidas no método por espectrofotometria na região do ultravioleta demonstraram seletividade, linearidade, precisão, especificidade, robustez e exatidão, adequadas para a determinação quantitativa de cetoconazol comprimidos. O método proposto no presente trabalho não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao método oficial, possuindo as vantagens de economia e facilidade de execução, podendo ser utilizado durante o processo de produção, quando se necessitam de análises rápidas, ou para avaliar o teor e a uniformidade de conteúdo dos comprimidos.

## REFERÊNCIAS

Abdel-moety EM, Aboual-alamein AM, Kelani KM, Khattab FI. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, 57(11): 931 - 938, 2003.

Abounassif AM, El-shazly BM. D1-differential potentiometric and proton NMR spectrometric determinations of ketoconazole and its formulations. *Anal. Lett.* 22(10): 2233 - 2247, 1989.

Agbaba D, Cudina O, Jankovic I, Velikinac I, Vladimirov S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. *Il Farmaco*. 59(5): 419 - 424, 2004.

Bebawy L, Kelani K. Spectrophotometric determination of some n-donating drugs using DDQ. *Anal. Lett.* 30(10): 1843 - 1860, 1997.

Bergold AM, Schapoval EE, Staub I. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. *Int. J. Pharm.* 292(1): 195 - 199, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 899, de 29 de maio de 2003.

Carazo JLS, losada LO, Sanjuan VP. Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Rev. Iberoam. Micol.* 16: 26 - 30, 1999.

Cevera LA, Vera JRM. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Rev. Esp. Quimioter.* 14(3): 45 - 51, 2001.

Detaevernier MR, Heyden YV, Massart DL, Nguyet ANM, Vercammen JP. Simultaneous determination of ketoconazole and formaldehyde in a shampoo: liquid chromatography method development and validation. *J. Chromatogr. A*. 958(1): 191 - 201, 2002.

Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 1448 p.

Goodman LS & Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. 1821 p.

Heyden YV, Massart DL, Nguyet ANM, Tallieu L, Vercammen JP. Validation of an HPLC method on short

columns to assay ketoconazole and formaldehyde in shampoo. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32(1): 1 - 19, 2003.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. Text on Validation of Analytical Procedures Q2B: Methodology, 1994.

Kedor-hackmann E, Nery MMF, Santoro MI. Determination of ketoconazole in Pharmaceutical preparations by ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 27(2): 363 - 376, 1994.

Korolkovas, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2011, 700 p.

Kulmann RR, Nogueira DR, Silva LM, Souza MJ, Zimmermann ES, Schmidt CA. Development and in-house validation of a microbiological assay for determination of cefepime in injectable preparations. *J. AOAC. Int.* 89(5): 1367 - 1373, 2006.

Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo: Atheneu, 1996, 792 p.

The United States Pharmacopoeia. 35. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2012. 5087 p.