



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

RAMON DE OLIVEIRA CARDOZO

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE
SUSPENSÃO OFTÁLMICA DE CETOCONAZOL

VITÓRIA

2022



RAMON DE OLIVEIRA CARDOZO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE
SUSPENSÃO OFTÁLMICA DE CETOCONAZOL**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane dos Santos Giuberti
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antonio de Oliveira

VITÓRIA
2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C268a Cardozo, Ramon de Oliveira, 1977-
Avaliação da estabilidade físico-química de suspensão oftálmica de cetoconazol / Ramon de Oliveira Cardozo. - 2022. 102 f. : il.

Orientadora: Cristiane dos Santos Giuberti.
Coorientador: Marcelo Antonio de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cetoconazol. 2. Estabilidade. 3. Controle de Qualidade. I. Giuberti, Cristiane dos Santos. II. Oliveira, Marcelo Antonio de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615.1

Ramon de Oliveira Cardozo


**Avaliação da estabilidade físico-química de suspensão
oftálmica de cetoconazol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.


Aprovado(a) em 29 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Cristiane dos Santos Giuberti (Orientadora) - UFES

Documento assinado digitalmente
 KARIANE MENDES NUNES
Data: 01/05/2022 17:20:48-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a. Dr^a. Kariane Mendes Nunes - UFOPA

Documento assinado digitalmente
 Guilherme Diniz Tavares
Data: 06/05/2022 10:11:08-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares - UFJF

**Vitória/ES
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI - SIAPE 1703761
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS
Em 29/04/2022 às 16:54

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/460031?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me proporcionar tudo tenho vivido ao longo desses anos, pelo amor que ele tem por todos nós, e dele que vem a minha salvação, ele me defende e me salva, e eu nunca serei derrotado.

Agradeço a minha esposa, Larissa, por todo o carinho, pela dedicação ao nosso amor, a nossa família, por estar sempre perto dando força nos momentos mais difíceis, dando uma palavra de conforto, me colocando pra cima.

Aos meus filhos, Lucas e João Vitor, que são nossa razão de viver, vivemos por eles, batalhamos por eles, meus parceiros.

Aos meus pais, Clemilda e Luciano, que abdicaram de várias coisas para eu poder realizar meus sonhos, por todos os esforços, dedicação e amor.

Ao meu sogro Silvio e minha sogra Bete, que sempre cuidaram de mim como se eu fosse um filho, costumo dizer que são como pais para mim, amo vocês.

Agradeço também ao meu sócio e cunhado, André, pelos momentos em que precisei me dedicar a este projeto, e ele sempre foi compreensivo e dedicado ao nosso propósito.

A meu co-orientador, Dr. Marcelo Antonio de Oliveira, pela sua nobreza, dedicação, por ter aceitado fazer parte deste projeto, sempre solícito, prestativo e de uma generosidade sem tamanho.

A minha orientadora, Dra. Cristiane dos Santos Giuberti, pelo privilégio de ter tido você como orientadora, pelas conversas, ensinamentos, boas idéias, paciência. Deixo meu sincero agradecimento por tudo, foi uma honra dividir essa experiência com você. Obrigado e fica com Deus.

RESUMO

O cetoconazol é um antifúngico pertencente a classes dos imidazóis e tem potencial terapêutico para tratamento de diversas infecções micóticas. Os fármacos antifúngicos utilizados nas clínicas oftálmicas são os polienos, azóis e os derivados pirimidínicos. Muitos antifúngicos estão tendo suas formulações adaptadas da forma sistêmica para o uso tópico oftálmico. O medicamento em estudo é uma formulação magistral, sob a forma de uma suspensão oftálmica, não apresentando informações quanto a sua conservação, armazenamento e tampouco em relação aos excipientes utilizados na fórmula. Devido à ausência de monografias oficiais de cetoconazol suspensão oftálmica, justifica-se o desenvolvimento e validação da metodologia analítica, assim como o controle de qualidade incluindo testes de estabilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade do cetoconazol suspensão oftálmica 5%, que é utilizado em um hospital público no Estado do Espírito Santo. Para a forma farmacêutica suspensão, foi realizada a adaptação do método da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição e a validação do método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência. Para tanto, foram realizados os testes de exatidão, precisão, seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção e quantificação, e robustez. Na metodologia analítica foi empregado metanol e água (95:5) como fase móvel, com fluxo de 1,0 mL/minuto, eluição isocrática, fase reversa, coluna RP-18 - 250 x 4,6mm (5 µm), comprimento de onda de 225 nm e temperatura de 25°C. O método analítico é linear na faixa de trabalho de 0,08 a 0,12 mg/mL, seletivo, sensível, preciso, exato e robusto. O estudo de degradação forçada foi realizado sob diferentes condições de estresse: hidrólises ácida, alcalina e neutra; ao peróxido de hidrogênio a 3%; à luz UV (254 e 365 nm), à luz natural e à temperatura de 60°C. O cetoconazol demonstrou ser estável frente a variadas condições de estresse, exceto para exposição por oxidação, exposição à luz UV e exposição à luz natural, onde o fármaco apresentou uma diminuição do seu teor. Nos ensaios de qualidade, foram feitos testes de identificação, pH, densidade, e teor nos períodos de zero (após abertura do frasco), 30, 60 e 90 dias. Para o teste de estabilidade, as amostras foram armazenadas em condições simuladas de temperaturas $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $75\% \pm 5\%$ (UR), durante 90 dias e avaliadas em relação às características organolépticas, densidade, pH, e teor. Nos estudos de estabilidade o teor do cetoconazol apresentou-se na faixa de 89,76 a 121,04 %, resultando em não

conformidade segundo a Farmacopeia Brasileira (2019). A viscosidade da suspensão foi um pouco maior que a viscosidade determinada no veículo farmacêutico. A concentração do fármaco presente na suspensão exerceu pouca influência na viscosidade da formulação final. Na análise da suspensão por microscopia foi possível observar a heterogeneidade das partículas, seguida de alterações morfológicas dos cristais. A suspensão oftálmica não apresentou alterações nas características organolépticas, pH e densidade durante o estudo. A formulação apresentou um volume de sedimento de 48% após 48 horas e um tempo de redispersão de 1 minuto e 44 segundos. O lote do produto analisado não apresenta uma homogeneidade adequada de teor do fármaco.

Palavras-chave: Estabilidade. Cetoconazol. Cromatografia. Validação. Suspensão oftálmica.

ABSTRACT

Ketoconazole is an antifungal that belongs to the imidazole class and has therapeutic potential for the treatment of many mycotic infections. The antifungal drugs used in ophthalmic clinics are polyenes, azoles and pyrimidine derivatives. Most of antifungals has been their formulations adapted systemically for topical ophthalmic use. The drug studied is the pharmaceutical active ingredient of a compounding medicine, as an ophthalmic suspension, with no information regarding its conservation, storage or in relation to the excipients used in the formula. Due to the absence of official monographs of ketoconazole ophthalmic suspension, the development and validation of the analytical methodology is justified, as well as the quality control including stability tests. The aim of this study was to evaluate the stability of ketoconazole ophthalmic suspension 5%, which is used in a public hospital in the State of Espírito Santo, Brazil. For the suspension pharmaceutical form, the Brazilian Pharmacopoeia 6th Edition method was adapted and the high-performance liquid chromatography analytical method was validated. For that, tests of accuracy, precision, selectivity, linearity, range, detection and quantification limit, and robustness were performed. In the analytical methodology were used methanol and water (95:5) as mobile phase, with a flow of 1.0 mL/minute, isocratic elution, reversed phase, column RP-18 - 250 x 4.6mm (5 μ m), length of wave of 225 nm and temperature of 25°C. The analytical method is linear in the working range from 0.08 to 0.12 mg/mL, selective, sensitive, precise, accurate and robust. The forced degradation study was carried out under different stress conditions: acid, alkaline and neutral hydrolysis; to 3% hydrogen peroxide; to UV light (254 and 365 nm), to natural light and at a temperature of 60°C. Ketoconazole will be stable to varying exposure, except for oxidation exposure, UV light exposure and natural light exposure, under exposure conditions at its content. In the quality tests, identification, pH, density and content tests were carried out in the periods of zero (after opening the bottle), 30, 60 and 90 days. For the stability test, the samples were stored in simulated conditions of temperatures 40 \pm 2°C and relative humidity of 75% \pm 5% for 90 days and evaluated in relation to organoleptic characteristics, density, pH, and content. In stability studies, the ketoconazole content presented in the range of 89.76 to 121.04%, resulting in non-compliance with the Brazilian Pharmacopoeia (2019). The suspension viscosity

values were slightly higher than those of the vehicles. The concentration of the drug in the suspension had little influence on the viscosity of the formulation. Analysis of the reflection by microscopy it was possible to observe the heterogeneity of the particles, followed by morphological changes of the crystals. The change of thermal suspension did not present in the organoleptic characteristics, pH and density of the study. The formulation presented a sediment volume of 48% after 48 hours and a redispersion time of 1 minute and 44 seconds. The product batch developed does not present an adequate homogeneous quality of drug content.

Keywords: Stability. Ketoconazole. Chromatography. Validation. Ophthalmic suspension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmulas estruturais dos compostos azólicos.....	20
Figura 2 – Estrutura química do cetoconazol	21
Figura 3 - Estrutura química do clotrimazol	21
Figura 4 - Estrutura química do itraconazol.....	22
Figura 5 - Estrutura química do fluconazol	22
Figura 6 - Compartimentos do olho humano	25
Figura 7 - Estrutura do olho humano	26
Figura 8 - Camadas da córnea	27
Figura 9 - Cromatograma da solução padrão-secundário de Cetoconazol, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm, utilizando metanol como solvente.....	60
Figura 10 - Espectro na faixa de 200 a 400 nm da banda da solução padrão - secundário de cetoconazol, obtido com recurso DAD.A figura 11 representa o espectro de absorção da solução amostra de cetoconazol. Nesse espectro ficou evidenciado que a solução amostra apresenta sua absorção máxima no mesmo comprimento de onda da solução padrão secundário, que junto com a análise dos cromatogramas ratifica presença de cetoconazol na amostra analisada.	61
Figura 11 - Espectro de absorção da solução amostra na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, utilizando metanol como solvente.....	61
Figura 12 - Cromatograma da solução padrão-secundário, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm.....	62
Figura 13 - Cromatograma da solução padrão secundário em 3D, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm.	62
Figura 14 - Cromatograma da solução amostra de Cetoconazol, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm, utilizando metanol como solvente.....	63
Figura 15 - Cromatograma da solução amostra e da solução do padrão-secundário (sobrepostos), obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm. Cromatograma da solução padrão (vermelho) - Cromatograma da solução amostra (azul).....	64
Figura 16 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 215 nm, usando diclorometano como solvente.....	65
Figura 17 - Espectro na região do UV da solução padrão, na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, usando diclorometano como solvente. Pico 1 - tempo de retenção 2,832 min - em azul. Pico 2: tempo de retenção 3,112 min,	

apresenta espectro de absorção semelhante ao do padrão quando usado metanol como solvente - em vermelho.	65
Figura 18 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 225 nm, obtido pelo uso do detector DAD, usando diclorometano como solvente.	66
Figura 19 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 245 nm, obtido pelo uso do detector DAD, usando diclorometano como solvente.	67
Figura 20 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 225 nm, obtido pelo uso do detector DAD, usando THF e metanol (50:50) como solvente.....	68
Figura 21 - Solução de uma mistura de THF e metanol (50:50) sem a presença do fármaco.	69
Figura 22 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 225 nm, segundo ensaio, utilizando metanol como solvente.....	70
Figura 23 - Espectro na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, da banda a solução padrão de cetoconazol, solvente - metanol.	70
Figura 24 - Cromatograma em 3D da solução padrão de cetoconazol, obtido com recurso de detector DAD, segundo ensaio utilizando metanol como solvente.	71
Figura 25 - Cromatograma em 3D da solução padrão de cetoconazol, obtido com recurso de detector DAD.....	72
Figura 26 - Cromatograma da solução da amostra de Cetoconazol suspensão em 225 nm, obtida com recurso de DAD, segundo ensaio utilizando metanol como solvente.....	72
Figura 27 - Espectro na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, da banda a solução da amostra de cetoconazol. Tempo de retenção do pico do padrão de 3,377 minutos.	73
Figura 28 - Curva de linearidade pelo método de análise por CLAE.....	75
Figura 29 - Cromatogramas da solução padrão de cetoconazol antes e após ser submetido a variadas condições de estresse. A detecção foi realizada em 225 nm.	81
Figura 30 - Características organolépticas das amostras no tempo zero e 90 dias de armazenamento a 40°C e 75% UR.	85
Figura 31 - Imagens representativas da suspensão durante o ensaio para determinação do volume de sedimentação nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas, após armazenamento por 90 dias à temperatura ambiente. Volume total antes da sedimentação = 10 mL.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos relacionados para seleção da fase móvel.....	44
Tabela 2 - Condições analíticas utilizadas com diclorometano como solvente.....	47
Tabela 3 - Condições analíticas otimizadas no segundo ensaio utilizando metanol como solvente.....	50
Tabela 4 - Concentração das soluções para análise de exatidão.....	53
Tabela 5 - Resultados obtidos na determinação da linearidade por CLAE.....	74
Tabela 6 - Resultados obtidos na determinação da repetibilidade por CLAE.....	76
Tabela 7 - Resultados obtidos na determinação da precisão intermediária por CLAE.....	77
Tabela 8 - Resultados obtidos pelo teste de recuperação, concentração em mg/mL.....	77
Tabela 9 - Resultados obtidos referentes aos limites de detecção e quantificação.....	78
Tabela 10 - Resultados obtidos para determinação da robustez por método de CLAE, utilizando metanol como solvente.....	79
Tabela 11 - Áreas do cromatograma e tempo de retenção (Tr) obtidas no estudo de degradação do cetoconazol, em banho-maria a 60°C.....	80
Tabela 12 - Análise do teor de cetoconazol das formulações armazenadas a 40° C e 75% UR - 0, 30, 60 e 90 dias.....	84
Tabela 13 - Análise do pH do cetoconazol suspensão oftálmicas 5% armazenadas a 40° C e 75% UR - período: 0, 30, 60 e 90 dias.....	85
Tabela 14 - Análise das densidades do cetoconazol suspensão oftálmicas 5% armazenadas a 40° C e 75% UR - período: 0, 30, 60 e 90 dias.....	86
Tabela 15 - Volume de sedimentação da suspensão de cetoconazol 5%, armazenados em temperatura ambiente, após 90 dias.....	89
Tabela 16 - Viscosidade da suspensão oftálmica de cetoconazol 5% e do veículo da suspensão, após 90 dias de armazenamento, à temperatura ambiente.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CTZ – Cetoconazol

Da - Dalton

DAD – Detector com arranjo diodo

DPR – Desvio Padrão Relativo

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HCl - Ácido Clorídrico

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

ICH – International Conference Harmonization

IFA - Insumo Farmacêutico Ativo

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

k' - Fator de Retenção

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

N- Número de Pratos Teóricos

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SPE - Solução Padrão Estoque

T_f - fator de cauda

THF - Tetraidrofurano

Tr - tempo de retenção

UR – Umidade relativa

USP – United States Pharmacopeia

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Histórico dos fármacos antifúngicos	19
2.2 Classificação dos antifúngicos.....	20
2.3 Compostos azólicos	20
2.4 Cetoconazol	22
2.5 Ceratites fúngicas.....	23
2.6 Estrutura e fisiologia ocular	24
2.7 Suspensões e formulações oftálmicas	27
2.8. Boas práticas de manipulação para medicamentos magistrais estéreis	30
2.9 Validação da metodologia analítica	31
2.9.1 Seletividade	34
2.9.2 Linearidade	34
2.9.3 Precisão.....	34
2.9.4 Exatidão.....	35
2.9.5 Limite de detecção.....	35
2.9.6 Limite de quantificação	35
2.9.7 Robustez	35
2.10. Estudo de degradação forçada.....	36
2.11 Estudo de estabilidade	38
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Substância Química Matéria Prima	42
4.2 Medicamento.....	42
4.3 Equipamentos e vidrarias	42
4.4 Otimização do método analítico por CLAE para determinação.....	43
4.4.1 Escolha da Fase Móvel.....	43
4.4.2 Condição Cromatográfica Otimizada.....	45
4.5 Ensaio preliminares para a escolha do solvente	45
4.5.1 Ensaio preliminar utilizando metanol como solvente (1º ensaio)	45

4.5.2 Ensaio preliminar utilizando diclorometano como solvente.	46
4.5.3 Ensaio preliminar utilizando tetraidrofurano (THF) e metanol como solvente	48
4.5.4 Ensaio preliminar utilizando metanol como solvente (2º ensaio)	49
5 Validação do método por CLAE	51
5.1 Linearidade	51
5.2 Precisão	51
5.3 Exatidão	52
5.4 Limite de detecção e quantificação.....	53
5.5 Seletividade.....	53
5.6 Robustez	54
6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	54
7 ESTUDO DE ESTABILIDADE	56
7.1 Identificação	56
7.2 Teor.....	57
7.3 Características organolépticas	57
7.4 Determinação do pH	57
7.5 Densidade	58
7.6 Análise da suspensão oftálmica por microscopia	58
8 VOLUME DE SEDIMENTAÇÃO	58
9 VISCOSIDADE	59
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
10.1 Seleção do solvente para extração do IFA a partir do medicamento	60
10.1.1 Análise cromatográfica utilizando metanol como solvente (1º ensaio)	60
10.1.2 Análise cromatográfica utilizando diclorometano como solvente.....	64
10.1.3 Análise cromatográfica utilizado Tetraidrofurano (THF) e metanol como solvente.	67
10.1.4 Análise cromatográfica utilizando Metanol como solvente (2ª ensaio).	69
11 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO POR CLAE.....	74
11.1 Linearidade	74
11.2 Precisão	75
11.3 Exatidão	77
11.4 Limite de detecção e quantificação.....	78
11.5 Seletividade.....	78
11.6 Robustez	78
12 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	79
13 ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	83

13.1 Identificação	84
13.2 Teor.....	84
13.3 Características organolépticas	85
13.4 Determinação do pH.....	85
13.5 Densidade	86
14 ANÁLISE DA SUSPENSÃO POR MICROSCOPIA.....	87
15 VOLUME DO SEDIMENTO.....	89
16 VISCOSIDADE.....	90
17 CONSIDERAÇÕES SOBRE PREPARAÇÕES MAGISTRAIS EM RELAÇÃO AO MEDICAMENTO EM ESTUDO.....	92
18 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

As ceratites são caracterizadas por qualquer processo inflamatório da córnea, sendo que em alguns casos podem evoluir para sequelas graves, como a perda da visão ou endoftalmite. As ceratites podem ser causadas por diferentes fatores, dentre eles os traumas oculares, uso de lentes de contato, infecções causadas por microorganismos (bactérias, fungos, vírus e protozoários), através do uso indiscriminado de alguns medicamentos (antibióticos) e uso de imunossupressores (MARUJO *et al.*, 2013; TORRADO *et al.*, 2013).

As ceratites micóticas são geralmente causadas por fungos das espécies *Fusarium*, *Aspergillus* e *Candida*, sendo o trauma ocular um dos principais fatores causadores da etiologia, se caracterizando como uma porta de entrada para a instalação desses microorganismos (THOMAS, 2003).

Um dos fármacos utilizados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é o cetoconazol. Este é classificado como antifúngico de amplo espectro, pertencente à classe dos imidazólicos. Seu mecanismo de ação se dá através da alteração da fluidez de membrana celular fúngica por inibição enzimática (CHOI *et al.*, 2019).

Alguns fármacos antifúngicos tiveram suas formas farmacêuticas sistêmicas adaptadas para a forma de colírios através de formulações magistrais, como o caso da anfotericina nas concentrações de 0,1 a 0,3%, itraconazol 1%, cetoconazol de 1 a 5% e miconazol 1% (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O sucesso da terapia antifúngica depende das concentrações alcançadas pelo fármaco no tecido ocular (SANDHAN, 2013; TORRADO *et al.*, 2013).

O cetoconazol suspensão oftálmica se apresenta como uma das alternativas para o tratamento de ceratites fúngicas. O medicamento em estudo é uma formulação magistral, sob a forma de uma suspensão oftálmica, não apresentando informações quanto a sua conservação, armazenamento e tampouco em relação aos excipientes utilizados na fórmula.

Devido à ausência de monografias oficiais de cetoconazol suspensão oftálmica, justifica-se o desenvolvimento e validação da metodologia analítica, assim como o controle de qualidade incluindo testes de estabilidade do produto após aberto, para garantir a segurança de utilização deste medicamento.

O estudo de estabilidade de um produto farmacêutico deve testar e evidenciar a qualidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) ou medicamento em função do tempo. A estabilidade poderá sofrer influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, assim como variações físicas e químicas em relação ao próprio produto (BRASIL, 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico dos fármacos antifúngicos

Rato e colaboradores (2018) relataram que as micoses superficiais atingem de 20 a 25 % da população a nível mundial, sendo *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, os principais gêneros responsáveis pela doença. Dentre os fatores relacionados com o aumento da incidência dos casos de infecções fúngicas podemos citar o uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro, utilização de fármacos imunossupressores em pacientes transplantados, uso de corticóides, aumento no número de caso de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), e também quimioterapias antineoplásicas (MULLER *et al.*, 2012). Tais condições citadas diminuem a flora local, aumentando a proliferação dos fungos.

Até meados de 1950, não existiam drogas antifúngicas de uso geral. Em 1951, Brown e Hazen, descobriram a utilização dos polienos na terapia antifúngica, sendo utilizado a nistatina para uso tópico, e a anfotericina para uso parenteral (SILVA, 2006).

No ano de 1970, ocorreram inúmeras incidências de infecções fúngicas, especialmente em pacientes submetidos a tratamentos quimioterápicos. Nesse mesmo período foram desenvolvidos alguns imidazólicos, como miconazol e clotrimazol, antifúngicos os quais são utilizados até hoje. O grupo dos azólicos, representado pelo cetoconazol (CTZ), exerceu um grande avanço na terapia antifúngica, principalmente devido ao largo espectro de ação e facilidade de administração por via oral (MARTINEZ, 2006).

Durante a década de 1980, o cetoconazol administrado por via oral se tornou o fármaco de primeira escolha na terapia antifúngica, por apresentar um amplo espectro de atividade contra a maioria das espécies do gênero *Candida* (SILVA, 2006).

Posteriormente, na década de 1990, foram desenvolvidos os triazólicos, representados pelo fluconazol e itraconazol, apresentando uma maior eficácia e segurança em relação aos antifúngicos anteriores (CARRILLO-MUNÓZ *et al.*, 2006).

Após o advento dos triazóis, novos fármacos antifúngicos foram introduzidos no mercado, a exemplo do voriconazol e posaconazol. A introdução desses novos fármacos tinha como objetivo obter uma melhor resposta terapêutica para o tratamento das infecções, assim como redução de efeitos colaterais ao hospedeiro (ARAÚJO, 2008).

2.2 Classificação dos antifúngicos

Os fármacos antifúngicos podem ser classificados de acordo com os critérios químicos, no qual podemos citar o grupo dos polienos (anfotericina B), azóis (itraconazol, fluconazol), pirimidinas (5 – fluorocitosina) e as equinocandinas (caspofungina) (ALVES *et al.*, 2021).

De acordo com os critérios clínicos podem ser classificados como antifúngicos sistêmicos, para tratamento de infecções sistêmicas (anfotericina B, flucitosina e azóis), antifúngicos sistêmicos para infecções mucocutâneas (griseofulvina, terbinafina) e antifúngicos para uso tópico (nistatina, azóis tópicos, alilaminas tópicas) (ARENAS *et al.*, 2012)

2.3 Compostos azólicos

Os antifúngicos azóis são um grupo de agentes sintéticos com amplo espectro de atividade antifúngica. Eles estão divididos em duas classes, os imidazóis e os triazóis, que apresentam os mesmos mecanismos e espectro de ação, se diferenciando um do outro de acordo com o número de átomos de nitrogênio, 2 e 3, respectivamente. Na figura 1 estão apresentadas as fórmulas estruturais dos compostos azóis: (A) Anel imidazólico e (B) Anel triazólico.



Figura 1 - Fórmulas estruturais dos compostos azólicos

Fonte: (CATALÁN e MONTEJO, 2006)

Dentre os fármacos comercializados, os imidazóis são representados pelo cetoconazol, clotrimazol, miconazol, isoconazol, econazol e oxiconazol. Dois antifúngicos da classe dos imidazólicos estão apresentados na figura 2 e 3. Já na classe dos triazóis temos o itraconazol, fluconazol, voriconazol e terconazol. As fórmulas estruturais do itraconazol e fluconazol estão apresentadas nas figuras 3 e 4.

Estes apresentam atividade antifúngica contra infecções causadas por *Candida sp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatides*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton sp.*, *Microsporium sp.*, e *Cryptococcus neoformans* (STAUB, 2005)

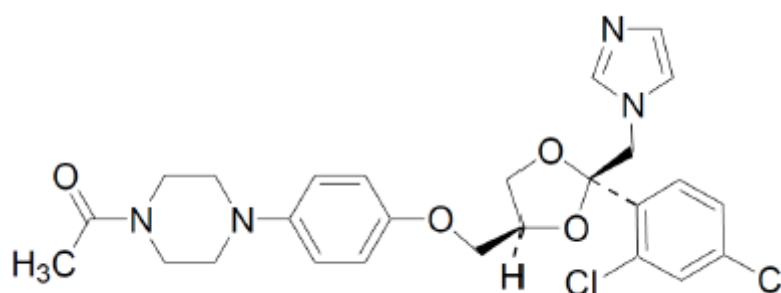


Figura 2 – Estrutura química do cetoconazol

Fonte: (LOPES, 2019)

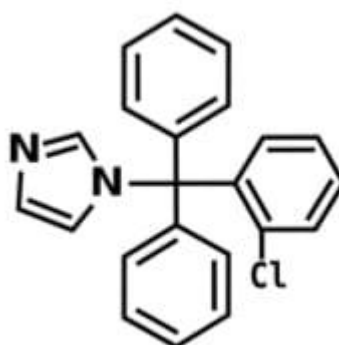


Figura 3 - Estrutura química do clotrimazol

Fonte: (FRANÇA, 2014)

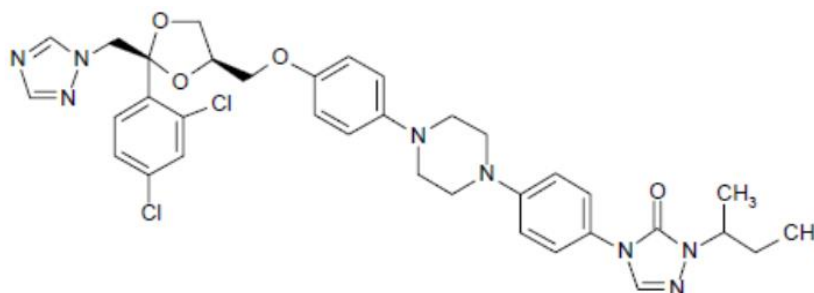


Figura 4 - Estrutura química do itraconazol Fonte: (CAZEDEY *et al.*, 2007)

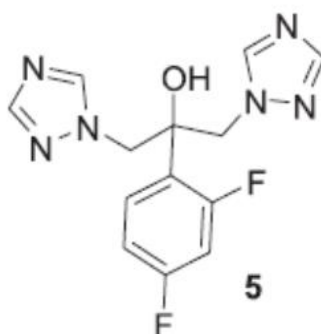


Figura 5 - Estrutura química do fluconazol Fonte: (SANGI, 2016)

2.4 Cetoconazol

O cetoconazol foi o primeiro fármaco da classe dos azóis a ser administrado por via oral para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. É bem absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo metabolizado no fígado e eliminado na bile e urina. Sua meia-vida plasmática é de 8 horas (RITTER *et al.*, 2020).

É um antifúngico sintético, derivado imidazólico de amplo espectro de ação, efetivo no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas, sendo apresentado em diversas formas farmacêuticas (SANTOS *et al.*, 2009). O cetoconazol é produzido por uma mistura racêmica de 2 (dois) enantiômeros (CREEMER *et al.*, 2021).

Os enantiômeros são substâncias que apresentam a mesma fórmula molecular, porém se diferem em relação ao seu arranjo espacial. Em razão de sua semelhança estrutural, dois compostos diferentes podem apresentar as mesmas características físico-química, dificultando seu processo de separação e identificação em uma possível análise (PORTE *et al.*, 2014).

Seu mecanismo de ação ocorre por inibição da 3^a (terceira) enzima do citocromo P450, lanosina 14 alfa-desmetilase, sendo essa enzima responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, que é o principal esterol da membrana celular fúngica, alterando a fluidez da membrana, alterando assim na ação de enzimas associadas à membrana (RITTER *et al.*, 2020).

Creemer e colaboradores (2021) descreveram a atividade *in vitro* do levocetoconazol, um enantiômero do cetoconazol, para o tratamento de pacientes com Síndrome de Cushing, por inibição da síntese de cortisol.

Apresenta fórmula molecular C₂₆H₂₈Cl₂N₄O₄, seu ponto de fusão é 146°C, e seu peso molecular é 531,44 Da, seu registro CAS: 65277-42-1, com denominação química cis-1-Acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil) -2-(1H-imidazol-1ilmetil) -1,3-dioxolan-4-il] metoxi] fenil] piperazina. Apresenta-se como um pó branco, praticamente insolúvel em água, solúvel em clorofórmio e metanol (BRASIL, 2019). Sua fórmula estrutural está apresentada na figura 2.

2.5 Ceratites fúngicas

O primeiro caso de ceratite fúngica foi descrito por Leber, em 1879. Vários fatores influenciam o início do processo infeccioso micótico, seu prognóstico e sua evolução. As principais condições de risco de evolução da doença estão associadas a alteração da microbiota normal pelo uso de corticosteróides tópicos, uso de lentes de contato, lesão do epitélio da córnea por traumas, cirurgias, uso de drogas imunossupressoras e em pacientes imunologicamente comprometidos (SALERA *et al.*, 2002).

As ceratites micóticas são infecções ulcerativas causadas por fungos. É uma doença de início lento, sendo que muitas das vezes os sintomas podem permanecer despercebidos por um longo período desde o contato com o fungo (TORRADO *et al.*, 2013).

Em algumas situações as ceratites fúngicas podem ser confundidas com uma conjuntivite comum, o que agrava o tratamento, devido ao tempo transcorrido desde o contato e o tipo de tratamento realizado (TORRADO *et al.*, 2013).

De acordo com Thomas (2003), as ceratites micóticas são causadas em sua grande maioria por fungos filamentosos (especialmente do gênero *Fusarium* e *Aspergillus*), e fungos leveduriformes (*Candida*).

As ceratites apresentam maior incidência em países em desenvolvimento e de clima tropical. O trauma ocular tem sido responsável por 48 a 65% dos casos de úlcera de córnea, principalmente em jovens que trabalham em zonas rurais. Enquanto em países desenvolvidos e de clima temperado, um dos principais fatores de risco é o uso de lentes de contato, com 52%, sendo o trauma ocular responsável por 27% dos casos (MARUJO *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado por Lozano e colaboradores (2019), num total de 53 pacientes com úlcera de córnea, 69,8% era do sexo masculino, com idade entre 45 e 65 anos. Desse total de pacientes avaliados, 56,6% apresentavam condição socioeconômica baixa. Em relação à atividade laboral, 26,4% eram agricultores, e apresentavam um histórico de lesão na córnea causado por trauma (69,8%).

Os resultados de estudos microbiológicos apontaram que 15,1% eram fungos do gênero *Fusarium sp.*, 1,9% *Aspergillus sp.* nas infecções fúngicas e 24,5% eram bactérias *Estafilococos coagulase negativa* nas infecções bacterianas (LOZANO *et al.*, 2019).

2.6 Estrutura e fisiologia ocular

De acordo com Torrado e colaboradores (2013), às ceratites micóticas podem afetar além da córnea, outros tecidos oculares como humor vítreo e retina. Os fungos são incapazes de penetrar pelo epitélio corneano intacto. A invasão do microrganismo se dá quando ocorre alguma lesão do epitélio, podendo ser causado por uma simples abrasividade pelo uso de lentes de contato ou até mesmo por trauma da córnea causada por materiais vegetais (folhas, galhos) (NESSO *et al.*, 2018).

Os fungos penetram através de um defeito no epitélio da córnea, chegando até o estroma corneal. No estroma, os fungos podem se multiplicar, desencadeando um processo inflamatório, podendo em algumas situações causar necrose tecidual. A patogenicidade irá depender das substâncias químicas produzidas pelos fungos e da resposta imune do hospedeiro (TORRADO, 2013).

Um dos grandes desafios na terapia das doenças oculares, estão relacionados ao tempo de ação do fármaco no globo ocular, a biodisponibilidade e absorção do fármaco através dos tecidos oculares (CHOLKAR *et al.*, 2013).

As diferentes características anatômicas, a diversidade de fatores fisiológicos e bioquímicos são responsáveis pela regulação da absorção dos fármacos nas terapias das doenças oculares (CHOLKAR *et al.*, 2013).

Além das barreiras impostas pela estrutura ocular, fatores como concentração, peso molecular, ionização e solubilidade do fármaco, são características primordiais para absorção e biodisponibilidade das formulações oftálmicas (ALMEIDA *et al.*, 2021).

A estrutura do olho humano está dividida em dois compartimentos, sendo a parte anterior ou externa do olho composta pela córnea, conjuntiva, cristalino, íris e humor aquoso, e o compartimento ocular posterior ou interno sendo formado pela esclera, retina, coroide, humor vítreo e nervo ótico (CHOLKAR *et al.*, 2013). A figura 6 ilustra os compartimentos do olho humano.

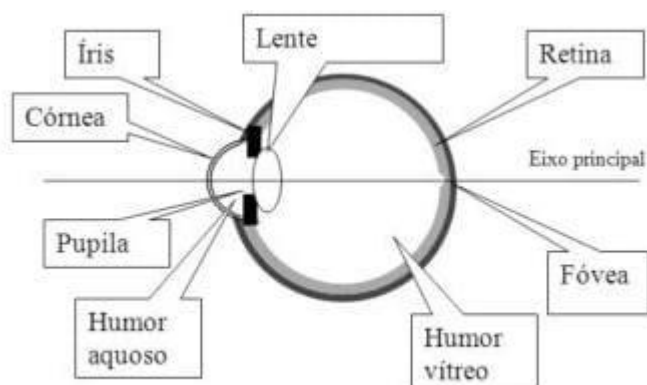


Figura 6 - Compartimentos do olho humano

Fonte: (HELENE e HELENE, 2011).

Considerada como via de escolha devido a facilidade de auto aplicação e ação local de forma imediata, a via tópica de administração oftálmica apresenta desafios relacionados às barreiras de proteção do olho humano (KAUR *et al.*, 2008).

O ato de piscar os olhos, associada a uma grande produção lacrimal em curto espaço de tempo, faz com que as drogas instiladas nos tratamentos oftálmicos, sejam rapidamente removidas da superfície ocular, associada também a baixa permeabilidade da córnea (KAUR *et al.*, 2008).

A córnea se apresenta como uma estrutura não vascularizada, apresentando característica de proteção mecânica, impedindo a absorção de fármacos administrados topicamente, impedindo que o fármaco atinja tecidos mais profundos (ALMEIDA *et al.*, 2021; CHOLKAR *et al.*, 2013). As camadas que compõem e conferem as características de proteção a córnea são compostas pelo epitélio corneano, estroma e endotélio (SINGH *et al.*, 2020). A figura 7 representa a estrutura do olho humano e a figura 8 representa as camadas da córnea.

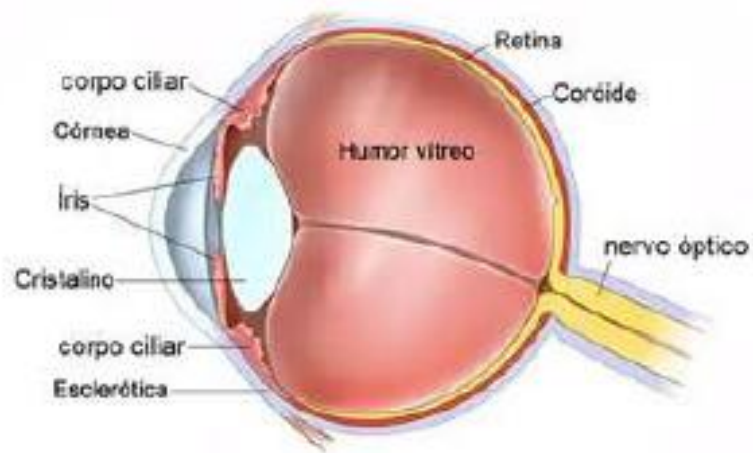


Figura 7 - Estrutura do olho humano

FONTE: (CAPELINI, 2019).

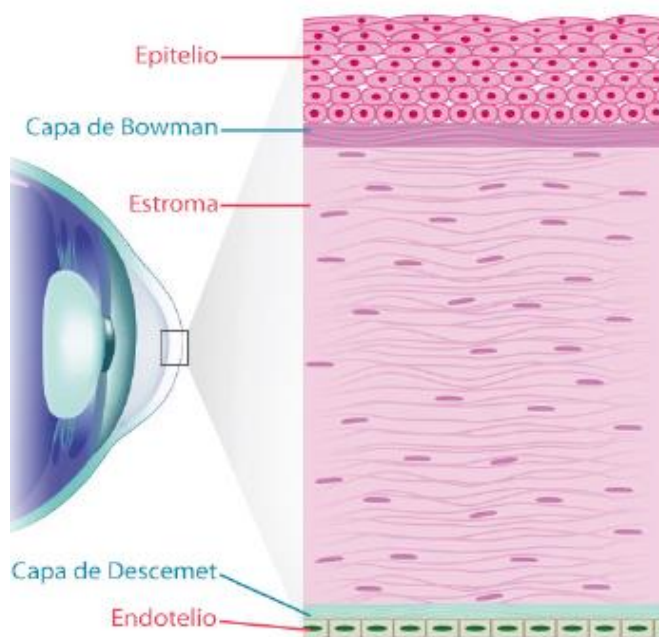


Figura 8– Camadas da córnea

FONTE: (TORRADO, 2013).

2.7 Suspensões e formulações oftálmicas

As suspensões são formas farmacêuticas líquidas que contêm partículas sólidas dispersas em um veículo líquido, no qual as partículas não são solúveis. Na suspensão, o fármaco é caracterizado como a forma dispersa, enquanto o veículo é a forma dispersante (BRASIL, 2019).

As suspensões podem ser disponibilizadas sob a forma líquida, e prontas para uso ou na forma de pó, para serem dispersas em veículos específicos. Elas devem ser preparadas quando o insumo farmacêutico ativo é insolúvel no veículo almejado ou não apresenta estabilidade na solução (ALDRICH *et al.*, 2013). As orientações em relação à conservação e armazenamento, devem ser observadas no intuito de garantir a manutenção das propriedades físico-químicas e eficácia terapêutica do fármaco (GOES e KFURI, 2005).

As formulações oftálmicas são produtos farmacêuticos com o propósito de serem utilizados nas estruturas externas ou internas do olho. A utilização dos medicamentos na estrutura externa do olho se dá através da administração medicamentosa tópica (colírios, pomadas), e na estrutura interna através de aplicações intraocular e periocular (UDDIN *et al.*, 2017).

Dentre as formas farmacêuticas oftálmicas podemos destacar as pomadas, colírios, lágrimas artificiais e soluções para lentes de contato. Os colírios podem ser soluções, suspensões ou emulsões oftálmicas estéreis, usadas com finalidade terapêutica ou profilática (CHACRA, 1994).

De acordo com Aldrich e colaboradores (2013) o uso da forma farmacêutica suspensão é utilizada quando se deseja um maior tempo de contato da droga com a superfície corneana. Neste trabalho o autor destaca que o tamanho da partícula do fármaco não deve ser superior a 10 μm , o que poderia causar um certo desconforto no olho após a instilação do medicamento (ALDRICH *et al.*, 2013).

Kaur e colaboradores (2008), descrevem que compostos com peso molecular acima de 500 Dalton (Da), como cetoconazol e anfotericina, estão relacionados com uma menor absorção no tecido corneano, devido a uma menor difusão destes compostos, relacionado a barreira de proteção ocular.

Os antioxidantes são utilizados nas formulações para prevenção do processo oxidativo, atuando na eliminação do elemento desencadeador da oxidação ou através da prevenção por inibição de radicais que dão origem ao processo oxidativo (LOMBARDO, 2020).

Os conservantes microbiológicos utilizados nas preparações oftálmicas mantêm sua segurança durante sua preparação, conservação e uso, inibindo a proliferação de microrganismos através da atividade antibacteriana (LOMBARDO, 2020). Exemplos de conservantes microbiológicos utilizados nas preparações oftálmicas são: cloreto de benzalcônio, parabenos, clorobutanol (SENA *et al.*, 2014).

Os agentes de viscosidade são substâncias utilizadas nas formulações com objetivo de aumentar ou melhorar a viscosidade da formulação, reduzindo assim a sedimentação das partículas. As variações da viscosidade nas formulações podem afetar a estabilidade da formulação, através da alteração do comportamento reológico (KULSHRESTHA *et al.*, 2010). Nas formulações oftálmicas, os agentes de viscosidade podem inibir ou diminuir os efeitos causados pelo mecanismo de defesa ocular, aumentando o tempo de permanência da formulação na superfície ocular, aumentando a mucoadesividade da formulação, melhorando a penetração nos tecidos oculares e sua ação terapêutica (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Os agentes de viscosidade mais utilizados na produção de formulações oftálmicas são hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose, álcool polivinílico atuam como agentes suspensores,

proporcionando uma melhor estabilidade física das partículas do fármaco nas suspensões oftálmicas (UDDIN *et al.*, 2017).

A eficácia do tratamento terapêutico utilizando suspensões oftálmicas, irá depender dos níveis de concentração do fármaco que permeará nos tecidos oculares, assim como o peso molecular, ionização e hidrofobicidade das moléculas do fármaco (SINGH *et al.*, 2020).

A sensibilidade dos olhos requer a preparação de formulações oftálmicas compatível com as características do fluido lacrimal em relação ao seu pH (7,4 – 7,7), osmolaridade (290 – 318 mOsm) e limpidez. O fluido lacrimal apresenta uma osmolaridade semelhante à de uma solução de cloreto de sódio 0,9 % (p/v) e em determinadas situações toleram melhor formulações hipertônicas em relação às hipotônicas (VILARINO, 2019).

A estrutura ocular tolera intervalos de pH entre 3,5 – 8,5. Porém para prevenir possíveis risco de irritação, se recomenda manter o pH das formulações oftálmicas o mais próximo do fluido lacrimal. Para o ajuste do pH ao final das preparações oftálmicas deve ser levado em conta em relação a estabilidade química, solubilidade e absorção do fármaco (VILARINO, 2019).

O pH das formulações oftálmicas tem influência nos processos de estabilização do fármaco presente na formulação, solubilização e absorção (FRONZA *et al.*, 2004). Alterações em relação ao pH das formulações podem ocasionalmente resultar em um processo de oxidação, acarretando a perda de estabilidade da formulação, diminuição da solubilidade e em algumas situações levando a precipitação do fármaco (BRUNALGH *et al.*, 2019).

O cetoconazol pode sofrer alterações físico-químicas, através de processo de degradação, tais como hidrólise e oxidação. A exposição do cetoconazol à luz ultravioleta, provoca a alteração da coloração do fármaco (STAUB *et al.*, 2007). Staub e colaboradores (2007) descrevem que o processo de oxidação do cetoconazol em meio ácido, pode provocar alteração na cor do fármaco, mudando a cor de branco para rosa, principalmente em formulações tópicas.

Staub (2005), realizou um estudo de fotoestabilidade do cetoconazol presente em xampus. Neste trabalho foram isolados e identificados dois produtos de degradação através de ressonância magnética nuclear (RMN). Os dois produtos isolado foram: 1 - acetil - 4 - {4 - [2 - (2 - clorofenil) - 2 -(1H - imidazolil - 1 - metil) - 1,3 - dioxolanil - 4 - metoxi] fenil} piperazina) e 1 - acetil - 4 - {4 - [2 - (4 - clorofenil) - 2

- (1*H* - imidazolil - 1 - metil) - 1,3 - dioxolanil - 4 - metoxi] fenil} piperazina) (STAUB, 2005).

As suspensões oftálmicas devem apresentar uma tonicidade próxima ao do fluido lacrimal, que é igual a de uma solução de cloreto de sódio 0,9 % (p/v). Os olhos podem também tolerar soluções oftálmicas equivalentes de 0,5 a 1,8% do cloreto de sódio. Os agentes comumente utilizados nas preparações oftálmicas para o ajuste da tonicidade são cloreto de sódio e dextrose (PRIYANKA *et al*, 2015).

2.8. Boas práticas de manipulação para medicamentos magistrais estéreis

A RDC nº 67/2007 dispõe de requisitos mínimos para as boas práticas de manipulação de preparações oficinais e oficiais de uso humano, assegurando a qualidade físico-química e microbiológica de todas as preparações (BRASIL, 2007). A produção de formulações estéreis deve ser realizada em áreas limpas, com padrões de limpezas apropriados, devendo existir neste local de fabricação de produtos estéreis um programa de monitoramento ambiental, assegurando a qualidade microbiológica das áreas de manipulação, através de seus respectivos registros de controle (BRASIL, 2007).

Batistuzzo e Lima (2011) descrevem que o preparo das suspensões oftálmicas deve obedecer a algumas particularidades em relação ao pH, estabilidade, esterilidade e tonicidade. O preparo dessas formulações é realizado em ambientes estéreis, não isentando o fabricante de realizar os testes de controle de esterilidade de produto, que deverá apresentar ausência de microrganismos durante toda a etapa de fabricação.

A rotulagem das formulações magistrais deve obedecer a procedimentos operacionais escritos, que assegurem tanto ao consumidor quanto aos órgãos fiscalizadores, informações objetivas em relação ao processo de fabricação, armazenamento e devidos cuidados em relação ao uso desse produto (ALMEIDA *et al.*, 2020; BRASIL, 2007).

De acordo com as norma de rotulagem da RDC/ANVISA nº 67/2007 todas preparações magistrais devem apresentar em sua rotulagem as seguintes informações: nome do prescritor, nome do paciente, data da manipulação, prazo de validade, número de registro da formulação no livro de receituário, componentes da

formulação com respectivas quantidades, número de unidades, peso ou volume contidos, posologia, identificação da farmácia, CNPJ, endereço completo e nome do farmacêutico técnico responsável com o respectivo número no Conselho Regional de Farmácia.

2.9 Validação da metodologia analítica

O processo de validação do método analítico tem a finalidade de demonstrar que o método produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, assim comprovando de forma documentada e mediante objetivos que ele atende a todos os critérios de aceitação (BRASIL, 2017; ICH Q2 (R1), 2005).

De acordo com Ribani e colaboradores (2004), através de um processo bem definido e documentado, todo o processo regulatório da nova metodologia implantada, oferece aos órgãos reguladores informações precisas e objetivas, a fim de que esse novo método gere informações confiáveis.

Conforme descrito na RDC ANVISA nº 166/2017 para utilização de método analítico não descrito em compêndio oficial, é necessária a realização de uma validação desse método analítico, de acordo com os parâmetros descritos nesta resolução. Se um método analítico existente for modificado, ou uma nova metodologia foi desenvolvida, deverá ser assegurado que as características de desempenho do método atendam aos requisitos analíticos desejados (INMETRO, 2003).

Diferentes métodos analíticos de identificação e quantificação de cetoconazol foram descritos em algumas literaturas, principalmente na forma de comprimidos e xampus. Mendonça e colaboradores (2009) validaram a metodologia para quantificação cetoconazol 2% em emulsão O/A, através de espectrofotometria ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 244 nm.

Kedor-Hackamann e colaboradores (2006) desenvolveram e padronizaram, métodos para quantificação de cetoconazol em emulsão. Na espectrofotometria UV, foi usado metanol como solvente e comprimento de onda de 257 nm. Na determinação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi empregado uma coluna RP-18 (5 µm), na fase móvel uma mistura de trietilamina em metanol (1:500) e solução de acetato de amônio em água (1:200) (75:25 v/v) e comprimento de onda de 225 nm.

Rubim e colaboradores (2012) desenvolveram metodologia analítica para comprimidos de cetoconazol, através de espectrometria em UV, onde foi comparado com metodologia descrita para cetoconazol comprimido, análise por CLAE, descrita na Farmacopeia Brasileira (2010). Para a determinação por espectrometria em UV foi utilizado um espectrofotômetro UV/Vis, a amostra de cetoconazol comprimido para a quantificação foi diluída em ácido clorídrico 0,1 M e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 223 nm. A condição analítica proposta por espectrofotometria em UV atendeu os parâmetros de validação analítica, se mostrando como um método alternativo quando se busca economia e praticidade na realização da análise.

Em outro estudo, Saurabh e colaboradores (2020) desenvolveram e validaram uma metodologia para determinação de cetoconazol comprimido por espectrometria UV-visível, utilizando tampão fosfato pH 6,8 como fase móvel, comprimento de onda 208 nm, demonstrando que o método atende os requisitos de especificidade, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez do acordo com as diretrizes ICH (2005).

Vertzoni e colaboradores (2006), otimizaram e validaram metodologia por CLAE, para determinação de cetoconazol em plasma canino, usando uma coluna de fase reversa, Hypersil BDS-C18, 250 mm x 4,6 mm (5 μ m), fase móvel de metanol, água e dietilamina (74:26:0,1).

Venishetty e colaboradores (2006) validaram uma metodologia analítica por CLAE de uma mistura binária de docetaxel e cetoconazol, utilizando acetonitrila como solvente, fase móvel contendo acetonitrila 0,2%, trietilamina (pH 6,0) e ácido fosfórico (48:52 v/v), comprimento de onda de 230 nm, coluna 250 x 4,5 mm (5 μ m) e fluxo de 1mL/min. O método se mostrou eficaz, demonstrando bom resultado nos parâmetros analíticos do processo de validação.

Barrios e colaboradores (2011) utilizaram uma combinação de solventes para realizar a extração e validação de um método analítico para o adapaleno. Os solventes utilizados foram acetonitrila, tetrahydrofurano e metanol (2,5; 5,0; 2,5 v/v), nas respectivas proporções. Essa suspensão apresentava nanocápsulas de adapaleno, compostas por óleo de melaleuca (porção oleosa) e poli- ϵ -caprolactona (polímero), apresentando um grande grau de dificuldade de extração. A utilização da combinação de solventes buscou solubilizar o polímero e o fármaco. A condição foi otimizada utilizando uma coluna LiChrospher® 100 RP-18, 250 x 4 mm (5 μ m), fluxo

de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20µL, comprimento de onda de 254 nm, fase móvel contendo metanol: água (95:5 v/v), acidificada com ácido fosfórico (pH 3,0). O método obteve um percentual de recuperação do fármaco em torno de 99,1 a 101,4%, nas diferentes concentrações analisadas.

A cromatografia líquida de alta eficiência se apresenta como um método capaz de realizar separações e análises, em uma grande variedade de amostras, em curto tempo de análise, com alta sensibilidade e eficiência (COLLINS *et al.*, 2006).

Até o momento não foram encontradas monografias oficiais e nem metodologias analíticas para doseamento de cetoconazol 5% na forma farmacêutica de suspensão oftálmica, sendo necessário o desenvolvimento e validação do método por CLAE. Foram encontradas várias metodologias para outras formas farmacêuticas (SAURABH *et al.*, 2018; Kedor-Hackmann *et al.*, 2006; Rubim *et al.*, 2012).

A Farmacopeia Americana (USP – 29) apresenta metodologia para a suspensão oral e comprimido. A condição cromatográfica descrita recomendada para suspensão oral é comprimento de onda de 223 nm, coluna analítica de 4,6 mm x 250 mm, temperatura da coluna de 30°C, com fluxo da fase móvel de 1 mL/min e volume de injeção de 5µl.

Na Farmacopeia Brasileira (2019), são descritas metodologias analíticas para as formas de cetoconazol comprimido e xampu. A condição cromatográfica para comprimidos utiliza comprimento de onda de 225 nm, coluna empacotada com sílica ligada ao grupo octadecilsilano de 250 x 4,6 mm (3 a 10 µm), fluxo de 1,0 mL/minuto, temperatura de 25°C, fase móvel com uma mistura de metanol e acetato de amônio a 0,5% (p/v) (95:5) (BRASIL, 2019).

A condição cromatográfica para xampu utiliza detector UV a 232 nm, coluna empacotada com sílica ligada ao grupo octadecilsilano, com 250 x 4.6 mm (5 µm), temperatura de 40°C e fluxo da fase móvel de 1,5 mL/minuto (BRASIL, 2019). A fase móvel é composta de uma mistura de acetonitrila, metanol, tetrahidrofurano e tampão fosfato pH 7,0 (390:95:15:500), acrescentando 2,5 mL de tetrametilamônio a 25 % em metanol, filtrada e desgaseificada (BRASIL, 2019).

Os parâmetros de desempenho analítico utilizados em um processo de validação são: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão

intermediária), exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (BRASIL, 2017; ICH Q2 (R1), 2005).

Sendo assim faz-se necessário o desenvolvimento e validação da metodologia analítica através da cromatografia líquida de eficiência, para a obtenção de dados, demonstrando que o método proposto produz resultados confiáveis e precisos.

2.9.1 Seletividade

Na determinação da seletividade o método analítico deverá apresentar resposta através da identificação e quantificação para aquele analito de interesse, independente da presença de outros componentes que possam fazer parte da amostra, como componentes da matriz, diluentes e impurezas (BRASIL, 2017).

2.9.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método demonstrar resultados através de respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. A relação linear deverá ser avaliada em toda faixa estabelecida para o método. Deverá ser utilizada, no mínimo 5 (cinco), concentrações diferentes de SQR preparadas em, no mínimo, triplicata (BRASIL, 2017).

2.9.3 Precisão

Na precisão deve ser analisada a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Deve ser expressa por meio da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Deve ser avaliada pela dispersão dos resultados calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições (BRASIL, 2017). A repetibilidade das amostras deverá ser analisada sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação. Na precisão os seguintes critérios são obedecidos: resultados obtidos de uma mesma amostra, pelo menos dois dias diferentes, operadores distintos e no mesmo laboratório (BRASIL, 2017). A

reprodutibilidade se aplica em padronizações de métodos analíticos em compêndios oficiais, por meio de resultados obtidos em diferentes laboratórios (BRASIL, 2017).

2.9.4 Exatidão

A exatidão é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Deverá ser determinada através de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta (três réplicas cada nível) (BRASIL, 2017).

2.9.5 Limite de detecção

Deve ser demonstrado pela detecção da menor quantidade do analito presente na amostra, não sendo necessário sua quantificação. (BRASIL, 2017)

2.9.6 Limite de quantificação

Está relacionado a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições analíticas estabelecidas (BRASIL, 2017).

2.9.7 Robustez

A avaliação da robustez deverá ser considerada no desenvolvimento do método analítico, devendo trazer a confiabilidade da análise em relação a capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método analítico (BRASIL,2017; ICH, 1996).

2.10. Estudo de degradação forçada

O estudo de degradação forçada, consiste na submissão do insumo farmacêutico ativo (IFA) ou produto farmacêutico acabado, a determinadas condições de estresse, avaliando a estabilidade intrínseca da molécula e a formação de possíveis produtos de degradação (BLESSY *et al.*, 2014).

Para estudo de degradação forçada devem ser incluídos os testes de efeitos de temperatura, umidade, oxidação, hidrólise e luz. Os testes de estresse devem ser utilizados para identificar se o IFA ou produto farmacêutico acabado é particularmente sensível a determinadas condições anormais submetidas (BRASIL, 2019).

Conforme a RDC 318/2019, para a realização do estudo de degradação, as amostras deverão ser submetidas às seguintes condições de degradação: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica.

De acordo com Silva e colaboradores (2009), o objetivo deste estudo de degradação é obter uma degradação do composto em torno de 10 a 30%, e não a degradação total do composto.

Tian e colaboradores (2016) realizaram um estudo de degradação forçada em comprimidos contendo cetoconazol e beauvericina. A combinação dos dois fármacos foi exposta nas seguintes condições de estresse: 0,1 M de ácido clorídrico (HCl); 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 3% por um período de 24 horas. Já no estudo de degradação térmica a amostra foi colocada em banho-maria a temperatura de 60°C durante 24 horas. No estudo de degradação por atividade fotolítica, a amostra foi submetida 1,2 milhões de lux por um período de 14 dias (TIAN *et al.*, 2016).

O cetoconazol apresentou uma diminuição de 6,4%; 51,1% e 9,6% % após exposição ao ácido clorídrico 0,1 M, peróxido de hidrogênio 3% e à exposição fotolítica, respectivamente. Já beauvericina apresentou um percentual de degradação de 12,3 e 0,1 % após exposição ao hidróxido de sódio 0,1 M e a exposição fotolítica, respectivamente (TIAN *et al.*, 2016).

Staub e colaboradores (2010) realizaram um estudo de fotodegradação em formulações magistrais e de xampu de cetoconazol. Tanto a formulação magistral, quanto o produto industrializado foram expostos a luz UV, nos comprimentos de onda de 254 e 352 nm durante 24 horas e analisados a cada 2 horas.

As análises foram realizadas em HPLC (Shimadzu – LC 10AD), por cromatografia de fase reversa, com eluição isocrática. Foi utilizada uma coluna LiChrospher RP-8 (5 µm) – (150 mm x 4,6 mm). A fase móvel era constituída de metanol, acetato de amônio e água na proporção de 0,0025:3:7 (p/v/ v) fluxo de 1,0 mL/minuto, comprimento de onda de 225 nm e temperatura da coluna de 20°C. Após o período de exposição e análises, foram isolados e identificados dois produtos de degradação através de espectrometria de massas (STAUB *et al.*, 2010).

Muchtaridi e colaboradores (2018) realizaram um estudo de degradação forçada em seis fármacos da classe das estatinas (atorvastatina, sinvastatina, fluvastatina, pitavastatina, pravastatina e rosuvastatina). Para tanto, as amostras foram expostas a estressantes ácidos, básicos, térmicos, oxidativos e fotolíticos, em concentrações e tempo de exposição diferentes. Neste trabalho foi observado que todas as estatinas submetidas às condições de estresse apresentaram degradação em todas as condições estressantes dependendo da concentração e período de exposição.

De acordo com os resultados deste estudo a Atorvastatina (ATV) apresentou uma degradação do seu teor de 86,14% quando submetida a hidrólise neutra a 80°C. Já no estudo de estresse oxidativo a ATV apresentou uma degradação de 52,23% e 45,32% quando submetido a H₂O₂ 3% e 30%, respectivamente (MUCHTARIDI *et al.*, 2018).

A sinvastatina (SIN) foi praticamente toda degradada quando exposta a condições ácidas (1 M HCl a 50°C). A Sinvastatina degradou também quando foi exposta a estresse oxidativo por H₂O₂ 3% a 50°C e hidrólise neutra a 90°C, porém se mostrou estável frente a hidrólise alcalina (1M NaOH a 50°C) e fotólise (UV por 24 horas) (MUCHTARIDI *et al.*, 2018).

2.11 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade tem o propósito de prover informações precisas quanto a variação da qualidade de um medicamento ou insumo farmacêutico ativo (IFA) em função do tempo, diante de fatores ambientais, como luz, umidade, temperatura e gases (oxigênio e dióxido de carbono) (BRASIL, 2019).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos, além de fatores extrínsecos, depende também de fatores relacionados ao próprio produto, os chamados fatores intrínsecos, que são as propriedades físico-químicas dos princípios ativos e excipientes, composição da forma farmacêutica, pH, tipo de embalagem (BRASIL, 2019).

De acordo com a forma farmacêutica, principalmente em se tratando de emulsões e suspensões, o tamanho e a polaridade das partículas presente, influem diretamente na estabilidade dos produtos farmacêuticos (BRASIL, 2019).

Fatores relacionados ao próprio produto, tais como propriedades físicas e químicas, excipientes, formas farmacêuticas, processo de fabricação podem também alterar a qualidade do produto. A análises físicas, químicas, microbiológicas e toxicológicas devem ser cumpridas, para assegurar a qualidade do medicamento, garantindo sua estabilidade durante seu prazo de validade, ou mesmo após a sua abertura, e subseqüentes aberturas da embalagem primária (BRASIL, 2019).

As alterações que venham acontecer extrapolando os limites de aceitação pré determinados no que diz respeito às características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas dos produtos farmacêuticos podem colocar em risco a eficiência e segurança dos produtos (BRASIL, 2019).

O estudo de estabilidade tem a função de avaliar se um determinado produto resistirá a condições adversas por determinado período, em condições de armazenamento pré-estabelecidas, buscando assim avaliar de maneira antecipada, possíveis alterações na estabilidade do produto em estudo.

No estudo de estabilidade das formulações magistrais, não são atribuídos um prazo de validade para esses produtos e sim um prazo de uso, ou seja, uma data limite para o uso, que pode ser de dias até alguns meses, diferente do que se pratica nos produtos industrializados, conhecidos como especialidades farmacêuticas (BRASIL, 2019).

A definição para o prazo de uso dos produtos magistrais apresenta variabilidade de uma formulação para a outra, e deve ser levado em consideração os excipientes da formulação, o princípio ativo, forma farmacêutica, embalagem e o processo de preparo dos produtos, além de conhecimentos em relação a estabilidade, compatibilidade e degradação dos componentes da formulação (BRASIL, 2019).

Diante disso, torna-se necessário o estudo de estabilidade do fármaco, assegurando a qualidade e segurança, durante todo o período proposto para seu uso, ou seja, avaliando as características físicas, químicas e microbiológicas durante todo seu prazo de validade, sob determinadas condições de conservação e armazenamento.

Grindi e colaboradores (2012), desenvolveram um estudo de estabilidade acelerada em formulação de xampu de cetoconazol. Para realização deste estudo foram utilizadas duas formulações magistrais de xampu de cetoconazol, além de medicamentos de referência, similares e genéricos, todos com concentração final de 2%. As amostras foram armazenadas durante 180 dias, em 4 °C, 25 °C e 40 °C a uma umidade relativa (UR) de 70%, onde foram analisadas em relação ao aspecto, pH, densidade, viscosidade e teor (GRINDI *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos por Grindi e colaboradores (2012) indicaram que tanto as formulações manipuladas quanto as industrializadas não sofreram alterações de pH e densidade, nas condições de 4 °C, 25 °C e 40 °C a 70%UR durante o período de análise proposto. Já em relação ao aspecto, as formulações comerciais se mantiveram estáveis em temperatura de 4 °C e 25 °C, não apresentando alterações de cor e odor.

Porém, as formulações magistrais não apresentaram alterações de cor e odor quando submetidas a temperatura de 4 °C, mas na condição de armazenamento de 25 °C, apresentou pequenas alterações em relação ao aspecto no final do período do teste (GRINDI *et al.*, 2012).

Peraro (2001) em seu trabalho avaliou a estabilidade de formulações farmacêuticas industrializadas e manipuladas de cetoconazol sob a forma de creme, submetidas a diferentes condições de umidade, temperatura e tempo, avaliando as características organolépticas, pH e viscosidade.

As amostras foram armazenadas nas seguintes condições: 10 °C e 75%UR, 40 °C e 75%UR e 50 °C e 90%UR. Para a obtenção de 75%UR as amostras foram colocadas em um dessecador com solução saturada de acetato de sódio. Já para a obtenção de 90%UR as amostras foram colocadas também em um dessecador contendo água destilada em seu interior. Ambas as umidades foram medidas com a ajuda de um termo-higrômetro (PERARO, 2001).

As amostras armazenadas a 10 °C e 40 °C (75%UR) não sofreram alterações em relação ao aspecto, cor e odor durante os 63 dias de análise. As amostras armazenadas a 50 °C ao final dos 63 dias de análises se apresentaram totalmente liquefeitas. O pH das amostras não apresentou variações significativas durante o período de análise (PERARO,2001).

Em relação a viscosidade, as amostras armazenadas a 40 °C e 75%UR apresentaram um aumento da viscosidade no decorrer dos dias. Já as amostras armazenadas a 10 °C e 75%UR apresentaram um leve aumento da viscosidade já no final do período da análise. As amostras submetidas a 50 °C e 90%UR tiveram sua viscosidade diminuída, em relação às análises iniciais da amostra (PERARO, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a estabilidade físico-química de uma formulação farmacêutica oftálmica magistral contendo cetoconazol.

3.2 Objetivos específicos

Otimizar e validar a metodologia analítica para suspensão oftálmica de cetoconazol por meio de CLAE;

Realizar análises de qualidade de identificação, aspecto, pH, densidade, teor da suspensão oftálmica de cetoconazol.

Realizar estudo de degradação forçada do fármaco sob diferentes condições de estresse;

Avaliar estabilidade físico-química do medicamento, por 90 dias (zero, 30, 60 e 90), sob exposição à temperatura de $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa de $75\% \text{UR} \pm 5\% \text{ (UR)}$;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substância Química Matéria Prima

Foi utilizada um padrão secundário de cetoconazol, lote número KET/11902075, da marca Purifarma, data de fabricação: 01/02/2019, data de validade: 31/01/2024, com análise de certificação do fabricante, adquirido em um comércio local.

4.2 Medicamento

O objeto de estudo foi uma suspensão oftálmica manipulada de cetoconazol 5%, lote nº: 210911544 - Validade: 13/12/2021

4.3 Equipamentos e vidrarias

- Balança analítica de precisão (Marca: Shimadzu - AY220)
- Pipetadores automáticos
- Balões volumétricos de 25 mL, 50 mL, 100 mL e 200mL
- Ultrassom (Marca: Ultra Clean morrer - 1400)
- Câmara de lâmpada UV (254 e 365 nm) – (Marca: Biotech – Modelo - BT- 107)
- Seringas de plástico de 10 mL
- Filtros de membrana Polietersulfona (PES) Milipore (0,45 µm)
- Vials (2,0 mL)
- Bomba a vácuo (LT65 -Limatec)
- Destilador (Marca: Quimis)
- Mesa agitadora (Marca: Quimib)
- Banho Maria (Marca: Quimis – Modelo – 03344-18)
- Peagâmetro (M5 Tecnopon Modelo mPA - 210)
- Estufa Digital (Sterilifer)
- Microscópio Binocular Eclipse E-200 LED

- Provetas 10 mL

4.4 Otimização do método analítico por CLAE para determinação

A condição de análise foi otimizada por CLAE, utilizando um equipamento da Marca Waters®, provido de automação e auto injetor, apresentando detector UV/DAD (detector de arranjos diodo). O comprimento de onda utilizado foi de 225 nm. Foi utilizada uma coluna de fase reversa, coluna RP-18, com comprimento de 250 mm e diâmetro interno de 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 μm .

O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, contendo na fase móvel uma mistura metanol e água (95:5). A performance cromatográfica (“system suitability”) foi avaliada através dos seguintes parâmetros de conformidade, de modo a verificar a capacidade analítica do método, sistema e coluna: fator de retenção (k'), número de pratos teóricos (N) e fator de cauda (Tf) (BRASIL,2019).

4.4.1 Escolha da Fase Móvel

A seleção da fase móvel foi baseada em trabalhos descritos na literatura, e de acordo com esses levantamentos os solventes foram escolhidos para a otimização do método, levando em consideração a polaridade, toxicidade, custo e a lipofilicidade do analito (Tabela 1).

Tabela 1 - Trabalhos relacionados para seleção da fase móvel

Método	Fase Móvel	Forma Farmacêutica	Referência
1	Metanol e acetato de amônia 0,5% (p/v) (95:5)	Comprimido	Brasil (2019)
2	Diisopropilamina em metanol (1:500) /acetato de amônio (1:200) (7:3)	Comprimido	USP (2005)
3	Mistura de solução A e B / solução A: monoisopropilamina-metanol (2:500, V/V) / Solução B:acetato de amônio-água (1:200, p/v) -ajuste pH 5,5 com ácido acético	Comprimido	Staub (2005)
4	2,55 g de hidrogenossulfato de tetrabutilamônio em 750 mL de água e diluir em acetonitrila	Suspensão oral	USP (2005)
5	Acetato amônio, dioxano, metanol (20:40:40, v/v/v)	Comprimido	European Pharmacopeia (2007)

4.4.2 Condição Cromatográfica Otimizada

A CLAE foi realizada por cromatografia de fase reversa, utilizando uma coluna cromatográfica RP 18 - 250 mm x 4,6 mm (5 µm), comprimento de onda de 225 nm. O volume injetado foi de 20,0 µL, com fluxo da fase móvel de 1,0 mL/minuto e temperatura de 25°C.

4.5 Ensaios preliminares para a escolha do solvente

Na realização dos ensaios preliminares para obtenção de uma melhor solubilização da amostra, foram testados os solventes diclorometano, acetonitrila, ácido clorídrico, metanol e uma mistura de metanol e tetraidrofurano (THF) (50:50). O desenvolvimento e validação da metodologia foi adaptada de acordo com a metodologia descrita para doseamento de cetoconazol comprimido, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019). Algumas alterações foram realizadas, objetivando-se a otimização do método para identificação e quantificação do cetoconazol na formulação oftálmica.

4.5.1 Ensaio preliminar utilizando metanol como solvente (1º ensaio)

a) Preparo da solução padrão de cetoconazol

Foram pesados 100 mg de CTZ matéria-prima. O material pesado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL de metanol. O balão foi posto em banho de ultrassom, durante 15 minutos para completa solubilização do fármaco. Após esse período, o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Dessa diluição foram retirados 5 mL com pipeta volumétrica e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com metanol, obtendo uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 µm).

b) Preparo da solução amostra

Foi retirada uma alíquota de 1 mL de *pool* de suspensão oftálmica de CTZ a 5% e foi transferido para um balão de 50 mL com o auxílio do metanol. O balão foi levado ao ultrassom por 15 minutos e logo após o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL.

A solução foi filtrada em papel de filtro, desprezando-se inicialmente 10 mL do filtrado, sendo o restante recolhido em um béquer. Desse filtrado, foram aliqüotados 5 mL com auxílio de pipeta volumétrica e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com metanol, obtendo uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 µm).

c) Condição analítica utilizada

- Comprimento de onda: 225 nm
- Coluna cromatográfica: RP 18 – (250 mm x 4,6mm), 5 µm
- Volume de injeção: 20,0 µL
- Fluxo da Fase Móvel: 1,0 mL/minuto
- Temperatura: 25°C
- Fase móvel: metanol: água (95:5 v/v) – eluição isocrática

4.5.2 Ensaio preliminar utilizando diclorometano como solvente.

a) Preparo da solução padrão de cetoconazol

Inicialmente foram pesados 100 mg de CTZ matéria-prima. O material pesado foi transferido para um balão volumétrico de 100mL com o auxílio do diclorometano. Posteriormente o balão volumétrico foi posto em banho de ultrassom, durante 15 minutos, para solubilização.

Ao término do período, o balão foi retirado do ultrassom e seu volume foi completado com diclorometano, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL. Dessa solução foram retirados uma alíquota de 5 mL com pipeta volumétrica e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com diclorometano, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 µm).

b) Preparo da solução amostra

Foi retirada uma alíquota de 1 mL de *pool* de suspensão oftálmica de CTZ à 5% e foi transferido para um balão de 50 mL com o auxílio do diclorometano. O balão foi levado ao ultrassom por 15 minutos e logo após o término do tempo, seu volume foi completado com diclorometano, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Dessa solução foram extraídas uma alíquota de 5 mL com pipeta volumétrica e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com diclorometano, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 µm) e distribuída em vials.

Nessa metodologia proposta utilizando diclorometano, foram utilizadas diferentes condições analíticas com a finalidade de se obter uma melhor resolução cromatográfica. Na tabela 2 estão descritas as condições analíticas utilizadas usando diclorometano como solvente.

Tabela 2 - Condições analíticas utilizadas com diclorometano como solvente.

Condição analítica	Comprimento de onda (nm)	Volume injeção (µl)	Fluxo mL/minuto	Temperatura °C	Fase Móvel *
1 ^a	215	20,0	1,0	25	95:5
2 ^a	225	10,0	1,2	22	93:7
3 ^a	245	10,0	1,2	22	90:10

Fase móvel*: metanol e água

4.5.3 Ensaio preliminar utilizando tetraidrofurano (THF) e metanol como solvente

a) Preparo da solução padrão de cetoconazol

Inicialmente foram pesados 100 mg de CTZ, matéria-prima em balança analítica. O material pesado foi transferido para um balão volumétrico de 100mL com o auxílio de uma mistura de metanol e THF (50:50). Posteriormente o balão volumétrico foi levado ao ultrassom, durante 15 minutos para solubilização.

Ao término do período, o volume foi completado com metanol e tetraidrofurano na proporção de 50% de cada solvente, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL. Dessa solução foram extraídas uma alíquota de 5 mL com pipeta volumétrica e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com uma mistura de solvente de THF e metanol (50:50), obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL.

A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 μ m). Devido a toxicidade dos solventes, os mesmos foram manuseados dentro da capela de fluxo laminar.

b) Preparo da solução amostra

Foi retirada uma alíquota de 1 mL de *pool* de suspensão oftálmica de CTZ à 5% e foi transferido para um balão de 50 mL com o auxílio de uma mistura dos solventes THF e metanol (50:50).

O balão foi levado ao ultrassom por 15 minutos e após, seu volume foi completado com a mistura THF: metanol, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Dessa solução foi retirada uma alíquota de 5 mL com pipeta volumétrica e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com THF e metanol (50:50), obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 μ m).

c) Condição analítica utilizada

Comprimento de onda: 225 nm

- Coluna cromatográfica: RP 18 – (250 mm x 4,6mm - 5 μ m)

- Volume de injeção: 20,0 μ l

- Fluxo da Fase Móvel: 1,0 mL/minuto
- Temperatura: 25°C
- Fase móvel: metanol: água (95:5 v/v) – eluição isocrática

4.5.4 Ensaio preliminar utilizando metanol como solvente (2º ensaio)

a) Preparo da solução padrão de cetoconazol

Para o preparo da solução padrão foi mantido o mesmo método de solubilização e condição analítica do primeiro ensaio. Inicialmente foram pesados 100 mg de CTZ matéria-prima. O material pesado foi transferido para um balão volumétrico de 100mL com o auxílio do metanol. Posteriormente o balão volumétrico foi levado ao ultrassom, durante 15 minutos para solubilização.

Ao término do tempo, o balão foi retirado do ultrassom e seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL. Foi extraída uma alíquota de 5 mL com pipeta volumétrica dessa solução é transferida para um balão volumétrico de 50 mL, posteriormente seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com filtro de membrana (0,45 µm).

b) Preparo da solução amostra

Para a preparação da solução amostra neste segundo ensaio, algumas etapas da metodologia foram alteradas em relação a do primeiro ensaio com metanol. Foi retirada uma alíquota de 1 mL de *pool* de suspensão oftálmica de CTZ à 5% e foi transferido para um balão de 50 mL, seu volume foi completado com 80 % de sua capacidade com metanol.

O balão foi levado a uma mesa agitadora por 24 horas. Posteriormente o balão foi colocado no ultrassom por 25 minutos e logo após o término do tempo, seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração final de 1,0 mg/mL. O balão volumétrico ficou em repouso por 20 minutos para sedimentação do óleo presente na formulação.

A dispersão foi filtrada com papel de filtro, desprezando-se inicialmente 10 mL do filtrado, sendo o restante recolhido em um béquer. Desse filtrado, foi retirada uma alíquota de 5 mL, transferida para um balão volumétrico de 50 mL, seu volume foi

completado com metanol, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL. A amostra foi filtrada com seringa e filtro Milipore PES (0,45 µm).

No segundo ensaio utilizando metanol como solvente, foram feitos procedimentos analíticos padronizados em relação ao tempo de 24 horas na mesa agitadora, 25 minutos em ultrassom, 20 minutos de repouso, e filtração da solução da amostra. Na tabela 3 estão descritas as condições analíticas no segundo ensaio utilizando metanol como solvente.

Tabela 3 - Condições analíticas otimizadas no segundo ensaio utilizando metanol como solvente.

Parâmetros analíticos	1ª condição	2ª condição
Comprimento de onda	225 nm	225 nm
Volume de injeção	20,0 µl	20,0 µl
Fluxo da Fase Móvel	1,0 mL/minuto	1,0 mL/minuto
Temperatura	22°C	30°C
Fase móvel: metanol e água	90:10	95:05

*Coluna cromatográfica: RP 18 – (250 mm x 4,6 mm)

5 Validação do método por CLAE

O desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE para a substância em estudo foi realizado conforme descrito nas diretrizes da RDC ANVISA nº 166/2017.

No presente estudo foram avaliados os parâmetros de adequação do sistema, linearidade, seletividade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez do método por CLAE.

5.1 Linearidade

Para determinação da linearidade foi preparada uma solução padrão de estoque de CTZ. Foi pesado 200 mg de CTZ matéria prima, na qual foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL com o auxílio do metanol; em seguida foi completado o volume com metanol, a fim de se obter uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Em seguida a avaliação da linearidade foi realizada pela preparação de cinco concentrações diferentes, onde foram retiradas alíquotas de 4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5 e 6,0 mL, foram transferidas para um balão de 50 mL, e então seus volumes foram completados com metanol, obtendo-se concentrações de 0,08 mg/mL, 0,09 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,11 mg/mL e 0,12 mg/mL, correspondendo a uma concentração de faixa de trabalho de 80% a 120%.

A determinação da linearidade foi feita em cinco concentrações diferentes, em triplicata para cada concentração. Foi realizada uma curva analítica, de acordo com as médias das concentrações, onde foram descritas: a representação gráfica em função da concentração do analito, a avaliação da associação linear pelos coeficientes de correlação e determinação e a equação de reta de regressão de y em x.

5.2 Precisão

A precisão foi expressa por dois resultados diferentes, ou seja, através de repetibilidade e da precisão intermediária. Na determinação da repetibilidade, as amostras foram avaliadas por um mesmo analista, em uma única corrida.

Na otimização da precisão intermediária, as amostras foram analisadas por analistas distintos, em dias diferentes, ou seja, foram analisadas em dois dias. Foi pesado 200 mg de cetoconazol matéria-prima, em seguida foi transferido para um balão volumétrico de 200 mL. Em seguida seu volume foi completado com metanol, obtendo uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Foram transferidas alíquotas de 4,0; 5,0 e 6,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, seus volumes foram completados com metanol, obtendo-se concentrações de 0,08; 0,1 e 0,12 mg/mL.

Para a avaliação da precisão foram utilizadas as concentrações: 0,08; 0,1 e 0,12 mg/mL, correspondentes às concentrações baixa, média e alta, respectivamente. As concentrações foram preparadas em triplicata e no segundo dia o mesmo procedimento foi realizado para a determinação da precisão intermediária. As análises foram expressas em DPR.

5.3 Exatidão

Para a determinação da exatidão do método, foi avaliada a partir de adição e recuperação de quantidades conhecidas de cetoconazol padrão secundário na amostra. Para determinação da exatidão, foi transferido 1 mL de suspensão oftálmica 5% de CTZ (50mg/mL) para um balão volumétrico de 50mL e posteriormente seu volume foi completado com metanol, obtendo uma concentração final de 1,0 mg/mL.

Dessa diluição, foram retiradas 3 (três) alíquotas, e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo cada balão 2,5 mL de solução amostra a 1 mg/mL. Foi adicionado 2mL de solução do padrão estoque de cetoconazol (SPE a 1 mg/mL) no primeiro balão (0,08 mg /mL), 2,5mL de solução padrão no segundo balão (0,1 mg/mL) e 3 mL de solução padrão no terceiro balão (0,12 mg/mL). Seus volumes foram completados com metanol. Foram obtidas 3 (três) concentrações diferentes, ou seja, concentração: baixa, média e alta. A amostras foram analisadas em triplicata para cada concentração obtida.

Tabela 4 - Concentração das soluções para análise de exatidão.

	C1* (mg/mL)	C2** (mg/mL)	C3*** (mg/mL)
1	0,10	0,08	0,18
2	0,10	0,10	0,20
3	0,10	0,12	0,22

* **C1** - concentração do analito na amostra não fortificada

** **C2** - concentração do analito adicionada à amostra fortificada

*** **C3** - concentração do analito na amostra fortificada

Para realizar o cálculo de exatidão será utilizada a seguinte fórmula:
 (%) = $(C_2 - C_1) / C_3 \times 100$ (SCHWANZ e MORH, 2012).

5.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi demonstrado a partir da inclinação na curva analítica e do desvio padrão do intercepto. As fórmulas da equação são:

$$LD = 3,3 \frac{DP \alpha}{IC} \quad (1)$$

IC

$$LQ = 10 \frac{DP \alpha}{IC} \quad (2)$$

IC

Logo, DP α é o desvio padrão do intercepto do eixo Y, sendo obtido através de 3 curvas de calibração; IC é a inclinação da curva de linearidade.

5.5 Seletividade

Para determinação da linearidade foi preparada uma solução padrão de estoque de CTZ. Foi pesado 200 mg de CTZ matéria prima, na qual foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL com o auxílio do metanol; em seguida foi completado o volume com metanol, a fim de se obter uma concentração final de 1,0 mg/mL. Dessa solução foi retirado 5 mL e transferido para um balão volumétrico de 50 mL e, então, o volume foi completado com metanol, obtendo uma concentração final de 0,1 mg/mL.

A seletividade foi demonstrada através do estudo da estabilidade intrínseca, descrita no item 6, onde foi observada a pureza cromatográfica do cetoconazol com recurso do detector DAD.

5.6 Robustez

Para a determinação da robustez do método, determinados parâmetros para análise por CLAE foram modificados em relação ao método otimizado, como: alteração da proporção da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo da fase móvel.

Foi feita a alteração da proporção do solvente orgânico da fase móvel, metanol e água, em relação a proporção inicial (96:4). O fluxo da fase móvel também foi alterado para 1,2 mL/minuto, assim com a temperatura, que também foi aumentada para 30°C.

6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da molécula e a formação de possíveis produtos de degradação, o CTZ foi submetido a condições forçadas de estresse, para avaliação da estabilidade intrínseca. As condições utilizadas foram:

Hidrólise ácida: inicialmente foi adicionado 5 mL de solução padrão estoque (1 mg/mL) em um balão volumétrico de 50 mL contendo 10 mL de HCl 0,1M. O volume foi completado até a capacidade de 80% do balão e foi levado ao banho-maria por 4 horas, a 60° C.

Hidrólise básica: foram adicionados 5 mL de solução de padrão secundário (1 mg/mL) em um balão volumétrico de 50 mL. Nesse mesmo balão foram adicionados 10 mL de NaOH 0,1 M. O volume do balão foi completado com metanol até 80% de sua capacidade, e posteriormente este balão foi levado ao banho-maria a 60°C, por 4 horas.

Hidrólise neutra: 5 mL da solução de padrão secundário de cetoconazol (1 mg/mL), foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL. Neste mesmo balão foram adicionados 10 mL de água destilada, sendo o volume do balão completado até a capacidade de 80% e levado ao banho-maria por 4 horas, a 60°C.

Exposição ao peróxido de hidrogênio: para preparação do peróxido de hidrogênio a 3%, 3 mL de peróxido de hidrogênio a 30% foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, e posteriormente seu volume foi completado com água destilada. Dessa solução foi extraída uma alíquota de 10 mL e transferida para um balão de 50 mL. Neste mesmo balão foi adicionado uma alíquota de 5 mL de solução de padrão secundário de cetoconazol (1 mg/mL), sendo seu volume completado posteriormente até 80% da sua capacidade com metanol, sendo este balão levado a banho-maria a 60° C, por 4 horas.

Exposição a luz ultravioleta: 5 mL de solução de padrão secundário de cetoconazol (1mg/mL) foram adicionados a um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com metanol, obtendo uma concentração final de 0,1 mg/mL. O balão foi levado a uma câmara escura de luz UV, sendo submetido a comprimentos de onda de 254 a 365 nm, por 4 horas.

Exposição a luz natural: 5 mL de cetoconazol solução de padrão secundário (1mg/mL) foram adicionados a um balão volumétrico de 50 mL, sendo seu volume completado com metanol, obtendo uma concentração final de 0,1 mg/mL. Para avaliação da exposição à luz natural, a amostra foi colocada ao abrigo de luz natural, de modo a submetê-la a luz diurna constantemente durante o período de 48 horas.

Exposição a temperatura de 60° C: foram adicionados 5 mL de solução de padrão secundário de cetoconazol (1 mg/mL) em um balão volumétrico de 50 mL, seu volume foi completado com metanol até 80% de sua capacidade. O balão foi levado a banho-maria a temperatura de 60°C, por 4 horas.

Ao término da condição de estresse, todas as amostras tiveram seu volume completado com metanol no balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL de cetoconazol. Posteriormente, as amostras foram filtradas e analisadas por CLAE.

7 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Para o estudo de estabilidade do cetoconazol suspensão oftálmica 5%, os frascos foram submetidos à temperatura 40° C e 75% de umidade relativa, por um período de 90 dias. As formulações estavam acondicionadas em frascos conta-gotas branco leitoso e opacos, sua embalagem primária, com capacidade para 10 mL.

Para simular a umidade relativa de 75%, inicialmente pesou 36 g de cloreto de sódio (NaCl) e diluiu em 100 mL de água destilada para se obter uma solução saturada (TUBINO e SIMONI, 2007). As amostras foram colocadas dentro de um dessecador contendo a solução saturada de NaCl, e armazenadas dentro de uma estufa a 40° C. A umidade relativa de 75% foi controlada com o auxílio de um termo-higrômetro (PERARO, 2001).

Para a análise das amostras, estas foram retiradas do interior do dessecador dentro estufa e analisadas nos tempos de 30, 60 e 90 dias.

As análises realizadas em relação às suas características físico-químicas foram identificação, características organolépticas, pH, densidade e teor. De acordo com a RDC nº 318/2019, o estudo de estabilidade em uso, são estudos projetados para medicamentos acondicionados em embalagens multidoses, tendo como finalidade do estudo confirmar informações iniciais e finais que comprove o período de utilização que o medicamento mantém sua estabilidade após abertura e subsequentes reaberturas da embalagem primária.

Para a realização do estudo de estabilidade desta amostra, foi realizado o estudo de estabilidade acelerado conforme descrito no anexo I da RDC nº 318/2019 para medicamentos armazenados em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C - protegidos de umidade) (BRASIL, 2019).

7.1 Identificação

Foi utilizada a mesma metodologia descrita para doseamento conforme descrito no item 8.2, no qual o tempo de retenção (Tr) do pico principal do cromatograma da solução amostra, obtida no método através do método de doseamento, corresponde àquele do pico principal da solução padrão, sendo assim comparados os tempos de retenção e perfil dos picos (Brasil, 2019).

7.2 Teor

Foi adaptada a metodologia de doseamento de cetoconazol comprimido conforme especificado na monografia da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019). Para a determinação do teor, as amostras foram analisadas no tempo 0 (zero), 30, 60 e 90 dias. Para a solução amostra foi transferida inicialmente 1 mL de cetoconazol suspensão oftálmica 5% para um balão volumétrico de 50 mL, onde posteriormente foi completado seu volume com metanol.

Dessa diluição foi retirado 5 mL e transferido para um balão volumétrico de 50 mL e, então, o volume foi completado com metanol, obtendo uma concentração final de 0,1 mg/mL. As amostras foram analisadas pelo método otimizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Foi utilizada na fase móvel uma mistura de metanol e água (95:5). Foi considerada aceitável a faixa de 90 a 110% conforme descrito na monografia para CTZ comprimidos da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019).

7.3 Características organolépticas

As amostras de suspensão oftálmica de cetoconazol 5% foram analisadas quanto ao aspecto, a cor e o odor no tempo inicial 0 (zero), ou seja, após a abertura do frasco e nos tempos de 30, 60 e 90 dias, nas condições de armazenamento a 40 °C e 75%UR.

7.4 Determinação do pH

Para a determinação do pH da suspensão oftálmica de cetoconazol 5%, a amostra foi previamente homogeneizada, posteriormente foi transferida para um béquer, onde foi medido o pH utilizando um potenciômetro, previamente calibrado utilizando soluções tampões padronizadas de pH 4,0 e 7,0, por inserção direta do eletrodo.

7.5 Densidade

A determinação foi realizada através do picnômetro. Inicialmente foi realizada a calibração do equipamento, através da determinação do picnômetro vazio e a da massa do seu conteúdo com água, recentemente destilada, a 20°C.

A amostra foi transferida para o picnômetro, sendo ajustada a temperatura para 20°C, foi retirado o excesso da amostra e pesou-se. O peso da amostra, assim como o peso da água, foi obtido através da diferença de massas do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada através da razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, a 20°C (BRASIL, 2019).

7.6 Análise da suspensão oftálmica por microscopia

Para análise da suspensão por microscopia direta, foi utilizado um microscópio óptico. Foi retirada uma alíquota de 100 µl da suspensão oftálmica com o auxílio de uma micropipeta, após padronização de 5 minutos de agitação manual, onde a alíquota extraída foi depositada em uma lâmina e analisada. A análise microscópica tinha por objetivo avaliar a uniformidade do tamanho e das formas das partículas. As imagens foram capturadas com aumentos de 100 vezes.

8 VOLUME DE SEDIMENTAÇÃO

Após armazenamento a temperatura ambiente no almoxarifado do Hospital Universitário, por 90 dias. Para determinação do volume de sedimento formado, amostras da suspensão foram previamente homogeneizadas e 10 mL foram transferidos para proveta graduada. O volume de sedimento formado foi medido diretamente na proveta, sem agitação, nos intervalos de tempo de 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas.

O volume de sedimentação (F) foi calculado através da razão entre o volume final de sedimento (V_f) e o volume total antes da sedimentação (V_0).

$$F = V_f/V_0$$

9 VISCOSIDADE

A viscosidade aparente foi determinada empregando-se viscosímetro rotacional digital (BROOKFIELD, modelo LV-DV2T). Foi feita uma varredura em todas as amostras na faixa de velocidade de 100 a 200 RPM, com torque entre 14 e 31%, em temperatura ambiente, utilizando o porta amostras com spindle S-31, em duplicata. Ainda, realizou-se a medida da viscosidade do veículo, após 30 min de centrifugação a 3000 RPM, também em duplicata. A viscosidade foi determinada após 90 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Seleção do solvente para extração do IFA a partir do medicamento

10.1.1 Análise cromatográfica utilizando metanol como solvente (1º ensaio)

Na figura 9 é apresentado o cromatograma relativo à solução padrão secundário de cetoconazol. Em relação ao pico do cetoconazol, os parâmetros cromatográficos apresentados foram: fator de retenção (k) de 1,33, número de pratos teórico por coluna (N/coluna) de 3771, fator de cauda (T) de 1,55. De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019) o limite estabelecido para determinação do fator de retenção (k) deve ser maior que 0,5. Em relação ao número de pratos (N) teóricos o valor deverá ser superior a 2.000 pratos/coluna e a assimetria do pico (As) inferior ou igual a 2. Os parâmetros de performance (*system suitability*), foram calculados onde cada limite estabelecido foi considerado satisfatório.

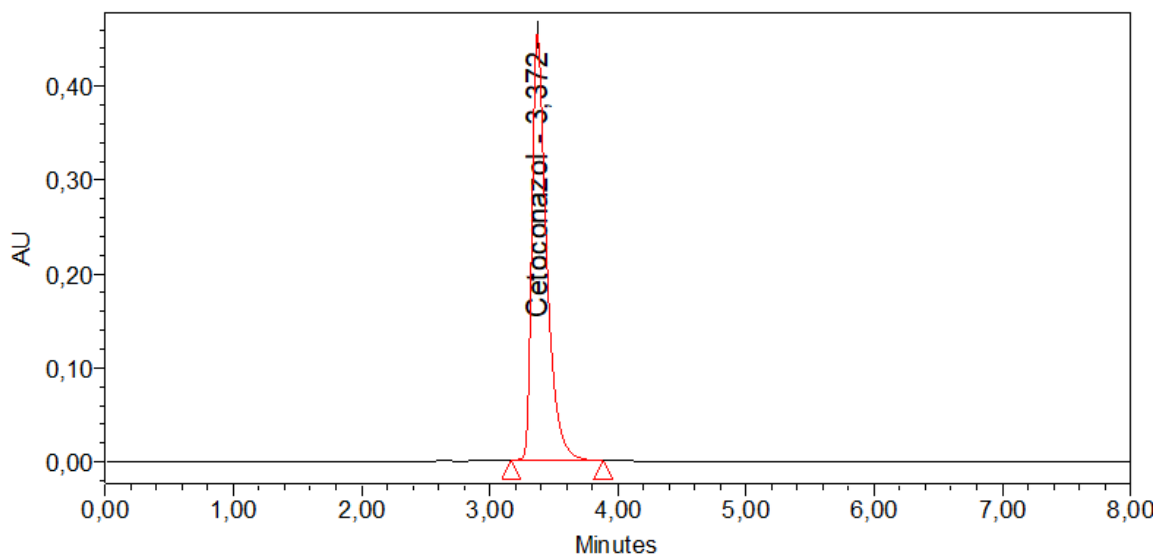


Figura 9 - Cromatograma da solução padrão-secundário de Cetoconazol, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm, utilizando metanol como solvente.

Na figura 10, referente ao espectro na região do ultravioleta obtido com o recurso do detector DAD, pode-se observar que a solução padrão secundário apresenta seu máximo de absorção no comprimento de onda de 225 nm.

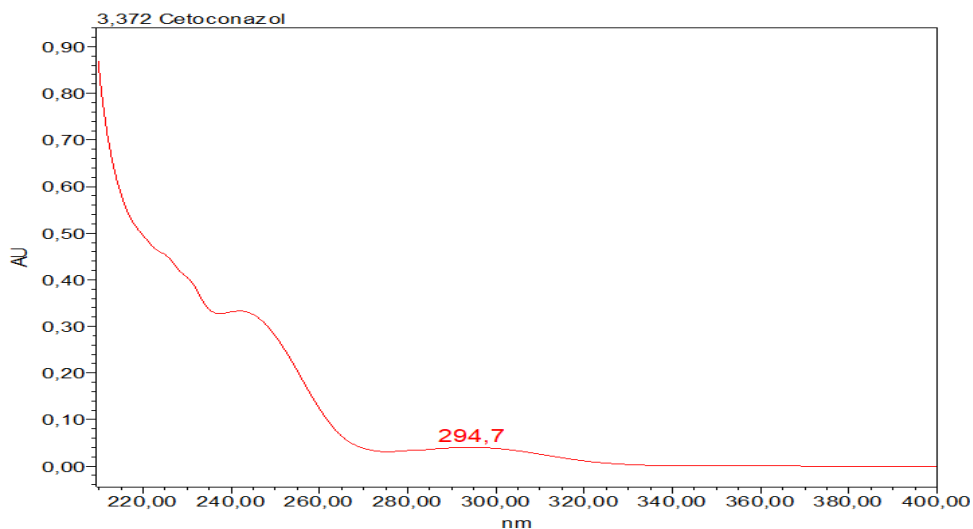


Figura 10 - Espectro na faixa de 200 a 400 nm da banda da solução padrão - secundário de cetconazol, obtido com recurso DAD.

A figura 11 representa o espectro de absorção da solução amostra de cetconazol. Nesse espectro ficou evidenciado que a solução amostra apresenta sua absorção máxima no mesmo comprimento de onda da solução padrão secundário, que junto com a análise dos cromatogramas ratifica presença de cetconazol na amostra analisada.

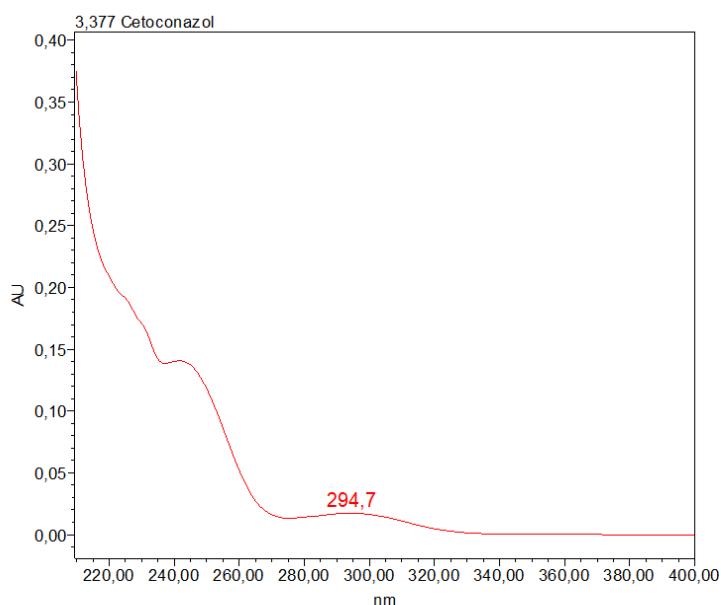


Figura 11 - Espectro de absorção da solução amostra na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, utilizando metanol como solvente.

As figuras 12 e 13 representam cromatogramas em três dimensões (3D), obtidos com o recurso do detector DAD. De acordo com a figura 12, o cetoconazol apresentou um tempo de retenção (T_r) de 3,372 minutos, na condição analítica utilizada.

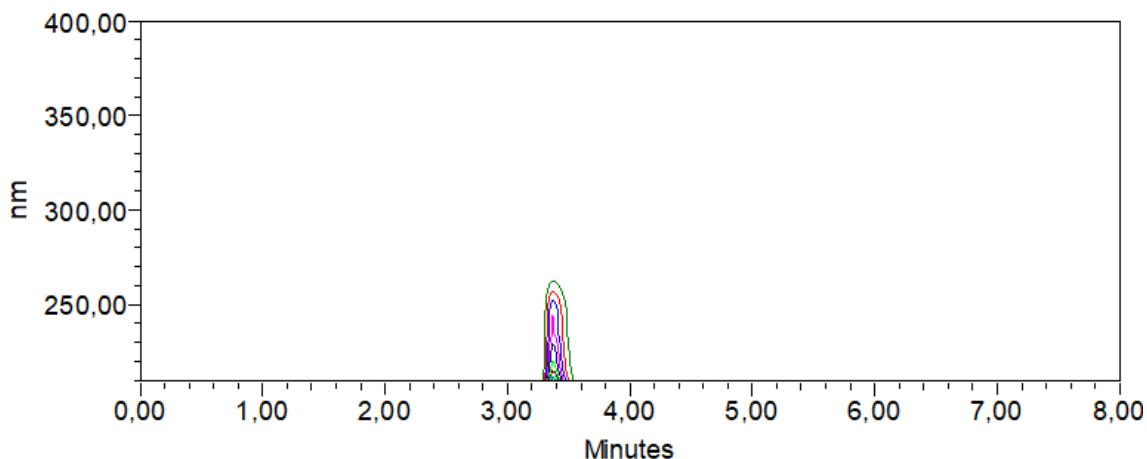


Figura 12 - Cromatograma da solução padrão-secundário, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm.

Na figura 13 é possível visualizar o cromatograma da solução padrão secundário utilizando metanol como solvente, onde foi possível observar a presença apenas do cetoconazol no espectro de 200 a 400 nm.

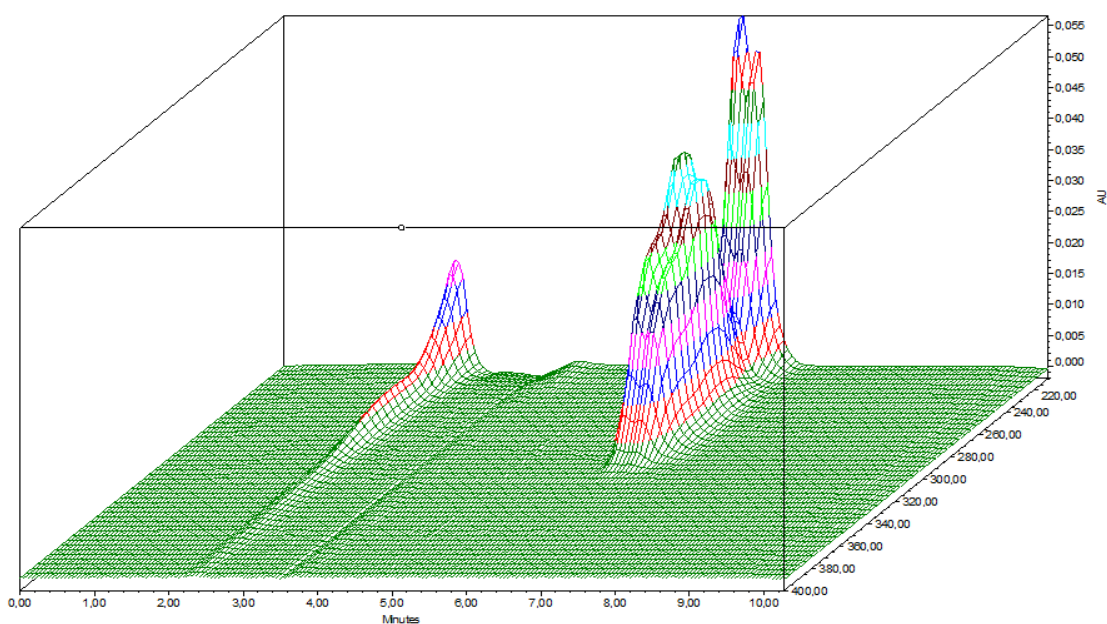


Figura 13 -Cromatograma da solução padrão secundário em 3D, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm.

A figura 14 representa o cromatograma da solução amostra de cetoconazol. Nessa análise pode-se observar que o pico da solução amostra apresentou um tempo de retenção próximo ao tempo de retenção do pico da solução padrão secundário, porém a banda da amostra apresentou uma área menor em relação a área da solução padrão, o que pode ser devido à dificuldade de extração do fármaco a partir da formulação em análise. A amostra apresentou uma área de 3641477, enquanto a solução padrão, uma área de 4516045.

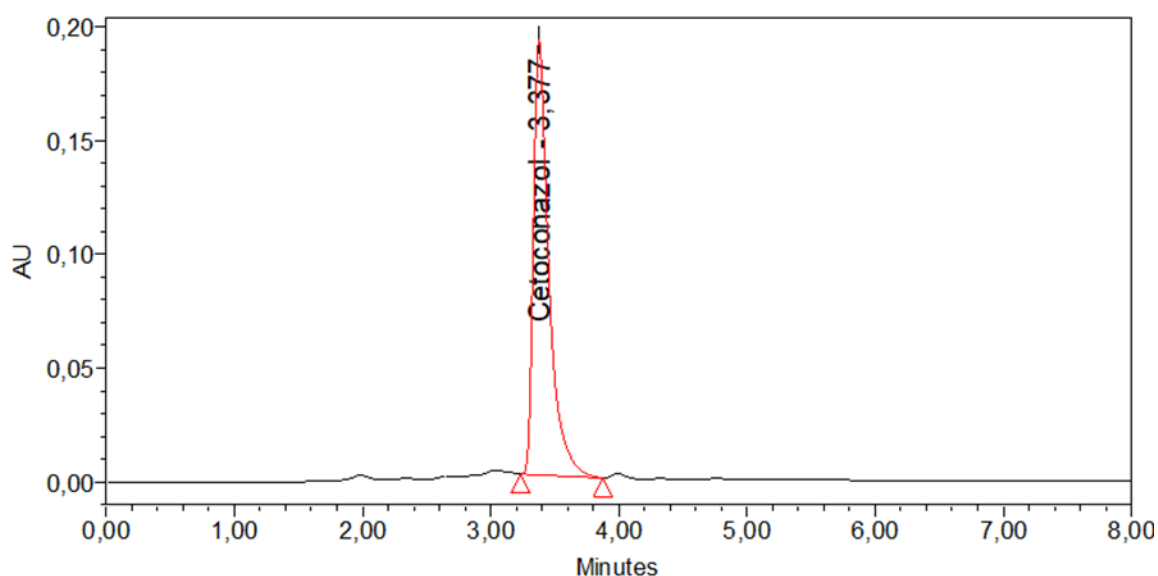


Figura 14 - Cromatograma da solução amostra de Cetoconazol, obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm, utilizando metanol como solvente.

Na figura 15 os cromatogramas foram sobrepostos, onde pode-se observar uma menor intensidade do pico da amostra em relação a intensidade do pico da solução padrão secundário, utilizando metanol como solvente.

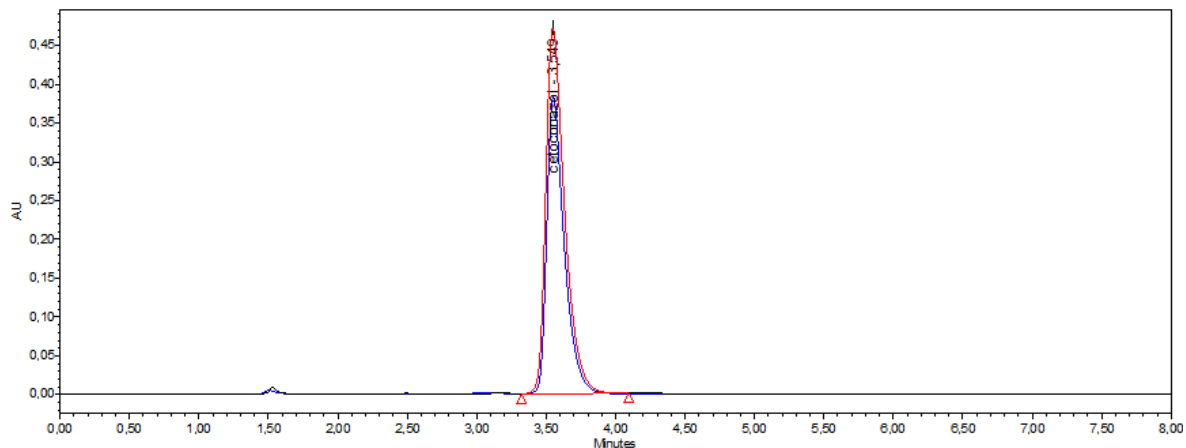


Figura 15 - Cromatograma da solução amostra e da solução do padrão-secundário (sobrepostos), obtido com recurso DAD, na faixa de 200 a 400 nm. Cromatograma da solução padrão (vermelho) - Cromatograma da solução amostra (azul).

10.1.2 Análise cromatográfica utilizando diclorometano como solvente

Para análise cromatográfica utilizando diclorometano como solvente foram realizadas 3 (três) condições analíticas. A proposta de utilização do diclorometano como solvente foi para obter uma melhor solubilização da amostra, já que a mesma não apresentava uma solubilização completa com a utilização do metanol como solvente. Diferente da amostra solubilizada em metanol, as amostras diluídas no diclorometano, não foram filtradas com papel de filtro, devido ao aspecto límpido da solução sugerindo que toda a amostra foi solubilizada. Na primeira condição analítica foram usados os mesmos parâmetros analíticos utilizados para metanol.

Na primeira condição analítica por CLAE foi utilizado um comprimento de onda de 225 nm, com uma coluna cromatográfica RP-18 – 250 mm x 4,6 mm (5 μ m). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, temperatura da coluna 25° C, fase móvel contendo metanol e água (95:5, v/v).

A figura 16 apresenta o cromatograma do cetoconazol padrão secundário, onde foi observado a presença de dois picos, ou seja, picos em conjunto apresentando ombros, com perda cromatográfica, apresentando um aspecto gaussiano defeituoso, sugerindo problemas na separação.

O primeiro pico apresentou um tempo de retenção de 2,832 minutos, já o segundo pico apresentou um tempo de retenção de 3,112 minutos, mas não houve resolução adequada entre os mesmos. Neste mesmo cromatograma foi observado um outro pico com um tempo de 1,77 minuto, referente ao solvente diclorometano.

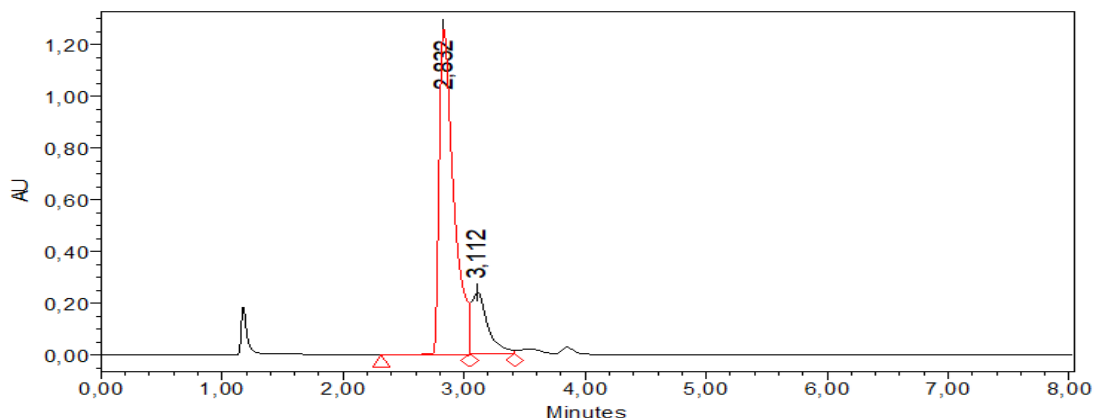


Figura 16 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 215 nm, usando diclorometano como solvente.

Na figura 17 foi apresentado o espectro de absorção da solução padrão de cetoconazol solubilizado em diclorometano. Neste espectro foi observado que o pico com o tempo de retenção de 3,112 minutos (pico 2) apresenta um perfil de absorção semelhante ao perfil de absorção do cetoconazol solução padrão quando utilizado metanol como solvente.

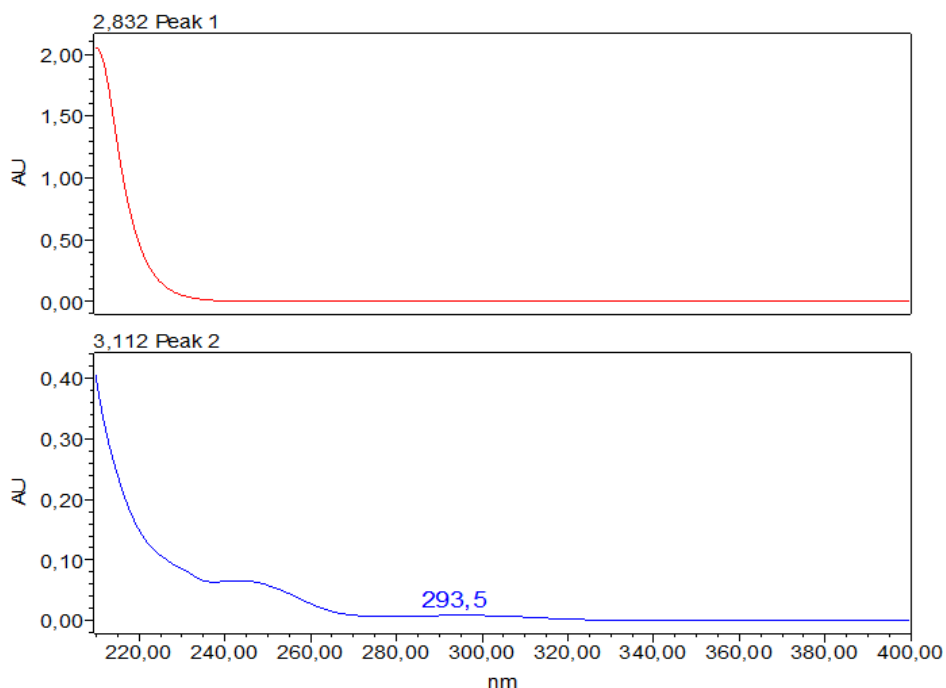


Figura 17 - Espectro na região do UV da solução padrão, na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, usando diclorometano como solvente. Pico 1 - tempo de retenção 2,832 min - em azul. Pico 2: tempo de retenção 3,112 min, apresenta espectro de absorção semelhante ao do padrão quando usado metanol como solvente - em vermelho.

Na segunda condição analítica, foram feitas alterações, volume de injeção, fluxo da fase móvel, proporção da fase móvel e temperatura. Foi utilizado um comprimento de onda de 225 nm, com recurso do detector DAD, com o objetivo de se obter um melhor espectro da substância presente na amostra.

O volume de injeção foi diminuído, para tentar uma melhor resolução do pico cromatográfico, devido a diferença de força de eluição entre o solvente e a fase móvel. O fluxo da fase móvel foi aumentado com o propósito de se obter uma melhor integração do pico. A temperatura foi diminuída devido à volatilidade do diclorometano.

Na segunda condição analítica utilizada, devido ao diclorometano ser um solvente volátil, foi utilizada temperatura igual a 22°C. Com comprimento de onda de 225 nm, fluxo da fase móvel de 1,2 mL/minuto, o volume de injeção foi de 10,0 µL, fase móvel contendo metanol e água (93:7 v/v).

A figura 18 apresenta o cromatograma da solução padrão secundário de cetoconazol na segunda condição analítica proposta, em que se observa um pico cromatográfico com tempo de retenção de 1,77 minutos, sendo atribuído ao diclorometano. Pode-se também visualizar a formação de picos assimétricos, sugerindo problema na separação dos picos.

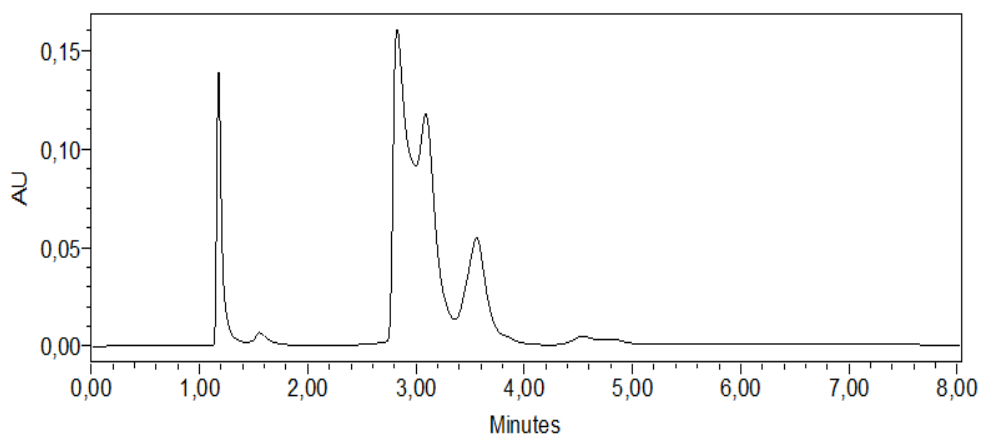


Figura 18 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 225 nm, obtido pelo uso do detector DAD, usando diclorometano como solvente.

A figura 19 apresenta o cromatograma do cetoconazol padrão secundário. Nessa condição analítica foi alterado o comprimento de onda para 245 nm, com o objetivo de redução dos interferentes. O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/minuto, volume de injeção de 10,0 µL. A proporção da fase móvel de metanol e água foi alterada para 90:10 e a temperatura da coluna foi mantida a 22°C.

Nessa condição foi observada a formação de 3 (três) picos. O cromatograma não obteve uma resolução satisfatória, não ocorrendo uma separação entre os picos.

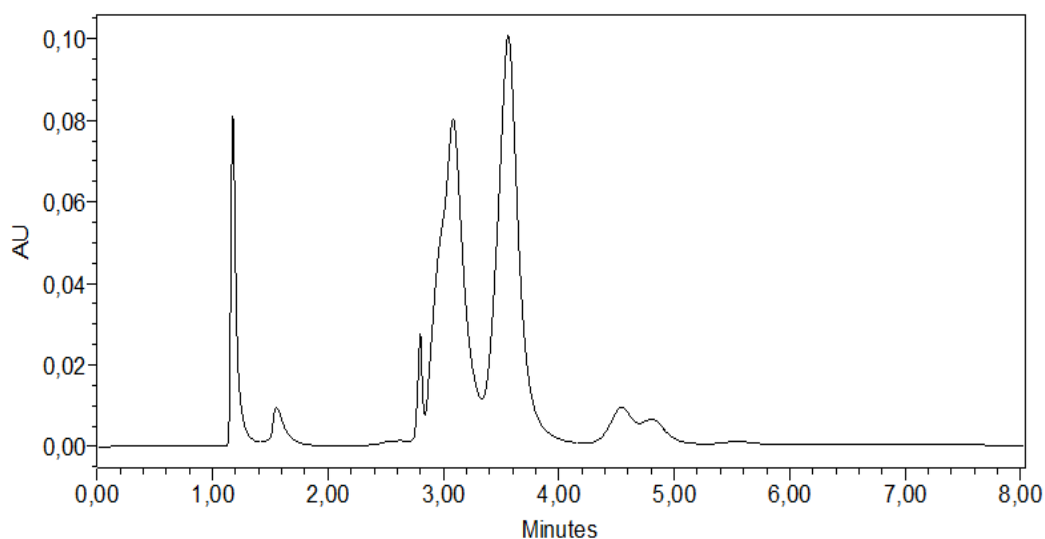


Figura 19 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 245 nm, obtido pelo uso do detector DAD, usando diclorometano como solvente.

10.1.3 Análise cromatográfica utilizado Tetraidrofurano (THF) e metanol como solvente.

Devido à dificuldade de extração da substância ativa a partir da formulação, foi utilizado tetraidrofurano (THF) como solvente em associação com metanol (50:50), para tentar a solubilização da porção oleosa da preparação magistral em análise pelo THF, liberando assim o fármaco para ser extraído pelo metanol. Dentre os solventes testados, a mistura de THF e metanol foi a que apresentou melhor perfil de solubilização do IFA.

Barrios e colaboradores (2011) utilizaram uma mistura de THF, metanol e acetonitrila para a extração do adapaleno de uma suspensão que possuía óleo de melaleuca. A utilização do metanol com THF apresentou um melhor aspecto de dissolução da amostra em relação ao uso de metanol e diclorometano. A condição analítica otimizada por CLAE apresentava comprimento de onda de 225 nm, coluna cromatográfica RP 18 – (250 mm x 4,6 mm), o volume de injeção usado foi de 20,0 µl, com fluxo da fase móvel de 1,0 mL/minuto, como fase móvel composta por metanol e água (95:5 – v/v) e temperatura de 30° C.

O cromatograma da figura 20 apresentou um pico com o tempo de retenção de 5,316 que indicava ser o CTZ. Para confirmação da análise foi utilizado um branco da mistura dos solventes THF e metanol para comparação dos picos.

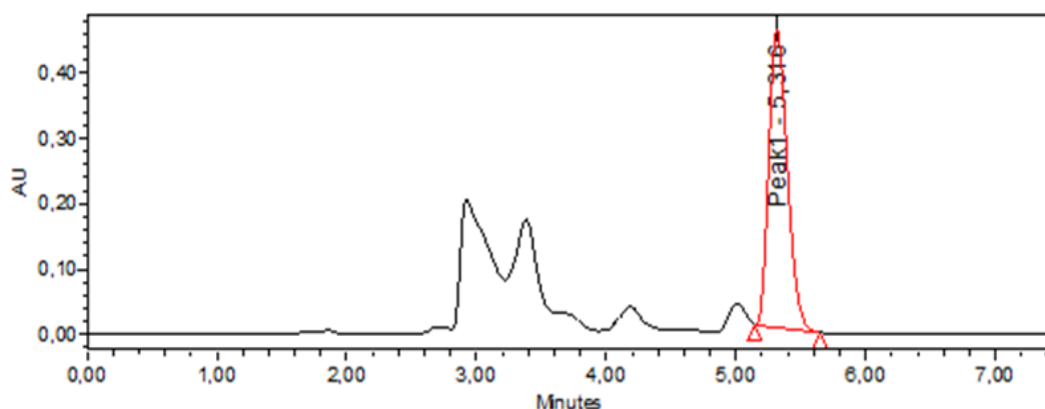


Figura 20 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 225 nm, obtido pelo uso do detector DAD, usando THF e metanol (50:50) como solvente.

A figura 21 mostra um cromatograma da mistura dos solventes THF e metanol (50:50) devido à suspeita do pico apresentado na figura 20 ser do próprio solvente. A análise foi confirmada devido à proximidade do tempo de retenção das duas figuras serem próximos, onde foi possível confirmar que o pico de figura 21, em 5,316 min, correspondia ao mesmo pico da figura 20 o que confirma que o pico é referente ao solvente.

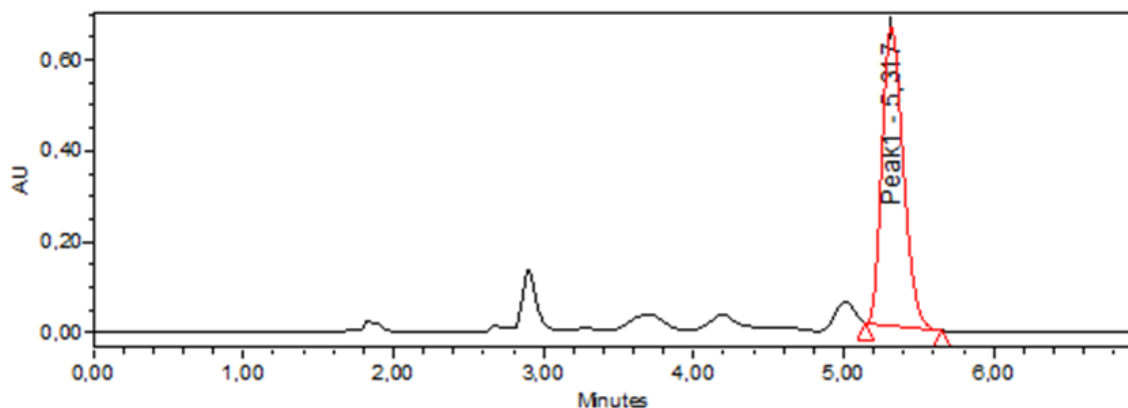


Figura 21 - Solução de uma mistura de THF e metanol (50:50) sem a presença do fármaco.

10.1.4 Análise cromatográfica utilizando Metanol como solvente (2ª ensaio).

O segundo ensaio utilizando metanol como solvente, a condição analítica utilizada apresentou um comprimento de onda de 225 nm, coluna cromatográfica - RP 18 – 250 mm x 4,6 mm (5 μ m), volume de injeção de 20,0 μ L. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, sendo utilizado na fase móvel metanol e água (95:5 v/v) e temperatura de 30°C.

A figura 22 representa o cromatograma da solução padrão de cetoconazol, obtida através de recurso de DAD, na concentração de análise. Nessa figura podemos observar o pico do padrão de cetoconazol (CTZ), que apresenta um tempo de retenção (Tr) de 3,553 minutos em 225 nm. Os parâmetros de performance cromatográficos (system suitability) calculados de acordo com as fórmulas descritas na Farmacopeia Brasileira (2019) foram: Fator de retenção (k) de 1,33, números de pratos teóricos (N) de 3755 pratos/coluna e fator de cauda (Tf) ou assimetria igual a 1,50. De acordo com os limites estabelecidos para cada parâmetro, os resultados foram considerados satisfatórios.

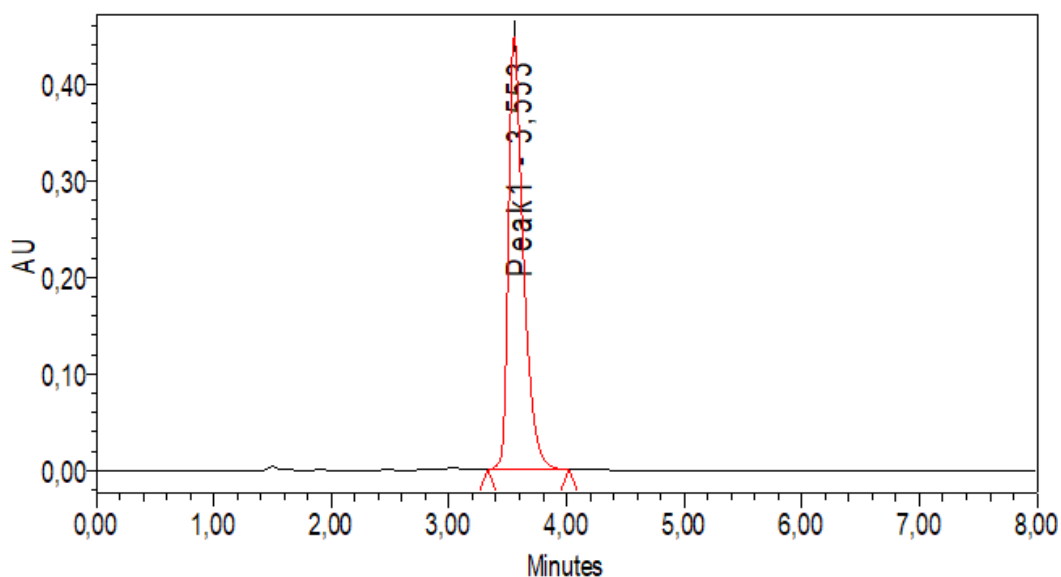


Figura 22 - Cromatograma da solução padrão de cetoconazol em 225 nm, segundo ensaio, utilizando metanol como solvente.

Na figura 23 a solução padrão apresentou seu espectro de absorção máximo no comprimento de onda de 225 nm, no segundo ensaio analítico utilizando metanol como solvente.

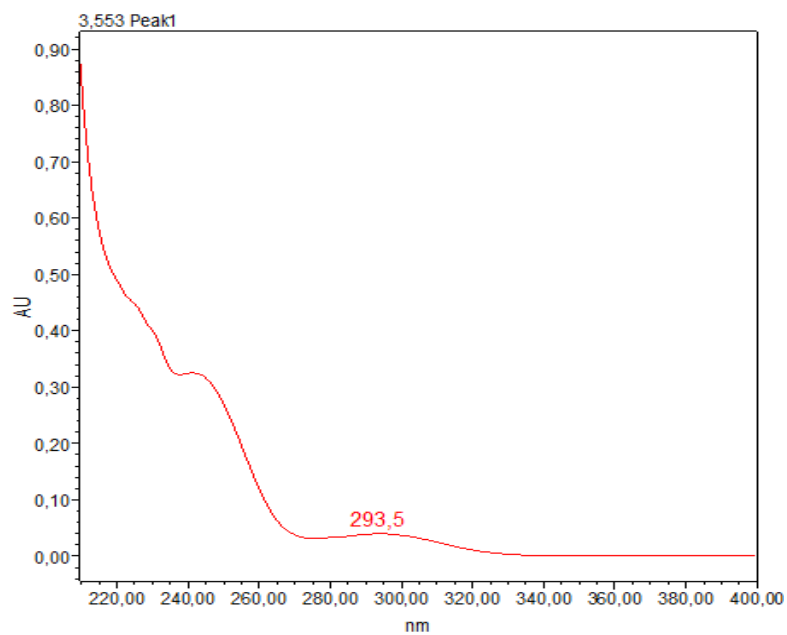


Figura 23 - Espectro na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, da banda a solução padrão de cetoconazol, solvente - metanol.

A figura 24 apresenta o cromatograma da solução padrão de cetoconazol, obtido com recurso do detector DAD, em 3D, apresentando o pico da solução com um tempo de retenção (Tr) de 3,553 minutos.

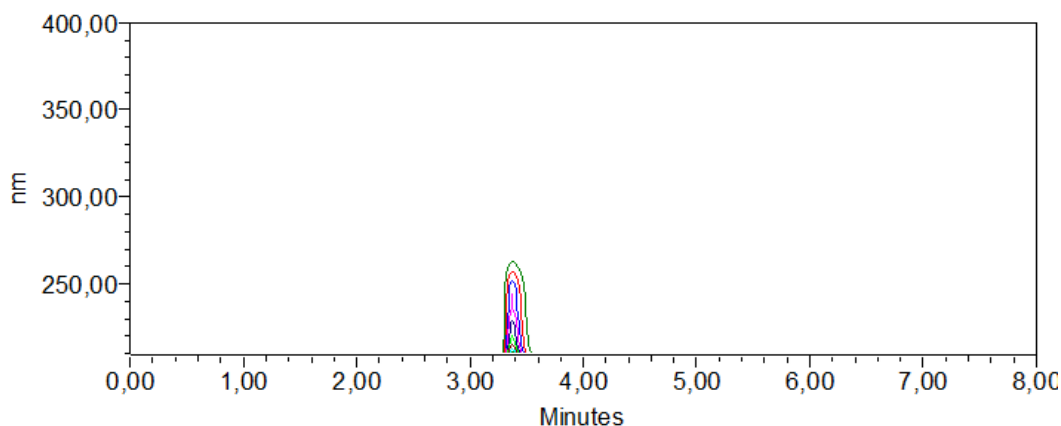


Figura 24 - Cromatograma em 3D da solução padrão de cetoconazol, obtido com recurso de detector DAD, segundo ensaio utilizando metanol como solvente.

A figura 25 representa o cromatograma da solução padrão secundário, em três dimensões (3D), obtido com recurso de detector DAD, utilizando metanol como solvente, demonstrando o tempo de retenção do cetoconazol ($Tr = 3,553$), comprimento de onda de absorção máximo do composto de 225 nm e a intensidade do pico. Neste cromatograma pode ser observado apenas a presença do cetoconazol no espectro de 200 a 400 nm. Nesta figura pode ser observado também o pico referente ao tempo morto, que apresenta um tempo de retenção de 2,14.

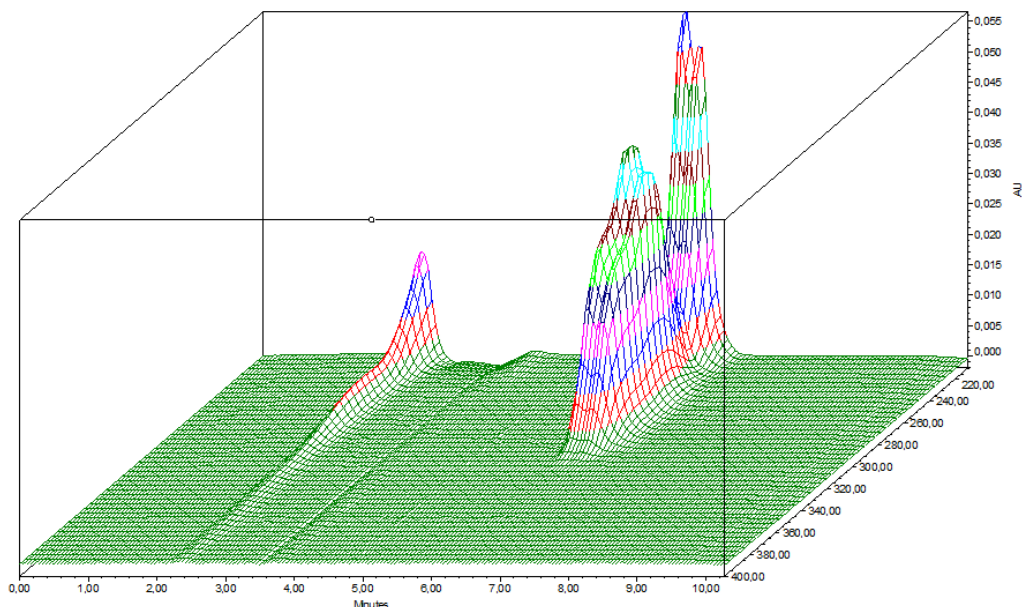


Figura 25 - Cromatograma em 3D da solução padrão de cetconazol, obtido com recurso de detector DAD.

A figura 26 representa o cromatograma da solução amostra de cetconazol suspensão, obtida através da metodologia proposta no segundo ensaio utilizando metanol como solvente. Após a diluição a amostra foi levada à mesa agitadora por 24 horas, e após o término desse período foi colocada em ultrassom por 25 minutos. O cromatograma da amostra apresentou uma boa resolução, com o pico da amostra apresentando uma área próxima ao pico do padrão, obtendo-se um percentual de recuperação da amostra (teor) de 80,63% com essa nova metodologia proposta.

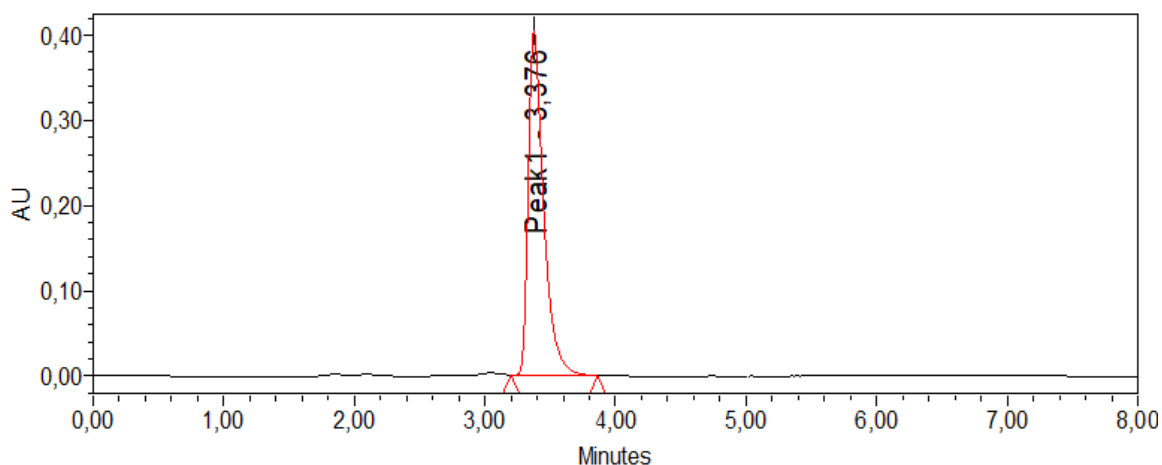


Figura 26 - Cromatograma da solução da amostra de Cetconazol suspensão em 225 nm, obtida com recurso de DAD, segundo ensaio utilizando metanol como solvente.

A figura 27 apresenta o espectro da amostra em 225 nm, obtida com recurso de detector DAD, utilizando metanol como solvente. Nessa Figura pode-se observar que a amostra da solução de cetoconazol apresenta espectro máximo de absorção igual ao espectro de absorção da solução padrão secundário, apresentando o mesmo perfil de absorção.

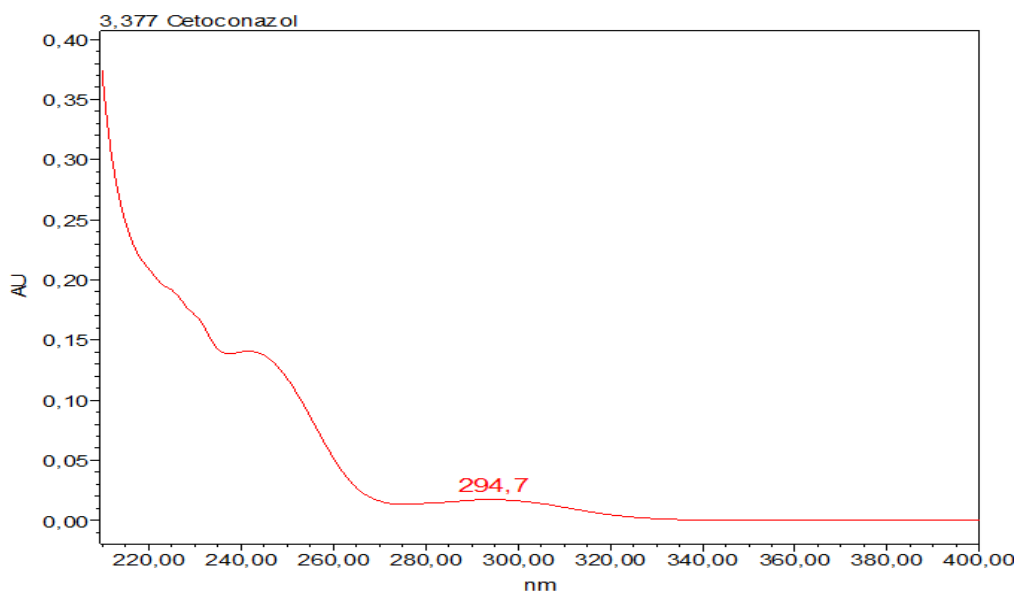


Figura 27 - Espectro na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtido com recurso de detector DAD, da banda a solução da amostra de cetoconazol. Tempo de retenção do pico do padrão de 3,377 minutos.

Devido à grande dificuldade de extração do cetoconazol da formulação foram utilizados diferentes solventes, com o objetivo de se obter uma melhor resolução cromatográfica.

Dentre os diferentes solventes testados, apesar de não apresentar o melhor perfil de solubilização da amostra, o metanol foi o que apresentou um perfil cromatográfico mais satisfatório. Na segunda metodologia proposta, foi obtido um melhor resultado em relação aos demais solventes e até mesmo em relação à primeira metodologia proposta utilizando o mesmo metanol, apresentando um melhor percentual de extração (recuperação).

11 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO POR CLAE

11.1 Linearidade

Na tabela 5 estão apresentados os valores das áreas obtidas, para obtenção da curva analítica na faixa de concentração de 0,08 a 0,12 mg/mL. Nesta tabela pode-se observar a linearidade do método, onde obteve-se respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em conformidade com a RDC ANVISA n° 166/2017.

Tabela 5 - Resultados obtidos na determinação da linearidade por CLAE.

Amostras	ÁREA				
	0,08 mg/mL	0,09 mg/mL	0,1 mg/mL	0,11 mg/mL	0,12 mg/mL
1	3612018	4039845	4458873	4929685	5339830
2	3628844	4108138	4463601	4900798	5327947
3	3587986	4027927	4523073	4884102	4249551
Média	3609616	4058637	4481849	4904862	5305776
DPR (%)	0,57	1,07	0,80	0,47	0,92

DPR: Desvio Padrão Relativo

A figura 28 indica a representação gráfica e a equação linear da área em função da concentração (mg/mL), mediante análise das diferentes concentrações da solução padrão na faixa de concentração de 0,08 - 0,12 mg/mL. O valor de coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9999, e está de acordo com o valor de coeficiente de correlação linear recomendado pela Resolução ANVISA 166/2017, que deve ser maior que 0,99. A equação da reta é $y = 42.385.450,00 x + 33.602,87$.

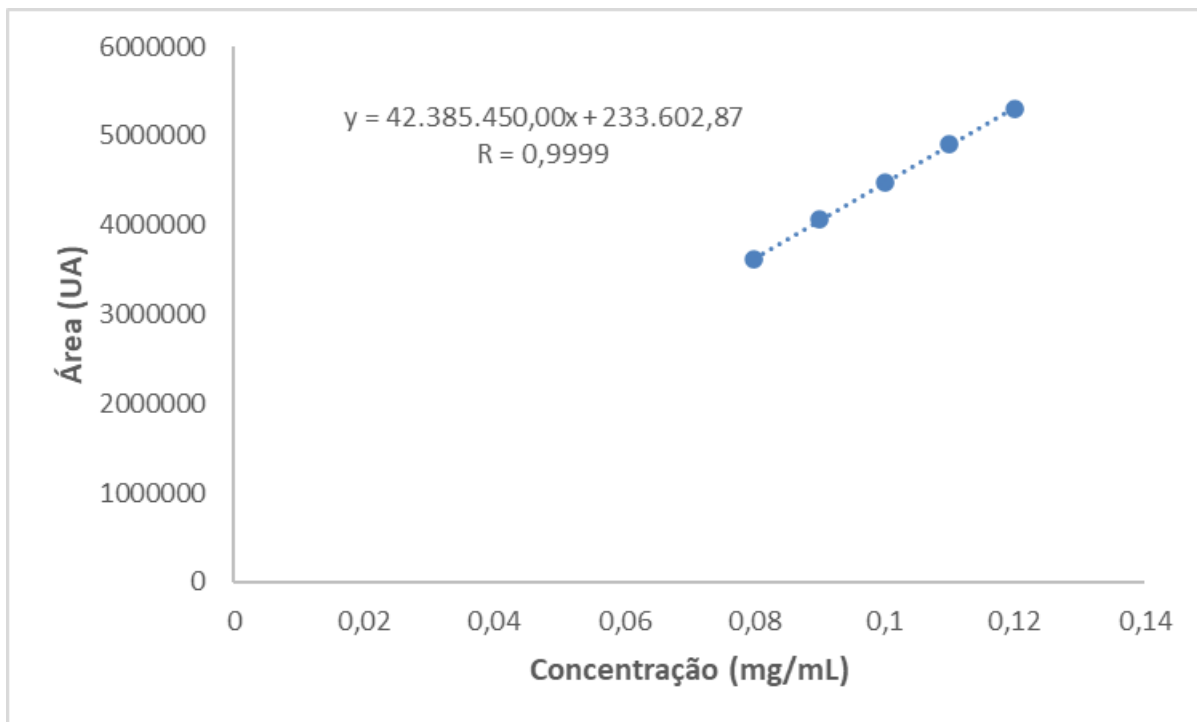


Figura 28 - Curva de linearidade pelo método de análise por CLAE.

11.2 Precisão

Os resultados da precisão foram analisados através da avaliação do desvio padrão relativo (DPR%), obtidos através da repetibilidade e da precisão intermediária, confirmando a precisão do método, considerando como sendo $DPR < 2,0$ como critério de aceitação, conforme estabelecido pela RDC ANVISA nº 166/2017.

Na tabela 6 estão representados os valores das áreas, para determinação da repetibilidade do método de análise, obtidas por CLAE, utilizando um comprimento de onda 225 nm, metanol e água (95:5) como fase móvel e coluna de fase reversa - RP 18 – (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), fluxo de 1,0 mL/min e temperatura da coluna de 25°C.

Tabela 6 - Resultados obtidos na determinação da repetibilidade por CLAE.

ÁREA			
Amostras	0,08 mg/mL	0,1 mg/mL	0,12 mg/mL
1	3612018	4458873	5339830
2	3628844	4463601	5327947
3	3587986	4523073	4249551
Média	3609616	4481849	5305776
DPR (%)	0,57	0,80	0,92

DPR: Desvio Padrão Relativo

Na tabela 7 estão representados os valores das áreas, para determinação da precisão intermediária do método de análise, realizada em dois dias distintos, obtidas por CLAE, utilizando um comprimento de onda 225 nm, metanol e água (95:5) como fase móvel e coluna de fase reversa - RP 18 – (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min. e temperatura da coluna de 25°C. Os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária estão de acordo com os critérios preconizados na RDC nº 166/2017, apresentando um DPR < 2%, confirmando a precisão do método.

Tabela 6 - Resultados obtidos na determinação da repetibilidade por CLAE.

ÁREA			
Amostras	0,08 mg/mL	0,1 mg/mL	0,12 mg/mL
1	3612018	4458873	5339830
2	3628844	4463601	5327947
3	3587986	4523073	4249551
Média	3609616	4481849	5305776
DPR (%)	0,57	0,80	0,92

DPR: Desvio Padrão Relativo

11.3 Exatidão

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos na avaliação da exatidão através do método de adição de uma quantidade conhecida de solução padrão de cetoconazol, utilizando metanol como solvente. Os valores obtidos na análise de exatidão através do teste de recuperação indicam que o método é exato, devido aos valores obtidos próximo ao valor de 100%, e por apresentar DPR inferior a 2% em relação ao teor de recuperação.

Tabela 8 - Resultados obtidos pelo teste de recuperação, concentração em mg/mL.

Amostras	Concentração da amostra em mg/mL	Concentração do Padrão adicionada em mg/mL	Concentração da amostra fortificada em mg/mL	(%) Recuperação
1	0,1	0,08	0,18	96,88
2	0,1	0,1	0,20	95,60
3	0,1	0,12	0,22	96,18

11.4 Limite de detecção e quantificação

A Tabela 9 mostra os resultados referentes aos limites de detecção e quantificação do método por CLAE. O limite de detecção foi a menor quantidade da substância que pode ser detectada. O limite de quantificação está relacionado com a menor quantidade da amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

Tabela 9 - Resultados obtidos referentes aos limites de detecção e quantificação.

Parâmetros	Cetoconazol ($\mu\text{g/mL}$)
Limite de detecção	2, 11 $\mu\text{g/mL}$
Limite de Quantificação	6,99 $\mu\text{g/mL}$

11.5 Seletividade

O método demonstrou ser seletivo, através do estudo de degradação forçada, conforme pode ser observado na figura 29, em que se mostrou específico, na qual foi possível a separação e a identificação do cetoconazol, frente às variadas condições de estresse.

11.6 Robustez

A tabela 10 apresenta os resultados obtidos para a avaliação da robustez do método. Após diferentes modificações no método, foi calculado o DPR entre as diferenças no teor da amostra. O resultado do DPR apresentado foi de 1,85 %, sendo o método considerado robusto após as alterações realizadas.

Tabela 10- Resultados obtidos para determinação da robustez por método de CLAE, utilizando metanol como solvente.

Teste Robustez	Área do Padrão	Área da amostra	Teor de Recuperação (%)
Condição Otimizada	4516045	3641477	80,63
Alteração do fluxo de 1,2 mL/min.	4464289	3506199	78,53
Alteração da fase móvel (96:4)	4496187	3504066	77,93
Alteração da temperatura	4448268	3597423	80,87
DPR (%)	0,68	1,92	1,85

12 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os fármacos necessitam de cuidados especiais em relação ao seu armazenamento e conservação, para que o mesmo mantenha suas características físicas, químicas e terapêuticas, diminuindo risco ao paciente (QUILES, 2011).

Durante o estudo de degradação forçada, foi possível visualizar a formação de alguns produtos de degradação. Na tabela 11 estão os resultados referentes ao estudo de degradação forçada sob diferentes condições de estresse.

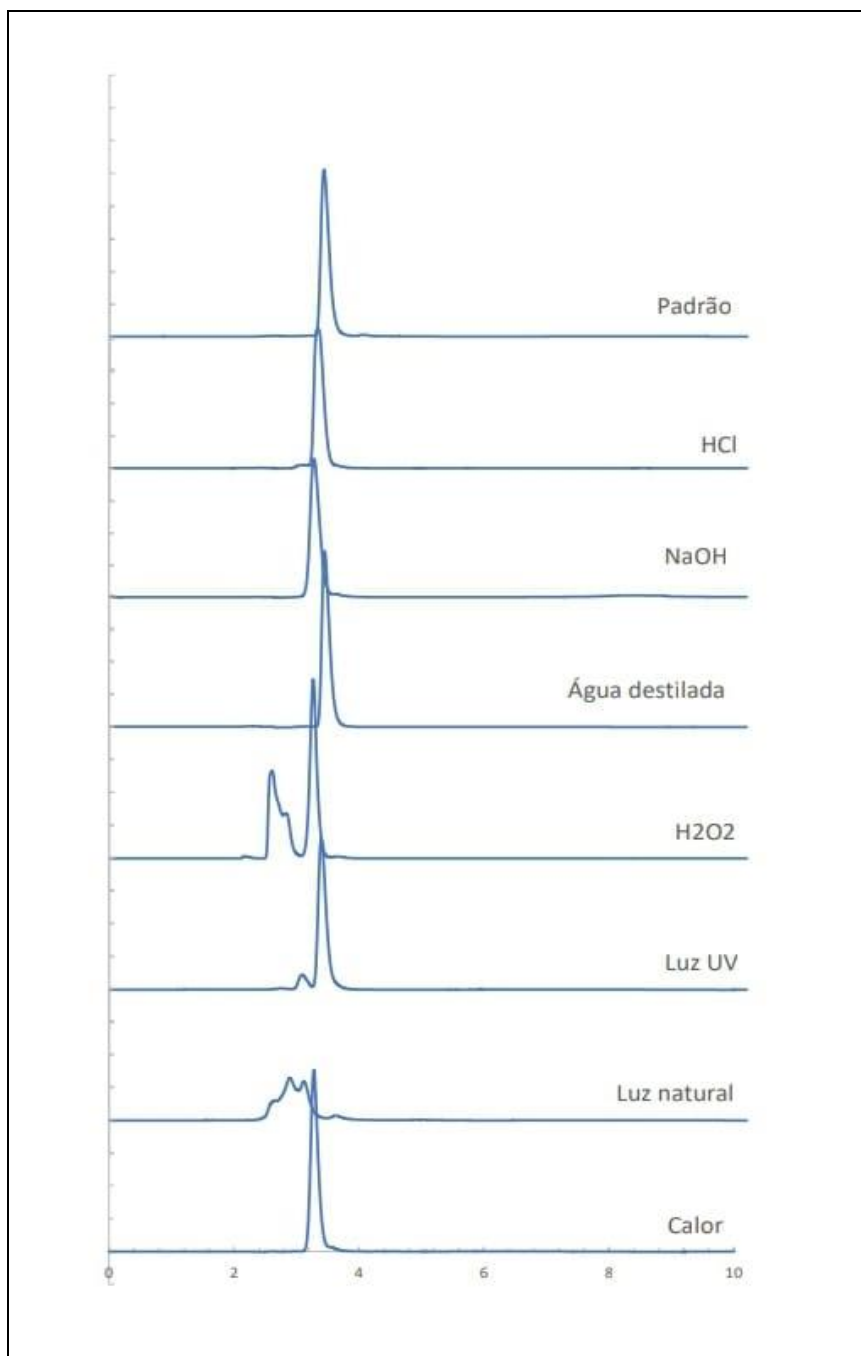
O fármaco se manteve estável em grande parte das análises do estudo de degradação forçada, com exceção das condições de oxidação com peróxido de hidrogênio a 3%, de radiação UV, e de exposição a luz natural, onde o fármaco apresentou uma significativa diminuição da área.

Tabela 11 - Áreas do cromatograma e tempo de retenção (Tr) obtidas no estudo de degradação do cetoconazol, em banho-maria a 60°C.

Amostra	Área	Tr*	Teor (%)
Padrão	4693215	3,362	100
Hidrólise ácida	4375423	3,263	93,22
Hidrólise básica	4571331	3,215	97,40
Hidrólise neutra	4636052	3,383	98,78
Oxidação H₂O₂ 3%	3843021	3,202	81,88
Radiação UV	3971609	3,328	84,62
Luz natural	91876	3,560	1,95
Calor 60 ° C	4637748	3,278	98,81

Tr* - Tempo de retenção

O estudo de estabilidade tem o propósito de prover informações precisas quanto a variação da qualidade de um medicamento ou insumo farmacêutico ativo (IFA) em função do tempo, diante de fatores ambientais, como luz, umidade e temperatura (BRASIL, 2019). A estabilidade de um medicamento se refere a extensão na qual um produto mantém suas características dentro de critérios de aceitação ao longo do tempo. Na figura 29, estão representados os gráficos do cetoconazol antes e após a submissão a diferentes condições de estresse, como: hidrólise ácida (HCl 0,1 M), hidrólise básica (NaOH 0,1 M), hidrólise neutra (H₂O), Oxidação (H₂O₂ 3%), Radiação UV (Luz UV), Luz natural e calor a 60.



Intensidade (AU) x Tempo (minutos)

Figura 29 - Cromatogramas da solução padrão de cetoconazol antes e após ser submetido a variadas condições de estresse. A detecção foi realizada em 225 nm.

Foi observado que o cetoconazol se manteve estável nas condições analisadas (hidrólises ácidas, alcalina e neutra). Pode-se observar uma alteração no cromatograma após processo de oxidação por exposição ao peróxido de hidrogênio a 3%, e ainda por exposição à luz UV e à luz natural.

O processo de degradação oxidativa é tida como uma das principais responsáveis pela instabilidade dos fármacos. A oxidação é promovida através da remoção de átomo eletropositivo, elétron ou radical. A oxidação pode ser ainda causada pela adição de um radical ou um átomo eletronegativo (SILVA *et al.*, 2009).

O processo de oxidação ocorreu pela presença dos radicais hidroxilas que reagiram com o fármaco, provavelmente devido ao fato do nitrogênio presente no anel piperazínico, ser propenso a formar N-óxidos nas moléculas de cetoconazol (MHASKE e SAHASRABUDHE, 2011).

O cetoconazol é classificado como um fármaco fotossensível, quando exposto a radiações UV ou luz artificial, podem sofrer processo de degradação, diminuindo a eficácia terapêutica do fármaco ou em alguns casos produzindo compostos tóxicos (STAUB, 2005).

No estudo de estresse frente a luz UV, a atividade fotolítica pode ter desencadeado uma excitação nos elétrons, causando uma perda de elétrons e conseqüentemente levando a uma quebra da molécula.

No cromatograma da exposição a luz UV e luz natural, foi observado o aparecimento de outros picos cromatográficos, sugerindo a formação de produtos de degradação. A energia incidente da luz natural promoveu uma instabilidade da molécula através no aumento dos níveis energéticos do fármaco, formando produtos oxidantes (ALVES *et al.*, 2008).

Nourieh e colaboradores (2019), descreveram sobre a atividade fotocatalítica da mistura de Ortofosfato de prata (Ag_3PO_4) e óxido de grafeno (GO) para decomposição de cetoconazol presente como contaminantes no meio ambiente. A atividade fotocatalítica foi realizada através de uma reação de oxi-redução, com transferência de elétrons foto excitados de GO para (Ag_3PO_4), gerando a produção de radicais hidroxilas (OH^-) e superóxidos (O_2^-), realizando a oxidação do cetoconazol (NOURIEH *et al.*, 2019). O CTZ não se mostrou estável na condição oxidativa, onde foi confirmado pela degradação do produto, com diminuição do teor do cetoconazol.

Isquibola e Rodrigues (2019) descreveram que o processo de fotólise ocorre devido a absorção de radiação pela substância, fazendo com que ocorra a quebra de moléculas. Eles relataram ainda que quando uma molécula é exposta a luz UV, os elétrons saltam de camada menores para camada mais altas (ISQUIBOLA e RODRIGUES, 2019). O objetivo da realização do estudo fotoquímico foi avaliar a estabilidade do cetoconazol quando submetido a exposição da radiação UV, sendo assim, para a avaliar os efeitos da exposição nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Após a exposição as amostras foram analisadas por CLAE, onde se constatou a instabilidade fotoquímica pela diminuição de teor do fármaco, sugerindo uma degradação da molécula do fármaco por exposição a variados comprimentos de onda.

Alves e colaboradores (2008) descrevem em seu trabalho que embalagens plásticas que acondicionam produtos farmacêuticos fotossensíveis devem apresentar um percentual de transmitância na faixa de 10 a 12% (no máximo).

De acordo com a RDC ANVISA nº 318/2019 as recomendações quanto às condições de armazenamento baseadas no estudo de estabilidade e fotoestabilidade devem ser reportadas nos rótulos do IFA, no rótulo a na bula ou documento equivalente do medicamento. Em se tratando de medicamentos não aprovados no estudo de fotoestabilidade quando exposto a fonte de luz, deverá constar na rotulagem informações escritas informando que este produto deve ser protegido da luz.

13 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade é parte integrante da garantia de qualidade do produto farmacêutico. Este estudo busca avaliar a estabilidade do fármaco ou o produto acabado em função do tempo, por intervenção de fatores intrínsecos e extrínsecos. Para o estudo de estabilidade procedeu-se os estudos de identificação e teor do fármaco na formulação, assim com as características organolépticas, densidade e o pH da formulação.

13.1 Identificação

A análise de identificação foi realizada após a abertura do frasco, ou seja, no tempo 0 (zero) dias conforme metodologia para determinação do teor (item 8.2), de acordo com a condição otimizada por CLAE, através da metodologia adaptada para determinação para cetoconazol comprimido conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2019). Na análise da amostra foi observado que a solução da amostra

apresenta o pico referente ao cetoconazol da solução padrão. E que tal pico foi avaliado também em relação ao espectro da região do ultravioleta com o recurso do detector de DAD.

13.2 Teor

Os resultados obtidos nas análises de doseamento, em relação ao teor do fármaco em função do tempo de armazenamento estão representados na tabela 12. A formulação imediatamente após a abertura do frasco apresentou um teor de 89,76%. As suspensões armazenadas a 40° C e 75%UR durante os períodos de 30, 60 e 90 dias, apresentaram variações em relação ao teor de cetoconazol.

Esta variação no teor das amostras demonstra um problema de não homogeneidade do produto avaliado. O método analítico foi validado e demonstrou todos os parâmetros aceitáveis, inclusive com uma exatidão próxima a 100%, o que contribui para indicar que o produto tem problema de uniformidade de lote.

Tabela 12 - Análise do teor de cetoconazol das formulações armazenadas a 40° C e 75% UR - 0, 30, 60 e 90 dias.

TEMPO (DIAS)	ÁREAS	TEOR (%)
0	4263343	89,76
30	4918628	103,56
60	5748836	121,04
90	5047564	106,27

13.3 Características organolépticas

Em relação às características organolépticas, inicialmente todas as amostras apresentavam coloração amarelada, aspecto turvo. Após o armazenamento a 40°C e 75% UR, não foram observadas alteração da cor, aspecto e odor durante todo o período de análise. A figura 30 mostra o resultado das características organolépticas em função da condição e tempo das análises.

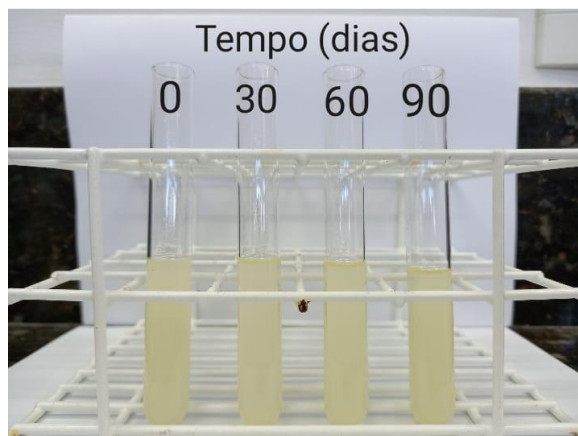


Figura 30 - Características organolépticas das amostras no tempo zero, 30, 60 e 90 dias de armazenamento a 40°C e 75% UR.

13.4 Determinação do pH

Os valores do pH das formulações de cetoconazol suspensão oftálmicas 5% estão descritos na tabela 13. Os valores de pH nas formulações não apresentaram variações significativas durante o período de análise.

Tabela 13 - Análise do pH do cetoconazol suspensão oftálmicas 5% armazenadas a 40° C e 75% UR - período: 0, 30, 60 e 90 dias.

Condição de Armazenamento - 40° C - 75% UR	
Tempo (dias)	pH*
0	7,4
30	7,9
60	7,4
90	7,1

* Cada valor representa a média de 3 análises.

13.5 Densidade

Conforme descrito na tabela 14, as formulações apresentaram uma boa estabilidade física em relação a densidade. Tanto as formulações armazenadas a temperatura ambiente, quanto as armazenadas em estufa, não apresentaram variações significativas na sua análise em função do tempo.

Tabela 14 - Análise das densidades do cetoconazol suspensão oftálmicas 5% armazenadas a 40° C e 75% UR - período: 0, 30, 60 e 90 dias.

Condição de Armazenamento - 40° C - 75% UR	
Tempo (dias)	Densidade* (g/mL)
0	1,10
30	1,06
60	1,13
90	1,07

* Cada valor representa a média de 3 análises.

Na análise de identificação do cetoconazol presente na suspensão oftálmica, pode-se observar por CLAE, que o tempo de retenção do pico da solução amostra de cetoconazol, corresponde ao tempo de retenção do pico da solução padrão. A solução amostra de cetoconazol apresenta o mesmo espectro de absorção da solução padrão.

A análise de doseamento foi realizada através de CLAE, através de uma adaptação da metodologia analítica para determinação de cetoconazol comprimido, onde a amostra deve conter no mínimo 90% e no máximo 110% da quantidade de cetoconazol declarado, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019). As análises de teor, com o método otimizado e validado, apresentaram variações em relação ao percentual de teor de cetoconazol durante o período de 90 dias sob condições de armazenamento (40° C e 75% UR) numa faixa de 89,76 a 121,04 %, apresentando uma não conformidade em relação ao seu percentual de cetoconazol na amostra de acordo com as diretrizes da Farmacopeia Brasileira (2019).

Analisando as características organolépticas cor, odor e aspectos, todas as amostras se mantiveram igualmente em relação ao resultado inicial (tempo zero),

mantendo seu aspecto, seu odor característico e sua cor durante todo o período de armazenamento.

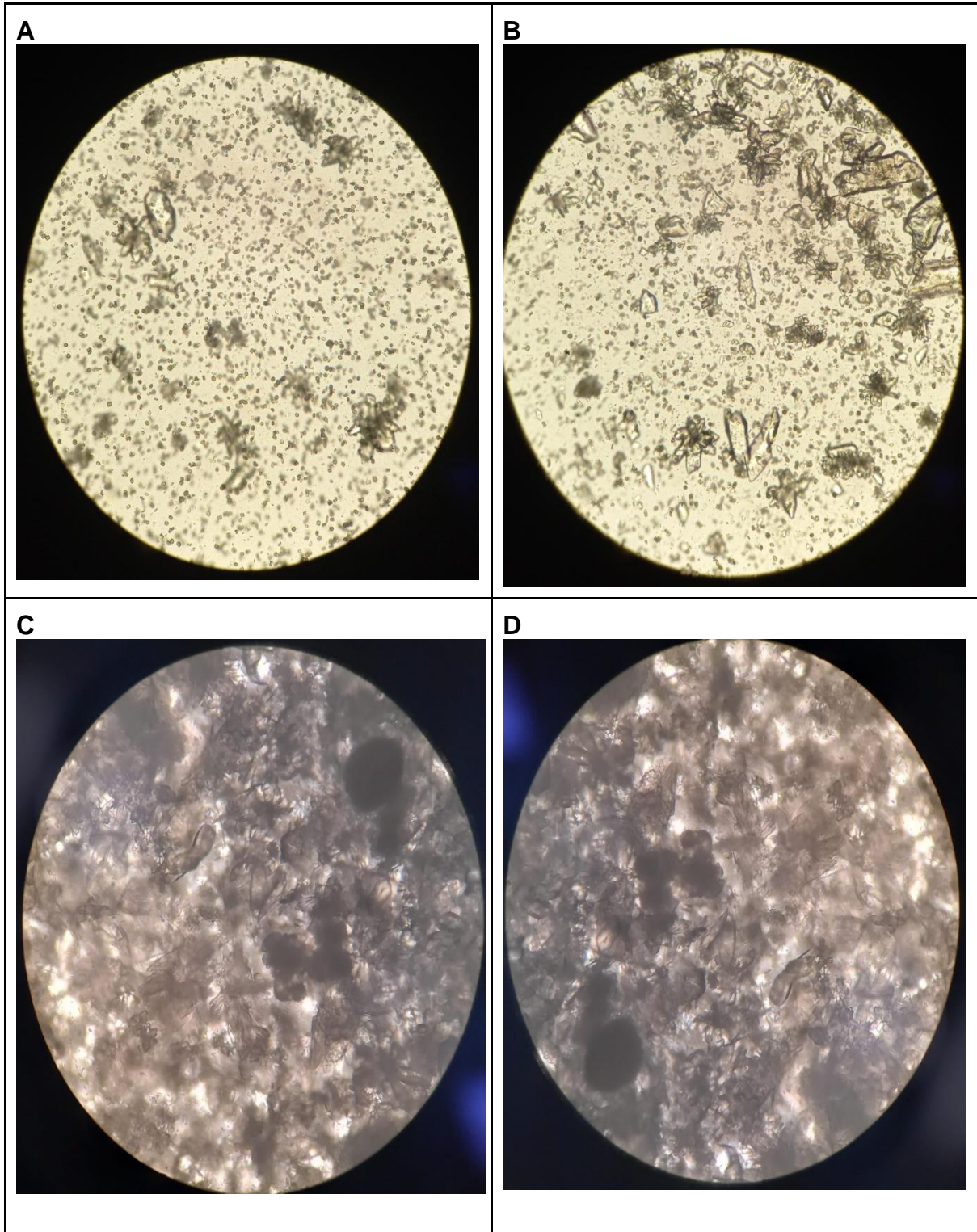
Na determinação do pH e densidade as amostras não apresentaram variações significativas, se mantendo nas faixas de 7,1 a 7,9 na determinação do pH e 1,06 a 1,13 g/mL para a densidade.

Em relação ao estudo de estabilidade físico-química, os resultados obtidos demonstraram que a suspensão oftálmica não apresentou alterações significativas em função do tempo e da condição de armazenamento. No entanto, a análise de doseamento das amostras demonstrou uma grande variação de teor entre as amostras, o que pode indicar um problema de homogeneidade do produto.

14 ANÁLISE DA SUSPENSÃO POR MICROSCOPIA

Na análise das partículas da suspensão realizada por microscopia direta, foi possível observar de acordo com as imagens (figura 31), que são respectivamente as análises microscópicas nos tempos: 0 (zero), 30, 60 e 90 dias após condições de estresse (40°C e 75%UR), que as partículas dispersas na suspensão se apresentavam heterogêneas, seguido também de alterações morfológicas em relação aos cristais presentes no exame de imagem direto. Nos períodos de 60 e 90 dias após armazenamento em estufa a 40°C e 75% UR foi possível visualizar aglomerações de cristais, o que dificultou a análise morfológica das partículas.

Nas suspensões o tamanho das partículas deve ser o mais uniforme possível, proporcionando uma melhor redispersibilidade da suspensão, evitando a compactação do sedimento e contribuindo para uma melhor estabilidade da formulação (POMBAL *et al.*, 2010).



Imagens microscópicas da suspensão oftálmica de cetconazol armazenadas a 40°C e 75% UR por A: 0 dias, B: 30 dias, C: 60 dias e D: 90 dias. Aumento 100x.

15 VOLUME DO SEDIMENTO

Suspensões de cetoconazol, após 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente, apresentaram volume de sedimentação de 0,48 após 48 horas, tempo médio de redispersão igual a 1 minuto e 44 segundos e 48 giros na proveta foram necessários para a completa redispersão da suspensão.

Os ensaios para determinação do volume de sedimentação e do tempo de redispersão são importantes na avaliação da estabilidade física de suspensões, já que indicam se no momento da administração produto será fornecida uma dose precisa do medicamento ao paciente. O volume de sedimento formado foi determinado em função do tempo e os resultados são apresentados na Tabela 15. Pode-se observar que após 2 horas, um alto volume de sedimento ainda foi observado (F=96%) e, somente após 48 horas de estudo, ocorreu diminuição no volume do sedimento formado, que passou a ser 48 %.

Tabela 15 - Volume de sedimentação da suspensão de cetoconazol 5%, armazenados em temperatura ambiente, após 90 dias.

Tempo (horas)	0h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	48h
Volume de sedimentação (F)	1,0	0,96	0,94	0,92	0,88	0,80	0,58	0,48
Tempo médio para redispersão após 48h (min:seg)	1:44							
Nº médio de giros	48 giros							

Ao final do ensaio de sedimentação, o tempo de redispersão foi medido e o valor encontrado foi de 1 minuto e 44 segundos, sendo a suspensão de difícil redispersão. Observou-se a formação de um sobrenadante límpido (Figura 31).

Em formulações de suspensões consideradas ideais, as partículas sólidas devem permanecer dispersas de maneira uniforme no veículo na forma de aglomerados frouxos (flocos) e, quando em repouso, não deve haver a formação de agregado rígido, devendo a redispersão ocorrer rapidamente.

Entretanto, após a retirada das suspensões da proveta, foi observada a presença de partículas visíveis a olho nu aderidas à parede da proveta. Suspensões oftálmicas devem apresentar partículas de diâmetro uniforme e inferiores a 10 µm, o

que poderia causar um certo desconforto no olho após a instilação do medicamento (ALDRICH *et al.*, 2013).

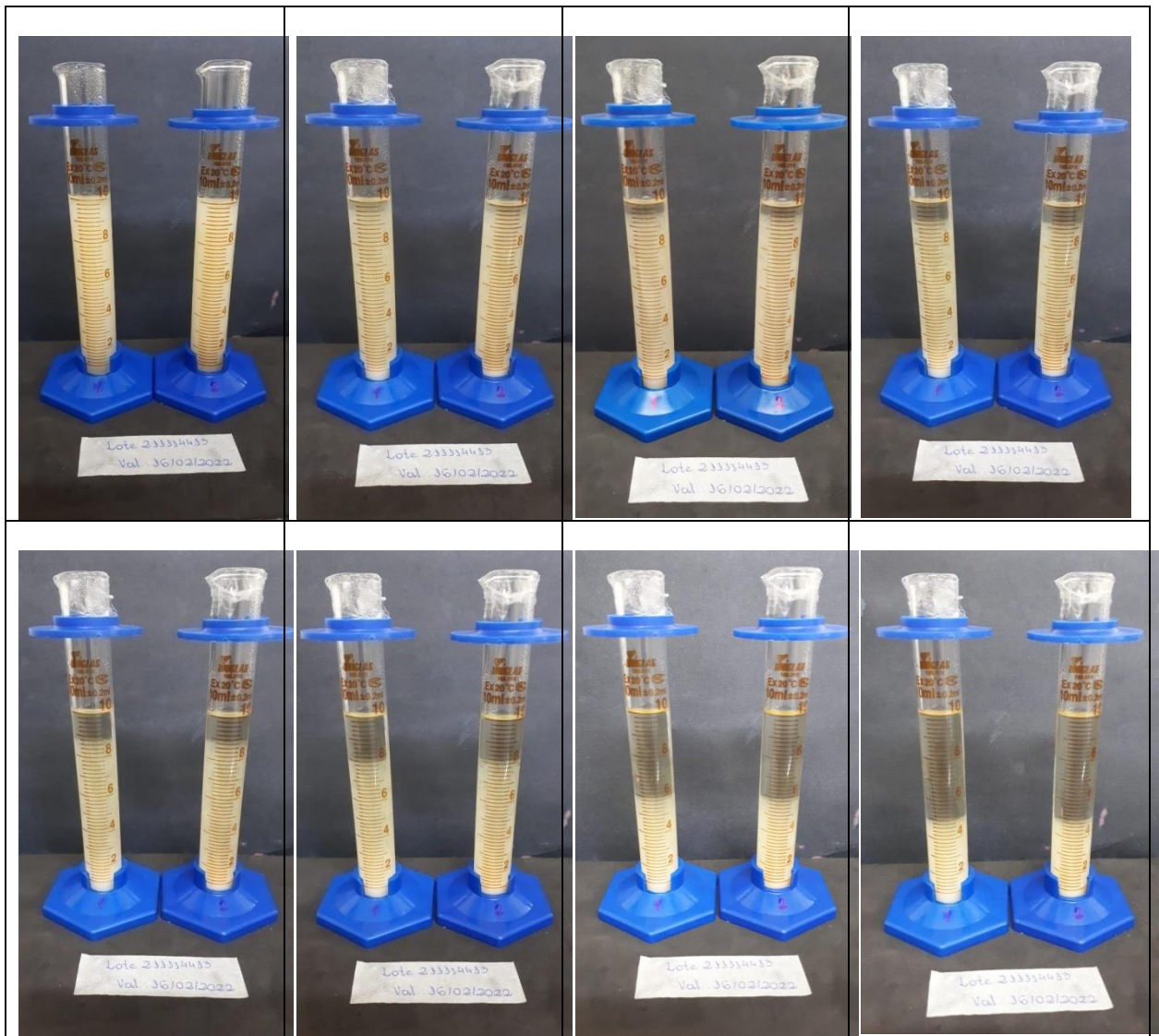


Figura 31 - Imagens representativas da suspensão durante o ensaio para determinação do volume de sedimentação nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas, após armazenamento por 90 dias à temperatura ambiente. Volume total antes da sedimentação = 10 mL

16 VISCOSIDADE

Como não houve flutuação dos valores da viscosidade nas diferentes velocidades, foram utilizados os resultados obtidos a 200 RPM para discussão neste trabalho.

Na tabela 16, pode-se comparar os valores de viscosidade da forma suspensão e do veículo da formulação. Os valores de viscosidade da suspensão são

pouco maiores que a dos veículos. A concentração do cetoconazol presente na suspensão exerce pouca influência na viscosidade do medicamento.

Os valores de viscosidade desta formulação estão bem mais elevados que a viscosidade determinada por Toropainen e colaboradores (2021) em suspensões oftálmicas tópicas de indometacina.

Tabela 16 - Viscosidade da suspensão oftálmica de cetoconazol 5% e do veículo da suspensão, após 90 dias de armazenamento, à temperatura ambiente.

	Suspensão		Veículo	
	Viscosidade (cP)	Torque (%)	Viscosidade (cP)	Torque (%)
Amostra 1	52,05	34,70	45,60	30,40
Amostra 2	51,30	34,20	46,20	30,80
Média	51,67	34,45	45,90	30,60
DP ±	0,53	0,35	0,42	0,28

DP: desvio padrão

17 CONSIDERAÇÕES SOBRE PREPARAÇÕES MAGISTRAIS EM RELAÇÃO AO MEDICAMENTO EM ESTUDO

Considerando as disposições da RDC ANVISA nº 67/ 2007, que trata das boas práticas de fabricação de preparações magistrais

De acordo com a RDC ANVISA nº 67/2007 toda preparação magistral deve ser rotulada com o nome do prescritor, nome do paciente, número de registro da formulação no livro de receituário, data da manipulação, prazo de validade, componentes da formulação com as respectivas quantidades, número de unidades, volume contido, posologia, identificação da farmácia, CNPJ, endereço completo e nome do farmacêutico e registro no Conselho Regional de Farmácia.

A RDC ANVISA nº 67/2007 determina que as empresas devem manter procedimentos escritos sobre conservação, armazenamento e transporte até a dispensação dos produtos magistrais, mantendo sua integridade, e se tratando de produtos termo ou fotossensíveis, devem ser orientados em relação às suas condições de temperatura e armazenamento.

A formulação em estudo apresenta algumas não conformidades em relação à resolução, não apresentando em seu rótulo informações em relação aos excipientes da formulação e suas quantidades, condições especiais de conservação e armazenamento.

Outro problema da formulação está relacionado a dificuldade no manuseio do conta-gotas, sendo que mesmo após um período de agitação antes de usá-lo, a suspensão apresenta uma grande dificuldade para realizar uma instilação, causando entupimento do conta-gotas e podendo acarretar em uma não uniformidade da dose.

18 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido e otimizado através de cromatografia líquida de alta eficiência foi validado, através de testes realizados de acordo com as condições estabelecidas, conforme as exigências da legislação brasileira (BRASIL, 2017). O método otimizado tem como fase móvel metanol e água (95:5), coluna RP-18 com um comprimento de 250 x 4,6 mm (5 µm). O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, temperatura da coluna 25° C. Dentro das condições propostas o método se mostrou seletivo, sendo o método capaz de identificar o analito mesmo frente os excipientes da formulação e produtos de estresse, linear na faixa de trabalho de 0,08 mg/mL a 0,12 mg/mL, preciso, exato e robusto para quantificação de cetoconazol na forma farmacêutica suspensão oftálmica.

A formulação em análise apresentou uma grande dificuldade na extração da amostra. Os solventes utilizados para tentar uma melhor solubilização da amostra e extração do fármaco foram: metanol, diclorometano, acetonitrila e uma mistura de metanol com THF (50:50). Dentre os solventes utilizados, o metanol apresentou melhor desempenho de extração do fármaco a partir da suspensão oftálmica.

O rótulo do frasco do colírio analisado apresentava algumas não conformidades segundo o que é preconizado pela legislação de produtos manipulados, a RDC ANVISA nº 67/2007. No rótulo, não apresentava informações quanto aos constituintes da formulação e suas respectivas concentrações, tampouco apresentava informações em relação a sua conservação e armazenamento. Por se tratar de um fármaco que apresenta algumas restrições em relação a sua estabilidade, seria de grande importância a presença no rótulo de orientações informativas quanto ao seu armazenamento e conservação.

Em relação a este estudo, foi verificado que o cetoconazol permaneceu estável frente a algumas condições adversas de estresse, como hidrólise ácida, básica, neutra, e exposição ao calor. Porém foi identificado que o cetoconazol apresentou um processo de degradação com uma diminuição no percentual do teor nas condições oxidativas, frente ao peróxido de hidrogênio (81,88%), na exposição à luz ultravioleta (84,62%) e apresentando total degradação do fármaco na exposição à luz por 48 horas (1,95%). Devido ao fato do cetoconazol ser um produto fotossensível, seria sugestivo o acondicionamento das formulações em frasco cor

âmbar, esses frasco filtram luzes de comprimento de onda inferior a 470 nm, e também através de estocagem em locais desprovidos de luminosidade (SILVA *et al.*, 2009).

Em relação às características físicas a formulação não apresentou alterações em relação às suas características organolépticas, não houve variações significativas de pH e densidade para as amostras analisadas nas condições de armazenamento $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\%\text{UR}\pm 5\text{ UR}$ no tempo zero e durante os 90 dias.

A heterogeneidade das partículas foi observada através de microscopia direta, onde foi possível observar partículas com tamanho e morfologias diferentes. E isto possivelmente afeta o processo de redispersibilidade da suspensão, influenciando no processo de instilação pela dificuldade da retirada da dose do conta-gotas, conseqüentemente levando a uma não uniformidade de dose para realização do tratamento.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019), para uma administração de doses corretas e seguras, cada unidade do lote de um medicamento deve apresentar quantidades dos componentes ativos próximos a quantidade declarada. A difícil ressuspensão do medicamento e a detecção de teores em desacordo com a Farmacopeia Brasileira, ao longo do tempo de armazenamento de 90 dias, sugerem que a suspensão estudada não tem uniformidade no tamanho das partículas e no conteúdo.

REFERÊNCIAS

- ALDRICH *et al.* Ophthalmic Preparations. **US Pharmacopeia**. 39.5. pp. 1-21, 2013.
- ALMEIDA, H., *et al.* Preparações oftálmicas – novas estratégias para a promoção da biodisponibilidade. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. vol. 10, n.1, pp.44-83, 2021.
- ALMEIDA, L. C. *et al.* Avaliação da qualidade de formulações magistrais fotoprotetoras géis-creme comercializadas na região centro oeste de Minas Gerais. **Revista Conexão Ciência**. v. 5, n. 3, p. 24-42, 2020.
- ALVES, D.N. *et al.* Pontos de corte para a classificação de compostos anti-cândida na triagem de antifúngicos. **BioMed Research International**. v. 2021. p.1-8, 2021.
- ALVES, R.M.V. *et al.* Embalagens plásticas e de vidro para produtos farmacêuticos: avaliação das propriedades de barreira à luz. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**. v. 29, n.2, p. 169-180, 2008.
- ARAÚJO, B. V. **Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica do antifúngico voriconazol**. 2008. Porto Alegre. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre.
- ARENAS, R. *et al.* Classification of subcutaneous and systemic mycoses. **Clinics in Dermatology**. v.30 (4). p. 369-371, 2012.
- BARRIOS, J. G. *et al.* Validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do adapaleno em suspensões de nanocápsulas. **Química Nova**. vol. 34, No. 8, p. 1464-1467, 2011.
- BATISTUZZO, J., LIMA, F. A. **Formulações Magistrais em Oftalmologia**. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. vol. 1, nº. 1, p. 65-76, 2011.
- BLESSY, M., RUCHI, D. P., PRAJESH N. P., AGRAWAL, Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—a review. **Journal of pharmaceutical analysis**. 159 -165, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007. **Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília - DF, 9 de outubro de 2007, BRASIL.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 318, 06 de novembro de 2019. **Publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 de novembro de 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE. nº 166, de 24 de julho de 2017**. Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de julho de 2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira. 6ª ed.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019, 836 p., v.2

BRUNALGH, A. D. *et al.* **Essential Pharmaceutics. Introductions in the Pharmaceutical Sciences**. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2019.

CAPELINI, L. F. **O funcionamento do olho humano: uma sequência didática para o ensino de óptica geométrica no ensino médio**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ensino de Física) - Faculdade de Física, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2019.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Espanõla de Quimioterapia**. vol. 19 (Nº 2), p. 130-139, 2006.

CATALÁN, M; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CAZEDEY, E. C. L., *et al.* Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**. vol.30 no.4 São Paulo Julho, 2007.

CHACRA, N. A. B. **Suspensão oftálmica e Dexametasona e Polimixina B. Formulação da Avaliação da Eficácia Antimicrobiana dos Conservantes**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994.

CHOI, F. D., *et al.* Topical Ketoconazole: A Systematic Review of Current Dermatological Applications and Future Developments. **Journal of Dermatological Treatment**. 1-33, 2019.

CHOLKAR, K. *et al.* **Eye: anatomy, physiology and barriers to drug delivery**. Division of Pharmaceutical Sciences. School of Pharmacy, University of Missouri-Kansas City. p. 1-36, USA, 2013.

COLLINS, C.H., *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP. 452p. 2006.

CREEMERS, S. G. *et al.* Levoketoconazole, the 2S,4R Enantiomer of Ketoconazole, a New Steroidogenesis Inhibitor for Cushing's Syndrome Treatment. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 106, n. 4, p. 1618–1630, 2021.

FRANÇA, R. R. F. *et al.* Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual Química**. vol. 6, n. 5, p. 1483-1516, 2014.

FRONZA, T., *et al.* **Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos**. Acta Farm. Bonaerense. vol. 23. pp. 558-566, 2004.

GINDRI, A. L., *et al.* **Estudo da estabilidade acelerada de formulações contendo cetoconazol xampu a 2%**. Santa Maria. v. 38, nº. 1, p. 139–149, 2012.

GOES, A. M. KFURI, C. R. Desenvolvimento e pesquisa de suspensão pediátrica de hidróxido de alumínio. **Revista Científica da Universidade de Franca**. Franca-SP. vol. 5. p. 139 -144, 2005.

HELENE, O., HELENE, A. F. Alguns aspectos da óptica do olho humano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, nº. 3, p. 1-8, 2011.

ICH Q2 (R1). **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human use**. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 R1 (2005). Disponível em <<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>> Acesso em Abril de 2021.

INMETRO: **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Inmetro. Rio de Janeiro, março, 2003.

ISQUIBOLA, G., RODRIGUES, E. C. Estudo da degradação de dipirona sódica comercial por meio de luz ultravioleta e visível. **Revista Brasileira de Iniciação Científica (RBIC)**. v. 6, n.7, p. 82-93, 2019.

KAUR, I. P. *et al.* Development of effective ocular preparations of antifungal agents. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. vol. 24, nº 5, p.481-93, 2008.

KEDOR-HACKMANN, E. R. M. *et al.* Determinação do cetoconazol em emulsões por espectrofotometria no ultravioleta por derivada de primeira ordem e cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 91-98, 2006.

KULSHRESHTHA, A.K.; SINGH, O.N.; WALL, G.M. **Pharmaceutical suspensions from formulation development to manufacturing**. 1 ed, New York: Springer, 2010, 327.

LOMBARDO, M. Estabilização e conservação de formulações farmacêuticas e cosméticas: aspectos de qualidade e de segurança. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**. vol. 7. pp. 43-55, 2020.

LOPES, M. S. **Estudo de estabilidade e compatibilidade do cetoconazol**. 2019. Alfenas. Dissertação (Mestrado em Química). Área de concentração: Química Analítica. Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.

LOZANO, J. K. *et al.* Características clínico-epidemiológicas y evolución del tratamiento en pacientes con úlceras corneales. **Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**. Asunción, Paraguay, 17(1): 16-24, 2019.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. P. 449-460. Ribeirão Preto – SP, 2006.

MARUJO, F. I., *et al.* Distribuição das ceratites infecciosas em hospital terciário no Brasil. **Arquivo brasileiro de oftalmologia**, 2013.

MENDONÇA, C.C. *et al.* Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação in vitro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.p.35-46, 2009.

MHASKE, R. A.; SAHASRABUDHE, S. Identification of Major Degradation Products of Ketoconazole. **Scientia Pharmaceutica**. v.79, p. 817–836, 2011.

MUCHTARIDI, M. *et al.* Forced degradation study of statins: a review. **International Journal of Applied Pharmaceutics**. ISSN- 0975-7058. vol. 10, nº 6. p. 38 – 42, 2018.

MULLER, G. G. *et al.* Perfil epidemiológico das ceratomicoses atendidas no HC-UNICAMP. **Arquivo Brasileiros de Oftalmologia**. vol.75 (4), 2012.

NESSO, J. A. *et al.* Úlcera de córnea: Levantamento das principais prevalências. **Revista de Pesquisa em Saúde**. vol. 19, nº3, p.132 - 135, 2018.

NOURIEH, N. *et al.* (2019). **Photocatalytic degradation of ketoconazole by Z-scheme Ag₃PO₄/graphene oxide: response surface modeling and optimization**. **Environmental Science and Pollution Research**. v.27. p. 253-260, 2019.

OLIVEIRA, P.R. *et al.* **Sociedade Brasileira de Lentes de Contato**. Ceratite fúngica. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**, 2001.

PERARO, A. C. **Estabilidade física e metodologia analítica para formulações farmacêuticas contendo cetoconazol**. 2001. Dissertação (Mestrado em produção e controle farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

POMBAL, R. *et al.* Estabilidade dos medicamentos manipulados. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. nº 7, p. 330-341, 2010.

PORTE, A.; PORTE, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em flavours de frutas. **Química Nova**. Vol. 37, nº 10, p. 1670-1679, 2014.

PRIYANKA, V., *et al.* Review on Basic Concept for Ophthalmic Preparations. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**. Vol. 3. pp. 1-9, 2015.

QUILES, S. *et al.* Revisión de la estabilidad de los medicamentos fotosensibles. **Farmacia Hospitalaria**. v.35, p. 205-215, 2011.

RATO, M. *et al.* Epidemiologia das Infecções Fúngicas Superficiais em Portugal: Revisão de 3 Anos (2014-2016). *Revista SPDV* 76(3). Portugal, 2018.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. vol. 27, nº 5, p. 771 – 780, 2004.

RITTER, J. M. *et al.* Rang & Dale. **Farmacologia**. 9º edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2020.

RUBIM *et al.*, 2012. Validação de metodologia por UV/VIS para quantificação de cetoconazol em comprimidos. **Revista Brasileira de Farmácia**. p.510-514, 2012.

SALERA, C. M. *et al.* Perfil das ceratites fúngicas no Hospital São Geraldo Belo Horizonte - **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. Belo Horizonte -MG, 2002.

SANDHAN, V. R, *et al.* Formulation Development of Ketoconazole Ophthalmic. Department of Quality Assurance Techniques, R. G. Sapkal College of Pharmacy, Anjaneri, Nashik – Maharashtra, India, 2013.

SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas**. Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda - RJ, Brasil, 2016.

SANTOS, J.L. *et al.* Estudo de metodologia analítica para a determinação do cetoconazol em formulações farmacêuticas. **Departamento de Fármacos e Medicamentos**. Universidade Estadual Paulista. Araraquara - SP. 2009.

SAURABH, S. *et al.* Validation of novel UV Spectrophotometric method for the determination of Ketoconazole in Pharmaceutical Formulation. **Journal of Pharmaceutical Advanced Research**. V. 3(2), p. 792-798, 2020.

SCHWANZ, T. G.; MORH, S. Determinação de bifenilos policlorados em milho através de extração em fase sólida seguida de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**. v. 35, n. 3, p. 553-558, 2012.

SENA, L. C. S., *et al.*, 2014. Excipientes Farmacêuticos e seus riscos à saúde: uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde**. vol.5. n.4. pp. 25-34. São Paulo, 2014.

SILVA, K. E. R. *et al.* Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia** .7a edição -Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2006.

SINGH, M. *et al.* Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 2020.

STAUB, I. **Avaliação de fotoestabilidade do cetoconazol e determinação das atividades antifúngica e da segurança biológica in vivo e in vitro do xampu de cetoconazol**. 2005. 224f.Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

STAUB, I. *et al.* Photostability Studies of Ketoconazole: Isolation and Structural Elucidation of the Main Photodegradation Products. **Latin American Journal of Pharmacy**. vol. 29, nº 7. P. 1100-1106, 2010.

STAUB, I., *et al.* Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Rio Grande do Sul, nº. 2, p. 36 - 37, 2007.

TAMIZI, E., JOUYBAN, A. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: selection of stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 98, p. 26-46, 2016.

THOMAS, P.A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.4, p.730-797, 2003.

TIAN, T. *et al.* Development and Validation of Stability-Indicating Method for the Simultaneous Determination of Ketoconazole and Beauvericin in Pharmaceutical Tablets. **Journal of Chromatographic Science**. vol. 54, nº. 3, p. 361–366, 2016.

TOROPAINEN, E., *et al.* Biopharmaceutics of Topical Ophthalmic Suspensions: Importance of Viscosity and Particle Size in Ocular Absorption of Indomethacin. **Pharmaceutics**. vol.13, nº 4, p.452, 2021.

TORRADO, M. F. B., *et al.* Generalidades de Queratitis Micótica. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. UNITED States Pharmacopoeia**. 39 nd. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2013.

TOSSATO, C. R. A função do olho humano na óptica do final do século XVI. **Scientiae Studia**, v. 3, p. 415 - 441, 2005.

TUBINO, M.; SIMONI, J. A. Determinação experimental dos raios cristalográficos dos íons sódio e cloreto. **Química Nova**. vol. 30, nº 7, p. 1763-1767, 2007.

UDDIN, S., *et al.* Quality Control Tests for Ophthalmic Pharmaceuticals: Pharmacopoeial Standards and Specifications. **Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences**. Vol. 14. pp.1-17, 2017.

USP 29. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 29 ed. 2006.

VENISHETTY, V. K., *et al.* Application of validated RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in solid lipid nanoparticles. **Journal of chromatographics science**. vol. 49, february, 2011.

VERTZONI *et al.* Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of Ketoconazole in canine plasma. **Journal of Chromatography B**, 839, p. 62–67, 2006.

VILARIÑO, R. Q. **Estudos de estabilidade de fórmulas magistrais oftálmicas**. 2019. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Portugal.