

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DESONIDA: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS E ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE  
DE FORMULAÇÕES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Muriele Picoli Braga**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

# **DESONIDA: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES**

**Muriele Picoli Braga**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Inês Horn Adams**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESONIDA: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
E ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES**

elaborada por  
**Muriele Picoli Braga**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Andrea Inês Horn Adams, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

**Cristiane de Bona da Silva, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

**Lisiane Bajerski, Dr<sup>a</sup>.** (URI)

Santa Maria, 26 de abril de 2013.

*Este trabalho é dedicado à minha família, pelo companheirismo de todas as horas, paciência, compreensão, estímulo, amor e carinho sempre presentes, razão da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Andréia I. H. Adams*, pela disponibilidade na orientação deste trabalho, pelo conhecimento e aprendizado importantes para minha vida profissional, pela oportunidade concedida e pela confiança, amizade e apoio.

À minha família, pelo amor, apoio e incentivo, fundamentais durante este período e sempre. À minha *mãe*, pelos ensinamentos de vida, pela dedicação, compreensão, amizade e amor. Às minhas irmãs, *Micheli* e *Francine*, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Ao meu pai, pelo carinho mesmo distante.

Ao *Daniel*, meu namorado, amigo e companheiro, por estar sempre disposto a me ouvir, por participar integralmente de minha vida, pela compreensão, incentivo, atenção, amizade e amor.

Ao Laboratório de Avaliação Biofarmacêutica e Controle de Qualidade (LABCQ) que me acolheu, disponibilizando equipamentos e materiais.

Às “incansáveis” *Tássia Dalcin* e *Priscila Rosa*, pela ajuda prestada, pelo companheirismo, dedicação, incentivo e amizade de todas as horas.

Às demais amigas e colegas do LABCQ (*Ana Christ*, *Mariana Machado*, *Ana Salla* e *Karla Ribas*) pela ótima convivência, por me fazerem sentir tão bem no ambiente de trabalho, pelos ensinamentos, auxílio e amizade.

Às amigas de sempre: *Natália*, *Camila* e *Jucimara*, pelo constante apoio, longe ou perto, nas horas de alegria e principalmente de desânimo, pela amizade, paciência e incentivo.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) de Santa Maria/RS, pelas análises de espectrofotometria no IV e ao Laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola da UFSM, pelas análises de ponto de fusão.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

*“O IMPORTANTE NÃO É ESTAR AQUI OU ALI, MAS SER.  
E SER É UMA CIÊNCIA DELICADA,  
FEITA DE PEQUENAS-GRANDES OBSERVAÇÕES DO COTIDIANO,  
DENTRO E FORA DA GENTE.  
SE NÃO EXECUTAMOS ESSAS OBSERVAÇÕES,  
NÃO CHEGAMOS A SER:  
APENAS ESTAMOS E DESAPARECEMOS.”*

*(CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE)*

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DESONIDA: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES**

AUTORA: MURIELE PICOLI BRAGA

ORIENTADORA: DR<sup>a</sup> ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 26 de abril de 2013.

A desonida é um corticosteroide não fluorado com atividade glicocorticoide usada topicamente no tratamento de dermatite atópica, doenças inflamatórias e pruriginosas e dermatite seborreica de intensidade leve a moderada. No mercado brasileiro estão disponíveis as formas farmacêuticas pomada, creme, loção cremosa, gel creme e loção capilar. Até o momento, não constam monografias da desonida em compêndios oficiais, tanto para o controle de qualidade da matéria-prima, quanto das formas farmacêuticas. No presente trabalho, foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da desonida em loção cremosa e gel creme, e foram realizados estudos de fotoestabilidade dessas formulações. Os métodos por CLAE para ambas as formulações foram validados frente aos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, robustez e especificidade, cujos resultados indicaram que ambos os métodos são indicativos de estabilidade. Ferramentas quimiométricas foram usadas para o estudo da robustez dos métodos propostos (loção e gel creme), bem como na etapa de otimização das condições cromatográficas (gel creme). Os estudos de fotoestabilidade para ambas as amostras foram conduzidos de maneira equivalente, através de exposição à radiação UVA (352 nm) de porções da amostra, por até 48h, e demonstraram que as duas formulações analisadas sofrem fotodegradação, sendo que a velocidade de degradação da loção é maior do que a observada para o gel creme ( $t_{90\%}$  de 1,58 h para a loção e de 3,65 h para o gel). O estudo da cinética das reações indicou que a loção cremosa segue cinética de segunda ordem, enquanto o gel creme segue cinética de primeira ordem.

Palavras-chave: Desonida. Validação de métodos. Cromatografia líquida. Planejamento fatorial. Estudo de fotoestabilidade.

## **ABSTRACT**

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **DESONIDE: VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD AND PHOTOSTABILITY STUDY OF FORMULATIONS**

AUTHOR: MURIELE PICOLI BRAGA

ADVISER: DR<sup>a</sup> ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

Presentation date: Santa Maria, April 26<sup>th</sup> 2013.

Desonide is a nonfluorinated corticosteroid with glucocorticoid activity. It is used topically in the treatment of atopic dermatitis, inflammation, pruritus and seborrheic dermatitis of mild to moderate severity. In Brazil, this drug is available as ointment, cream, lotion, hair lotion and cream gel. Until now, there are no official methods focused in the quality control of desonide raw material or its pharmaceutical forms. In this work, methods were developed and validated by high performance liquid chromatography (HPLC) for quantitation of desonide in lotion and cream gel. Furthermore, photostability studies of these formulations were conducted. The HPLC methods were validated by parameters of linearity, precision, accuracy, robustness and specificity, which results showed that both methods are stability-indicating. Chemometric tools were used to study the robustness of the proposed methods (desonide lotion and cream gel) and also for the optimization of chromatographic conditions (cream gel). Photostability studies were conducted with an equivalent procedure, by exposure to UVA radiation (352 nm) portions of the samples for a period of 48 h. The results showed that both formulations undergo photodegradation, and the lotion exhibits a degradation rate greater than the cream gel ( $t_{90\%}$  1.58 h for the lotion and 3.65 h for the gel). The study of the kinetics of the reactions indicated that lotion follows second-order kinetics, while the cream gel follows first order kinetics.

Keywords: Desonide. Method validation. Liquid chromatography. Factorial design. Photostability study.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Estrutura química do ciclo básico dos corticoides (ciclopentanoperidrofenantreno) e (B) da desonida .....	24
--	----

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Espectro de absorção na região do UV de solução de desonida preparada em metanol, na concentração de 50 µg/mL .....	37
Figura 2 – Espectro de absorção na região do UV referentes aos corticosteroides hidrocortisona e betametasona (WATSON, 2005) .....	38
Figura 3 – Espectro na região do IV da matéria-prima de desonida.....	40
Figura 4 – Espectro na região do IV da desonida (SCIFINDER, 2012b) ..	40

### CAPÍTULO 2

Figure 1. Chemical structure of desonida .....	65
Figure 2. Typical chromatogram of desonide reference substance (a); desonide lotion at 30 µg/mL (b); placebo lotion (c). Peaks: methylparaben (1) and propylparaben (2) .....	66
Figure 3. Chromatograms of desonide lotion after acid stress (a) – HCl 0,1 M/3 h; basic stress (b) – NaOH 0,1 M/3 h; oxidative treatment (c) – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %/24 h and UVA radiation (d) – 3 h. Peaks: methylparaben (1); propylparaben (2) and hydrogen peroxide (4) .....	67
Figure 4. Pareto chart of the standardized effects of the factors discussed in the robustness of the assay method .....	68

Figure 5. Chromatograms of degradation of desonide lotion: (a) at zero time, and (b) after 24 hours of exposure to UVA radiation .....	69
Figure 6. Results of desonide lotion assay, under exposure to UVA radiation .....	70

### **CAPÍTULO 3**

Figura 1 – Figura 1 – (A) Superfície de resposta e (B) curvas de contorno obtidas através do delineamento composto central rotacional para a resolução .....	86
Figura 2 – Cromatogramas: da solução amostra (A), mistura dos conservantes (B) e da desonida SQR (C). Condições analíticas: coluna C18 (Luna Phenomenex®, 150 x 4,6 mm (5 µm, 100 Å), fase móvel metanol:acetonitrila:água pH 7,0 (50:10:40 (v/v/v), fluxo 1,00 mL/min, detecção 244 nm. Picos: Metilparabeno (1); etilparabeno (2); propilparabeno (3) e butilparabeno (4) .....	88
Figura 3 - Cromatogramas do gel de desonida. Hidrólise ácida (A) – HCl 1M/6h (correspondente ao mesmo cromatograma da amostra íntegra); hidrólise básica (B) – NaOH 1 M/10 min; oxidação (C) – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%/24 h e radiação UVA (D) – 5 h. Picos: Metilparabeno (1); etilparabeno (2); propilparabeno (3); butilparabeno (4) e peróxido de hidrogênio (5).....	90
Figura 4 – Representação da curva analítica média e equação da reta pelo método por CLAE da desonida, na faixa de 5 a 100 µg/mL .....	92
Figura 5 – Gráfico de Pareto para as variações de fatores avaliadas na robustez da metodologia por CLAE para desonida .....	96

Figura 6 - Cromatogramas da fotodegradação do gel creme de desonida: (A) no tempo zero, e (B) após 48 horas de exposição em UVA (352 nm) tempo zero, e (B) após 48 horas de exposição em UVA (352 nm). Condições analíticas: coluna C18 (Luna Phenomenex®, 150 x 4,6 mm (5 µm, 100 Å), fase móvel metanol:acetonitrila:água pH 7,0 (50:10:40 (v/v/v), fluxo 1,00 mL/min, detecção 244 nm..... 98

Figura 7 - Representação gráfica da cinética de primeira ordem de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada da amostra de desonida gel creme em câmara de luz UV de 352 nm..... 99

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1- Valores obtidos para o ponto de fusão da desonida .....	36
---	----

### CAPÍTULO 2

Table 1. Parameters for the 2 <sup>4</sup> full factorial design to determine the robustness .....	59
--	----

Table 2. Assay of desonide in lotion sample solution under stress testing.....	60
--	----

Table 3. Method repeatability and intermediate precision to desonide lotion .....	61
---	----

Table 4. Accuracy data for proposed desonide LC method .....	62
--	----

Table 5. Full factorial design and results of the analysis of the robustness of the analytical method .....	63
---	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Teores percentuais de desonida na solução amostra do gel sob estudo de degradação forçada .....	91
--	----

Tabela 2 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva analítica de desonida por CLAE .....	92
---	----

Tabela 3 - Ensaio de repetibilidade e precisão intermediária para desonida gel pelo método por CLAE .....	93
---	----

Tabela 4 - Percentual de recuperação da SQR de desonida adicionada ao gel comercial de desonida inicialmente pesado .....	94
---	----

Tabela 5 - Projeto fatorial e resultados da análise da robustez do método analítico para desonida por CLAE .....	95
Tabela 6 - Resultados do teor residual de desonida no gel após fotodegradação (UVA, 352 nm) .....	97

## **DISCUSSÃO GERAL**

Tabela 1 - Comparação dos métodos de análise por CLAE e estudo de fotoestabilidade das duas formulações de desonida estudadas .....	110
---	-----

## LISTA DE QUADROS

### **CAPÍTULO 1**

Quadro 1 – Termos descritivos de solubilidade e seus significados ..... 33

Quadro 2 – Atribuição das principais bandas do espectro de IV da matéria-prima de desonida ..... 41

### **CAPÍTULO 3**

Quadro 1 - Parâmetros do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para determinar a metodologia analítica ..... 78

Quadro 2 - Projeto fatorial para análise da robustez do método analítico para desonida por CLAE ..... 84

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAS	<i>Chemical Abstracts</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCC	Delineamento composto central
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IV	Infravermelho
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta
UVD	Espectrofotometria derivada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
3.1 Desonida .....	22
3.1.1 Aspectos gerais .....	22
3.1.2 Descrição .....	23
3.1.3 Apresentação .....	24
3.1.4 Mecanismo de ação .....	24
3.1.5 Farmacocinética .....	25
3.1.6 Reações adversas .....	26
3.1.7 Determinação quantitativa .....	26
3.2 Estudos de estabilidade .....	27
3.3 Estudos de fotoestabilidade .....	29
<b>CAPÍTULO 1: MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE DESONIDA .....</b>	<b>32</b>
1.1 Dados da substância química de referência .....	32
1.2 Solubilidade .....	32
1.3 Determinação do ponto de fusão .....	33
1.3.1 Material .....	33
1.3.2 Método .....	33
1.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) .....	34
1.4.1 Material .....	34
1.4.2 Método .....	34
1.5 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) .....	34
1.5.1 Material .....	34
1.5.2 Método .....	35
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>



<b>2.1 Solubilidade .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Ponto de fusão .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3 Espectrofotometria na região do UV .....</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Espectrofotometria na região do IV .....</b>	<b>39</b>
<b>3 CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 2: PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>44</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>46</b>
<b>EXPERIMENTAL .....</b>	<b>47</b>
<b>2.1 Chemical and reagentes .....</b>	<b>47</b>
<b>2.2 Chromatographic conditions .....</b>	<b>47</b>
<b>2.3 Statistical software .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4 Preparation of reference and sample solutions .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5 Validation of the LC-method .....</b>	<b>48</b>
2.5.1 Specificity .....	48
2.5.1.1 Acidic and basic hydrolysis .....	49
2.5.1.2 Oxidative condition .....	49
2.5.1.3 Thermal stress .....	49
2.5.1.4 Photodegradation .....	49
2.5.2 Linearity .....	49
2.5.3 Precision .....	50
2.5.4 Accuracy .....	50
2.5.5 Robustness .....	50
<b>2.6 System suitability .....</b>	<b>51</b>
<b>2.7 Photostability study of the desonida lotion .....</b>	<b>51</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Optimization of the method .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Validation of the analytical method .....</b>	<b>52</b>
3.2.1 Specificity .....	52
3.2.2 Linearity .....	53
3.2.3 Precision .....	53

3.2.4 Accuracy .....	53
3.2.5 Robustness .....	54
<b>3.3 Solution stability .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4 System suitability .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Photostability study .....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 3: GEL CREME DE DESONIDA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DOSEAMENTO POR CLAE ATRAVÉS DA OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE .....</b>	<b>71</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>73</b>
<b>2.1 Planejamento experimental .....</b>	<b>73</b>
<b>3 EXPERIMENTAL .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Substância química de referência, amostra e reagentes .....</b>	<b>75</b>
<b>3.2 Condições cromatográficas .....</b>	<b>76</b>
<b>3.3 Software estatístico .....</b>	<b>76</b>
<b>3.4 Preparo das soluções .....</b>	<b>77</b>
3.4.1 Soluções estoque e de trabalho de desonida SQR .....	77
3.4.2 Solução amostra .....	77
<b>3.5 Otimização dos parâmetros cromatográficos .....</b>	<b>77</b>
<b>3.6 Validação do método .....</b>	<b>78</b>
3.6.1 Identificação da amostra .....	78
3.6.2 Adequabilidade do sistema .....	79
3.6.3 Especificidade .....	79
3.6.4 Linearidade .....	80
3.6.5 Precisão .....	80
3.6.6 Exatidão .....	81
3.6.7 Robustez .....	83
<b>3.7 Estudo de fotoestabilidade do gel creme de desonida .....</b>	<b>84</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>

<b>4.1 Otimização do método .....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 Validação do método .....</b>	<b>87</b>
4.2.1 Identificação da amostra .....	87
4.2.2 Adequabilidade do sistema .....	89
4.2.3 Especificidade .....	89
4.2.4 Linearidade .....	91
4.2.5 Precisão .....	92
4.2.6 Exatidão .....	93
4.2.7 Robustez .....	94
<b>4.3 Estudo de fotoestabilidade do gel creme de desonida .....</b>	<b>97</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>105</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>114</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos qualitativos e quantitativos destinados à avaliação de fármacos e medicamentos faz parte de um conceito que visa garantir a qualidade, a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos. A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico do método são adequados para fim pretendido (ICH, 2005; USP 35, 2012). Os métodos analíticos devem permitir uma análise completa do produto, contemplando aspectos como a identificação e a determinação do teor de substância ativa, a identificação e a determinação dos níveis de impurezas e produtos de degradação, assim como a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (WATSON, 2005).

O desenvolvimento de métodos para a análise de produtos farmacêuticos deve ser realizado a partir de um bom planejamento (WATSON, 2005). O planejamento experimental é uma importante ferramenta estatística e, devido a sua simplicidade, vem sendo cada vez mais utilizado, pois permite o estudo de diferentes variáveis simultaneamente, minimizando o tempo e o custo dos ensaios (MONTGOMERY, 2000; TEOFILO; FERREIRA, 2006; RODRIGUES; LEMMA, 2009),

A desonida é um corticosteroide não fluorado com atividade glicocorticoide, comercializado nos Estados Unidos desde o início da década de 70 (HEBERT et al., 2008). Possui ação anti-inflamatória, antipruriginosa e vasoconstritora, sendo utilizada topicamente no tratamento de várias desordens da pele, tais como dermatite atópica, doenças inflamatórias e pruriginosas e dermatite seborreica de intensidade leve a moderada (KIRCIK; DEL ROSSO, 2007; SWEETMAN, 2009). No Brasil encontra-se disponível nas formas de creme (0,5 mg/g), pomada dermatológica (0,5 mg/g), loção cremosa (0,5 mg/g) e gel creme (0,5 mg/g) para uso tópico, além de loção capilar (1,0 mg/g) (BRASIL, 2013).

Mesmo sendo comercializada há quase quatro décadas, até o momento, não constam em farmacopeias monografias da desonida, tanto para o controle de qualidade da matéria-prima, quanto para a forma farmacêutica.

Os corticosteroides são moléculas reconhecidamente suscetíveis à degradação por hidrólise e fotólise (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001), fato este comprovado por IQBAL e colaboradores (2006), os quais relataram a fotoinstabilidade da desonida em solventes orgânicos (acetonitrila e isopropanol), quando exposta a radiações UVC e UVB. Cabe ressaltar que estudos realizados por nosso grupo de pesquisa indicaram a instabilidade da matéria-prima de desonida e de soluções capilares quando diretamente expostos à radiação UVA (352 nm) (DALLA SANTA et al., 2013). Cabe salientar que o laboratório produtor do referido medicamento não recomenda cuidados especiais em relação à proteção solar após aplicação.

Considerando a carência de informações inerentes à molécula e a ausência de métodos oficiais para sua determinação e identificação, justifica-se o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos quantitativos e o estudo de estabilidade de formulações comerciais, com o intuito de se obter dados relevantes sobre este fármaco e suas preparações, de modo a contribuir para a segurança e a eficácia de sua terapia medicamentosa.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho visa o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para o doseamento da desonida em loção cremosa e gel creme, bem como o estudo da fotoestabilidade dessas formulações.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar e identificar a substância química de referência (SQR), através da determinação da solubilidade e do ponto de fusão; e por espectrofotometria na região do ultravioleta e espectrofotometria na região do infravermelho;
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para doseamento do fármaco em loção cremosa;
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para doseamento do fármaco em gel creme;
- A partir dos estudos de degradação forçada, identificar as condições mais adversas à estabilidade do fármaco nas formulações estudadas;
- Realizar estudos de fotoestabilidade das formulações em estudo, frente à radiação UVA.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Desonida

#### 3.1.1 Aspectos gerais

Os corticosteroides tópicos foram introduzidos no tratamento dermatológico em 1952, quando a hidrocortisona foi empregada com sucesso, por Sulzberger e Witten, no tratamento de dermatoses (HENGGE et al., 2006). Desde então, vários derivados da hidrocortisona vêm sendo pesquisados, visando aumentar sua ação anti-inflamatória e reduzir seus efeitos adversos (MARTINS; CHAUL, 2009). Os corticosteroides são o tratamento mais usado topicamente, e são considerados terapias de primeira linha para muitas dermatoses inflamatórias, incluindo dermatite atópica, dermatite de contato, psoríase e dermatite seborreica (HENGGE et al., 2006; GELBARD; HERBERT, 2009).

Dermatite atópica é uma doença inflamatória crônica recidivante da pele que afeta, aproximadamente, 17% das crianças e 1 a 3% dos adultos, muitas vezes atingindo áreas da pele de grandes dimensões. Corticosteroides tópicos são a especialidade mais importante de tratamento para a dermatite atópica. No entanto, a adesão à terapia com esses medicamentos é baixa, devido à preocupação com seus efeitos colaterais locais e sistêmicos (CATHCART; THEOS, 2011; HAECK et al., 2011).

Os corticosteroides tópicos constituem o grupo mais numeroso dos corticosteroides e são classificados conforme sua potência e seu provável efeito atrófico na pele (DE FRANÇA, 2009; SWEETMAN, 2009). Segundo a classificação proposta por Sweetman (2009), a desonida consiste em um corticosteroide tópico potente, porém muitos autores a descrevem como um medicamento tópico de baixa potência podendo ser usada no tratamento de dermatoses leves a moderadas (FREEMAN et al., 2002; WONG; FUCHS; LEBWOHL, 2004; KIRCIK; DEL ROSSO, 2007; HEBERT et al., 2008; KAHANNEK; GELBARD; HEBERT, 2008).

A segurança e a eficácia da desonida têm sido avaliadas. Estudo comparativo entre o tratamento com pomada de desonida a 0,05% e o tratamento com pomada de hidrocortisona a 1% em pacientes pediátricos portadores de insuficiência renal, com dermatite atópica leve a moderada, evidenciou que a desonida a 0,05% mostrou maior eficácia, produziu melhora em menor tempo, e demonstrou perfil de segurança cutânea equivalente à hidrocortisona a 1% (JORIZZO et al., 1995).

Em um programa de farmacovigilância global publicado sobre o fármaco, para formulações tópicas a 0,05%, foram descritos apenas 62 casos de ocorrência de eventos adversos, em um período de nove anos. Apesar de seu uso difundido (quase um milhão de unidades de formulações tópicas de desonida a 0,05% foram vendidos por ano só nos Estados Unidos) (WONG; FUCHS; LEBWOHL, 2004).

Além de ser comercializada nas formas de loção cremosa (0,5 mg/g), creme (0,5 mg/g) e pomada (0,5 mg/g), recentemente, visando aumentar a versatilidade e a adesão do paciente, foram desenvolvidas duas novas formulações: gel creme, na concentração de 0,5 mg/g e espuma, não comercializada no Brasil (KAHANEK; GELBARD; HEBERT, 2008).

### 3.1.2 Descrição

Quimicamente, a desonida (Figura 1B) é designada por (11 $\beta$ , 16 $\alpha$ )-11,21-Diidroxi-16,17-[(1-metiletilideno)bis(oxi)]pregna-1,4-dieno-3,20-diona, que possui os seguintes sinônimos: 16 $\alpha$ -hidroxiprednisolona-16 $\alpha$ ,17-acetonida e 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -isopropilidenodioxiprednisolona. Apresenta fórmula molecular C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>, peso molecular 416,51 e pKa igual a 12,87, a 25 °C.

Seu número de registro no Chemical Abstracts (CAS) é 638-94-8 e sua Denominação Comum Brasileira (DCB) é desonida. Apresenta-se como um pó inodoro constituído de pequenas partículas brancas ou quase brancas. O ponto de fusão da substância é de 274 - 275° (cristalização em metanol), sendo também relatado como 263 - 266°, a partir da cristalização em acetato de etila. O comprimento de onda de máxima absorção da desonida na região do ultravioleta ocorre em 242 nm (MERCK INDEX, 2006; SCIFINDER, 2012).



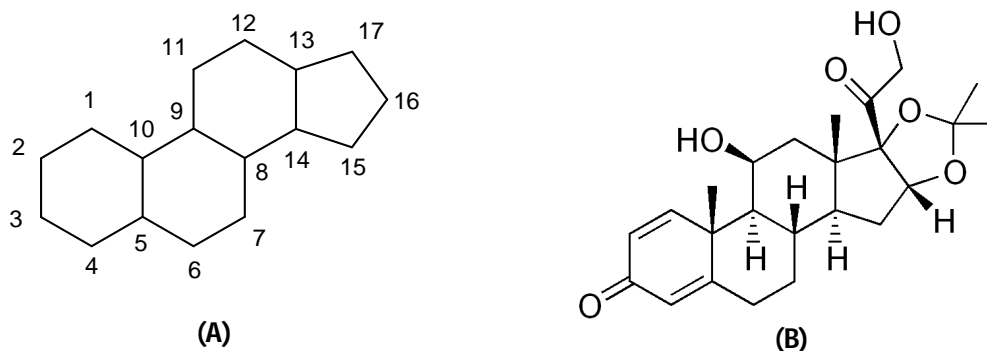


Figura 1 – (A) Estrutura química do ciclo básico dos corticoides (ciclopentanoperidrofenantreno) e (B) da desonida

### 3.1.3 Apresentação

No Brasil, a desonida é comercializada sob a forma de creme (0,5 mg/g), pomada dermatológica (0,5 mg/g), loção cremosa (0,5 mg/g) e gel creme (0,5 mg/g) para uso tópico, além de loção capilar (1,0 mg/g) (BRASIL, 2013).

A desonida destina-se exclusivamente para uso tópico, sendo que alguns fabricantes indicam a aplicação de uma fina camada sobre a área afetada caso a lesão seja superficial e de pouca extensão e, caso seja necessário, o paciente pode cobrir a área afetada com filme plástico, após a aplicação do medicamento (DESONIDA, 2006; ADINOS, 2009).

### 3.1.4 Mecanismo de ação

A eficácia clínica dos corticosteroides está relacionada a quatro propriedades básicas: a) anti-inflamatória: através da inibição da via do ácido araquidônico, com diminuição do componente vascular da resposta inflamatória e redução da formação de exsudatos celulares; b) vasoconstritora: relacionada com a inibição da liberação

de mediadores, como cininas e prostaglandinas; c) antiproliferativa: mediada pela inibição da síntese de DNA e mitoses; d) imunossupressora: pela inibição da resposta dos linfócitos B e T aos antígenos, inibição da quimiotaxia dos neutrófilos e redução do número de células de Langerhans (ROCHA; HORTA; SELORES, 2004; DEL ROSSO; FRIEDLANDER, 2005).

### 3.1.5 Farmacocinética

A extensão da absorção percutânea de corticosteroides tópicos é determinada por muitos fatores, incluindo o veículo da forma farmacêutica, a integridade da barreira epidérmica, a temperatura corpórea, a duração do tratamento e ainda, a natureza, a localização e a extensão da lesão onde o fármaco foi aplicado. O veículo das formulações que contêm corticosteroides tópicos pode contribuir com o efeito terapêutico, proporcionando uma ação emoliente ou secante, ou aumentando a sua absorção transcutânea, como é o caso dos veículos oleosos que proporcionam um efeito oclusivo, favorecendo a penetração do corticosteroide (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005).

Após serem absorvidos através da pele, os corticosteroides tópicos apresentam farmacocinética semelhante a dos corticosteroides administrados sistemicamente. Dessa forma, eles se ligam às proteínas plasmáticas em diferentes graus, são metabolizados no fígado e excretados pelos rins (DESONIDA, 2006, DE FRANÇA, 2009).

Os corticosteroides que contêm grupos 17-hidroxil substituídos, como a desonida, são resistentes ao metabolismo local na pele. Porém, nos locais onde a camada córnea é mais fina, a penetração do corticosteroide é maior e, dessa forma, é maior, também, o risco do surgimento de efeitos colaterais. Além disso, aplicações repetidas resultam em efeito cumulativo na pele, podendo prolongar o seu efeito, aumentar a incidência das reações adversas e a absorção sistêmica (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005; HENGGE et al., 2006).

### 3.1.6 Reações adversas

As reações indesejáveis dos corticosteroides tópicos estão diretamente relacionadas com a potência e a concentração do fármaco, o volume aplicado, o modo de aplicação (oclusivo ou não) e o tempo do tratamento (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005; HENGGE et al., 2006).

Os efeitos adversos mais frequentemente relacionados ao uso da desonida são atrofia cutânea, formação de estrias, telangiectasias, hipopigmentação, hipertricose e púrpura senil. Podem também agravar ou mascarar quadros infecto-parasitários e retardar a cicatrização de úlceras e ferimentos da pele. Ocasionalmente, podem provocar dermatites de contato, porém geralmente isto se deve aos componentes das formas farmacêuticas (DEL ROSSO; FRIEDLANDER, 2005; HENGGE et al., 2006; DE FRANÇA, 2009).

Os efeitos sistêmicos como Síndrome de Cushing, hiperglicemia, glicosúria e supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal são raros, mas podendo ocorrer devido à absorção em grandes quantidades de corticosteroides e/ou uso prolongado, geralmente, quando usados em curativos oclusivos ou em epiderme alterada. As crianças são mais suscetíveis a esses efeitos adversos, por possuírem uma relação superfície corporal/peso mais elevada em comparação aos adultos (COSTA; MACHADO; SELORES, 2005).

### 3.1.7 Determinação quantitativa

No que diz respeito à avaliação do fármaco, foram encontrados na literatura científica diversos métodos para a determinação da desonida em fluídos biológicos, geralmente baseados em técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (SPYRIDAKI et al., 2006; TOUBER et al., 2007; VONAPARTI et al., 2008; MAZZARINO; TURI; BOTRÈ, 2008; PETERS et al., 2010; TUDELA; MUÑOZ; MUÑOZ-GUERRA, 2012), visto que se trata de uma substância cujo uso pode ser restrito em alguns esportes (SWEETMAN, 2009).

Também foram relatados métodos para análise de traços de desonida em matrizes ambientais, como solo e água, uma vez que, por tratar-se de um hormônio,

pode exercer sua atividade biológica em organismos não-alvo e ser prejudicial para o ecossistema e também para a saúde humana, através do consumo de alimentos ou água contaminados (GINEYS; GIROUD; VULLIET, 2010; TOMSÍKOVÁ et al., 2012). Esses métodos também são baseados na cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas.

NGUYEN e colaboradores (1986) desenvolveram um método para análise de desonida em creme e pomada, com extração em fase sólida e posterior análise por CLAE. Porém, além de ser executado em várias etapas, esse método requer a utilização de solventes tóxicos, como hexano e clorofórmio.

Recentemente foi publicado um estudo para determinação da desonida em creme, por CLAE, empregando fase móvel composta por tampão fosfato (pH 4,5) e acetonitrila (30:70), coluna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm), fluxo de 1,5 mL/min e detecção em 254 nm. Através desse método foi possível quantificar a desonida e os conservantes da formulação (LOPES et al., 2012).

Entretanto, não foram relatados métodos para determinação do fármaco nas demais formulações farmacêuticas, nem mesmo publicações a respeito de sua fotoestabilidade, o que reforça a importância deste estudo.

### **3.2 Estudos de estabilidade**

As razões pelas quais se torna necessário estudar a estabilidade de fármacos e medicamentos estão baseadas em aspectos sanitários, garantindo que o medicamento seja seguro e efetivamente contenha a quantidade de substância ativa necessária para o efeito terapêutico; legais, que exigem que todos os medicamentos cumpram com suas condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança até o momento de seu uso; e aspectos econômicos, que envolvem tanto o paciente como o fabricante (NUDELMAN, 1975).

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica ou a matéria-prima mantém, dentro dos limites especificados, e durante todo o período de armazenamento e uso, as mesmas

características que possuía quando foi produzida. Ou seja, é o período de tempo durante o qual a eficácia, a segurança e a estética do produto podem ser asseguradas (VADAS, 2000; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Os fatores que podem alterar a estabilidade de um medicamento podem ser intrínsecos, quando relacionados ao próprio produto, tais como: a estabilidade das substâncias ativas, a interação excipiente-fármaco, os processos de produção, a forma farmacêutica, a embalagem e o sistema de lacre; ou extrínsecos, quando dependem de fatores externos à formulação, tais como: as condições durante o transporte e o armazenamento até a utilização do produto, e fatores ambientais que incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio, pressão, contaminação microbiana, entre outros (YOSHIOKA; STELLA, 2002; BRASIL, 2005).

O guia da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) determina a realização dos seguintes estudos para substâncias ativas e medicamentos, a fim de determinar o prazo de validade de fármacos e formas farmacêuticas (ICH, 2003):

✓ *Estabilidade de longa duração*: as amostras devem ser mantidas nas condições previstas de estocagem (temperatura e umidade), pelo tempo proposto como prazo de validade do produto. Visam estabelecer o período de reteste ou o prazo de validade do produto ou do fármaco. Os medicamentos devem estar contidos na embalagem prevista para dispensação.

✓ *Estabilidade acelerada*: são empregadas temperaturas mais elevadas em relação ao estudo de longa duração e a mesma umidade, com o objetivo de aumentar a velocidade de degradação química ou mudanças físicas de fármacos e medicamentos. Visam prever o efeito de pequenos desvios nas condições ideais de armazenamento, que poderão ocorrer durante o transporte. Os medicamentos devem estar acondicionados na embalagem prevista para dispensação.

✓ *Testes de degradação forçada*: usados para estabelecer a estabilidade intrínseca do fármaco. São realizados em condições mais severas do que as usadas no estudo de estabilidade acelerada. Podem indicar os prováveis produtos de degradação, bem como validar o uso de um método analítico para análise de

amostras degradadas. Consistem em submeter o produto a condições drásticas de temperatura, umidade, oxidação e ampla faixa de pH.

### **3.3 Estudos de fotoestabilidade**

O teste de fotoestabilidade de fármacos e suas respectivas formas farmacêuticas é importante para garantir a qualidade durante toda a validade do produto. Os protocolos básicos para novos fármacos e respectivos produtos são descritos nas diretrizes da ICH para testes de fotoestabilidade, divulgados em novembro de 1996 (ICH, 1996). A avaliação da fotoestabilidade está incluída nos estudos de degradação forçada (ICH, 2003) e consiste em duas etapas: testes de degradação forçada e testes confirmatórios (ICH, 1996).

O teste de degradação forçada envolve o fármaco isolado ou em suspensão/solução, disposto em recipientes transparentes e quimicamente inertes (ICH, 1996). Soluções do fármaco são mais suscetíveis e particularmente relevantes na compreensão do comportamento do produto em solução. Podem ser usadas várias condições de exposição, que dependerão da fotossensibilidade da substância e da intensidade das fontes de radiação empregadas (TØNNESEN, 2004a). Se nos estudos de degradação forçada não forem observados produtos de degradação, não são necessários estudos confirmatórios (ICH, 1996).

Os estudos confirmatórios são normalmente realizados de modo sequencial, iniciando-se a avaliação através da exposição à radiação do produto sem a proteção das embalagens, seguida pela exposição do produto protegido pela embalagem primária e, por fim a exposição à radiação do produto protegido pela embalagem secundária. O teste deve ser conduzido até que os resultados demonstrem que o produto esteja adequadamente protegido da luz, isto é, que não apresente degradação da substância ativa (TØNNESEN, 2004a; ICH, 1996).

Nos últimos anos, a fotodegradação de produtos farmacêuticos vem se desenvolvendo como importante área de interesse de pesquisa. Isso se deve ao crescente aumento do número de fármacos fotolábeis reportados e às exigências

dos estudos de estabilidade, pelos órgãos regulatórios, para o registro e comercialização de medicamentos (TØNNESEN, 2004a).

As radiações catalisam a ruptura de ligações, oxidações, isomerizações, polimerizações, reordenamentos e racemizações. Compostos contendo grupos cromóforos tais como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações são mais sensíveis à fotólise. A fotossensibilidade será tanto maior, quanto maior for o número destes grupos cromóforos na molécula e, especialmente, se estiverem conjugados, permitindo a interação dos elétrons livres de cada grupo (NUDELMAN, 1975). Fármacos fotossensíveis podem ser afetados, tanto pela luz natural (solar – especialmente radiação ultravioleta) quanto por fontes de luz artificiais (TØNNESEN, 2001).

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de várias condições, tais como: concentração dos reagentes, temperatura, pH, solvente utilizado, presença de tensoativos na formulação, umidade, excipientes, luz e oxigênio. Consequentemente, para que o estudo seja efetivo, deve-se aplicar princípios de cinética química (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

No âmbito farmacêutico, o estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo da estabilidade de medicamentos e na caracterização dos mecanismos envolvidos na degradação dos mesmos. Estes estudos têm como objetivos: obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação, estabelecer hipóteses sobre os fatores determinantes da velocidade de uma reação, e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações. O conhecimento destes aspectos permite detectar incompatibilidades decorrentes da mistura dos produtos, bem como evitar o efeito tóxico associado a produtos de degradação (NETZ; ORTEGA, 2002).

A cinética química classifica as reações em reações de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem ou mesmo ordens cinéticas mais complexas. A ordem da reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da

reação química, verificando-se a concentração de amostras retiradas no decorrer do tempo (NETZ; ORTEGA, 2002; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Nas reações de ordem zero, a decomposição ocorre a uma velocidade constante, sendo independente da concentração de quaisquer reagentes. Nesse caso, um gráfico de concentração ( $c$ ) em função do tempo ( $t$ ) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação ( $k$ ) de degradação do fármaco (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

As reações de primeira ordem indicam que as velocidades de reação dependem da concentração de um dos reagentes, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ( $\log C$ ) em função do tempo ( $t$ ). Neste tipo de reação, uma substância decompõe-se em um ou mais produtos. A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou da segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ( $1/C$ ) em função do tempo ( $t$ ) fornece uma reta (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001).

Quando a ordem de reação é desconhecida, é possível deduzi-la pela análise dos gráficos plotados para cada ordem. A representação gráfica que resultar em uma linha reta com uma correlação linear mais próxima da unidade indica qual a ordem de reação. Este método possui algumas limitações, principalmente em relação ao tempo de exposição da amostra ao fator de degradação, pois quando os graus de decomposição são muito baixos, é difícil diferenciar as ordens de reação, uma vez que todas parecem ser lineares (NETZ; ORTEGA, 2002).



# **CAPÍTULO 1: MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE DESONIDA**

As análises apresentadas nesse capítulo visaram identificar a matéria-prima a ser utilizada como substância química de referência (SQR), bem como, fornecer dados indisponíveis na literatura até o momento.

## **1.1 Dados da matéria-prima**

A matéria-prima utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi obtida da empresa *Proactive Molecular Research* (EUA), com teor declarado de 98,55%. Para sua identificação foram realizados ensaios de solubilidade, ponto de fusão, espectrofotometria na região do ultravioleta e infravermelho.

## **1.2 Solubilidade**

O ensaio de solubilidade foi realizado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (2010). Os solventes utilizados foram: água, metanol, hidróxido de sódio 0,1N e ácido clorídrico 0,1N.

A solubilidade aproximada é designada por termos descritivos cujos significados estão relacionados no Quadro 1 (FB 5, 2010), sendo que, nesse caso, a expressão “partes” refere-se à dissolução de 1 g de fármaco no número de mililitros dos solventes estabelecidos no número de partes. Os volumes foram ajustados para massa de amostra de cerca de 10 mg.

<b>Solvente</b>	<b>Termo descritivo</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

Quadro 1 – Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

### **1.3 Determinação do ponto de fusão**

A determinação do ponto de fusão da desonida matéria-prima foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola da UFSM.

#### **1.3.1 Material**

A matéria-prima foi previamente dessecada a 105 °C, por 2 horas. O equipamento de ponto de fusão digital GEHAKA, modelo PF 1500, foi utilizado na determinação.

#### **1.3.2 Método**

No equipamento, as amostras (matéria-prima) foram introduzidas em tubos capilares e depositados nas células de aquecimento, cujo ponto de fusão é determinado automaticamente no momento em que as amostras, iluminadas por fonte de luz, coalescem e fundem por completo, dando origem a um fluido transparente, que permite a passagem de luz através do tubo capilar. Para a

calibração foi utilizado o ácido benzoico (com ponto de fusão 122,4 °C). Foram realizadas três determinações para a desonida matéria-prima.

#### **1.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)**

##### 1.4.1 Material

A matéria-prima de desonida foi dissolvida em metanol de grau analítico (TEDIA). O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca SHIMADZU, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

##### 1.4.2 Método

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 25 mg de desonida, e posteriormente transferida para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume final completado com metanol. Dessa solução, foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com metanol, obtendo-se assim uma solução com concentração final de 50 µg/mL.

O espectro foi obtido a partir de leituras na faixa de comprimento entre 210 e 340 nm, utilizando metanol como branco.

#### **1.5 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)**

A análise foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), na cidade de Santa Maria, RS.

### 1.5.1 Material

O espectro na região do infravermelho da desonida matéria-prima foi obtido utilizando-se espectrofotômetro FTIR, marca PERKIN ELMER, modelo *Spectrum One*. A pastilha destinada à análise foi preparada pela dispersão da matéria-prima previamente dessecada em brometo de potássio, seguida de compressão

### 1.5.2 Método

Em geral foram misturados 1,5 mg de desonida matéria-prima e 150 mg de brometo de potássio (KBr), previamente dessecado a 105 °C, por duas horas. Em seguida, a mistura foi transferida para pastilhador e a pastilha obtida foi destinada à análise espectrofotométrica.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Solubilidade

A solubilidade foi testada conforme descrito no item 1.2. A desonida apresentou-se solúvel em metanol e praticamente insolúvel nos demais solventes testados (água, NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N), ou seja, de acordo com a Tabela 1, os 10 mg de desonida analisados mostraram ser solúveis em volumes de 0,3 a 1,0 mL de metanol e insolúveis em mais de 100 mL de água, hidróxido de sódio 0,1N e ácido clorídrico 0,1N.

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), a solubilidade da substância não deve ser tomada como constante física, porém trata-se de uma informação capaz de auxiliar nos demais ensaios, podendo ter um valor definitivo se a substância não apresentar a solubilidade mínima exigida, principalmente no solvente água.

No caso da desonida, o ensaio de solubilidade foi útil no sentido de auxiliar nos ensaios subsequentes, determinando o solvente a ser usado para o preparo das soluções analíticas.

## 2.2 Ponto de fusão

O teste físico-químico de determinação do ponto de fusão auxilia na identificação dos fármacos, uma vez que a presença de pequenas quantidades de impurezas provoca uma redução do seu ponto de fusão. Entretanto, não possibilita a conclusão definitiva da sua identidade (FB 5, 2010).

O ponto de fusão da matéria-prima de desonida foi determinado conforme descrito na seção 1.3. Os valores obtidos nas três determinações realizadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores obtidos para o ponto de fusão da desonida

<b>Determinação</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Resultado</b>	250,80	251,90	250,80
		<b>Média</b>	251,2
		<b>DPR</b>	0,25

O valor médio apresentado foi de 251,2 °C. Na literatura (MERCK INDEX, 2006; SCIFINDER, 2012a) são relatados os seguintes valores: 263-266 °C para substâncias purificadas a partir de acetato de etila e 274-275 °C a partir de metanol.

Dessa forma, o resultado obtido sugere a presença de impurezas na matéria-prima analisada ou sua obtenção a partir de rota de síntese diferente das já descritas, ainda, pode-se sugerir que exista diferentes formas polimórficas para a desonida, porém não há relatos na literatura acerca deste assunto.

Sendo assim, não foi possível uma correta identificação da matéria-prima de desonida através do ponto de fusão.

### 2.3 Espectrofotometria na região do UV

O espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de desonida, na concentração de 50 µg/mL, está representado na Figura 1. Empregou-se metanol para diluição da amostra, devido à maior solubilidade apresentada pela desonida neste solvente.

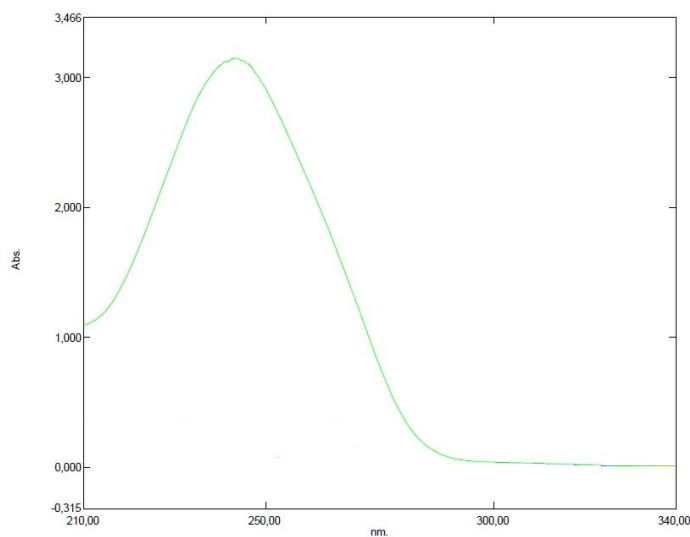


Figura 1 - Espectro de absorção na região do UV de solução de desonida preparada em metanol, na concentração de 50 µg/mL.

A espectrofotometria na região do UV é aplicada na identificação e quantificação de fármacos, apesar de apresentar algumas limitações, pois a absorção depende da existência de grupamentos cromóforos na estrutura do composto a ser analisado, o que compromete, também, sua especificidade (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; WATSON, 2005).

Os grupamentos cromóforos da maioria dos fármacos baseiam-se em modificações do anel benzeno. Porém, uma grande classe de fármacos que não se enquadra nesta categoria é a dos corticosteroides. Por exemplo, os espectros da hidrocortisona e da betametasona (Figura 2) são comuns a muitos esteroides e todos têm intensidade máxima de absorvância em torno de 240 nm, ou seja, a ligação dupla adicional presente na molécula da betametasona, em comparação a da hidrocortisona, não contribui para a diferenciação das duas substâncias por essa técnica. Tais diferenças, ou, no caso dessa classe de fármacos, as semelhanças, nos espectros podem ser utilizadas em testes qualitativos de identidade, os quais devem ser utilizados em conjunto com métodos mais específicos, como a CLAE (WATSON, 2005).

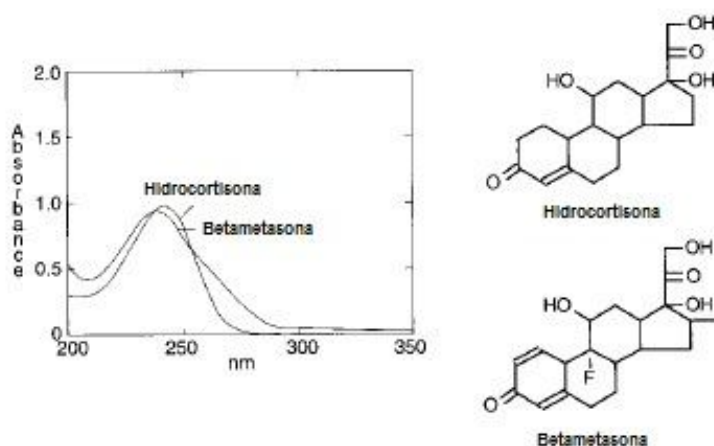


Figura 2 – Espectros de absorção na região do UV referentes aos corticosteroides hidrocortisona e betametasona (WATSON, 2005).

O perfil do espectro de absorção apresentado na Figura 1 apresenta absorção máxima em comprimento de onda de 244 nm, mostrando-se de acordo com o descrito pela literatura (MERCK INDEX, 2006; SCIFINDER, 2012a), além de estar de acordo com o descrito para a classe dos corticosteroides (WATSON, 2005).

Desta forma, o método apresentou-se adequado para identificação da desonida, porém, cabe salientar que métodos adicionais devem complementar a espectrofotometria de absorção no UV para a identificação dessa substância.

## **2.4 Espectrofotometria na região do IV**

A análise espectrofotométrica na região do IV é um dos métodos mais empregados para identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção apenas dos isômeros ópticos. Assim, o espectro de IV pode ser utilizado como uma “impressão digital” das moléculas e, portanto, pode ser considerado como conclusivo na identificação de uma substância (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA et al., 2008; FB 5, 2010).

O espectro na região do IV da desonida está ilustrado na Figura 3. Através da análise das bandas características dos grupamentos químicos determinados no espectro de IV é possível determinar características estruturais da molécula. No entanto, a identificação de uma substância torna-se mais simples quando é possível a comparação do espectro da amostra em análise com o da substância de referência, pois uma simples molécula pode originar um espectro mais complexo (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Para fins de comparação, é apresentado espectro encontrado na literatura (Figura 4, SCIFINDER, 2012b).



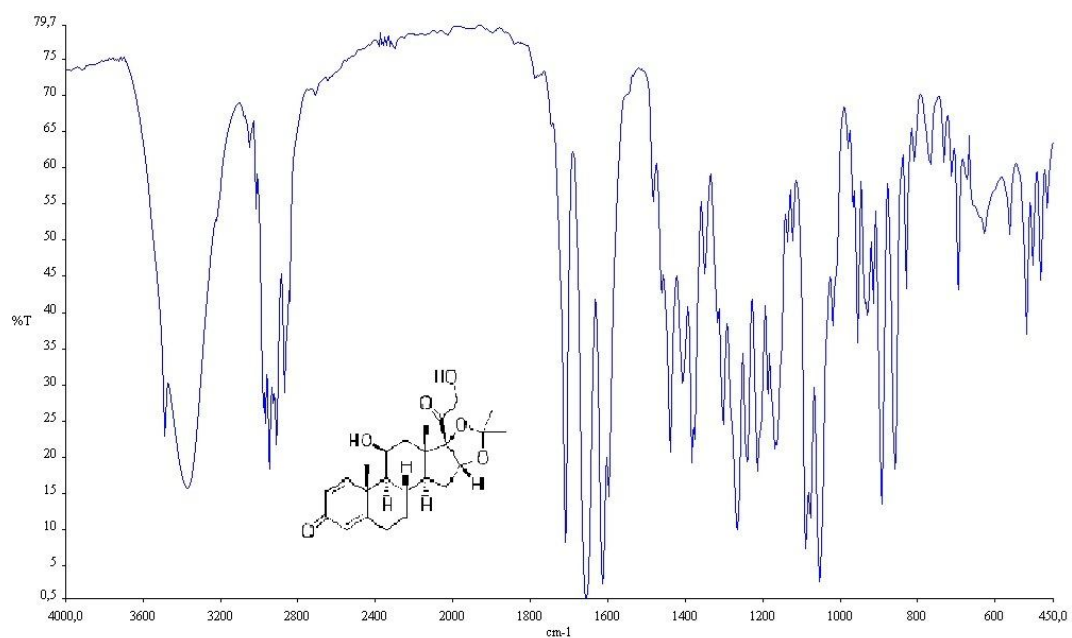


Figura 3 – Espectro na região do IV da matéria-prima de desonida.

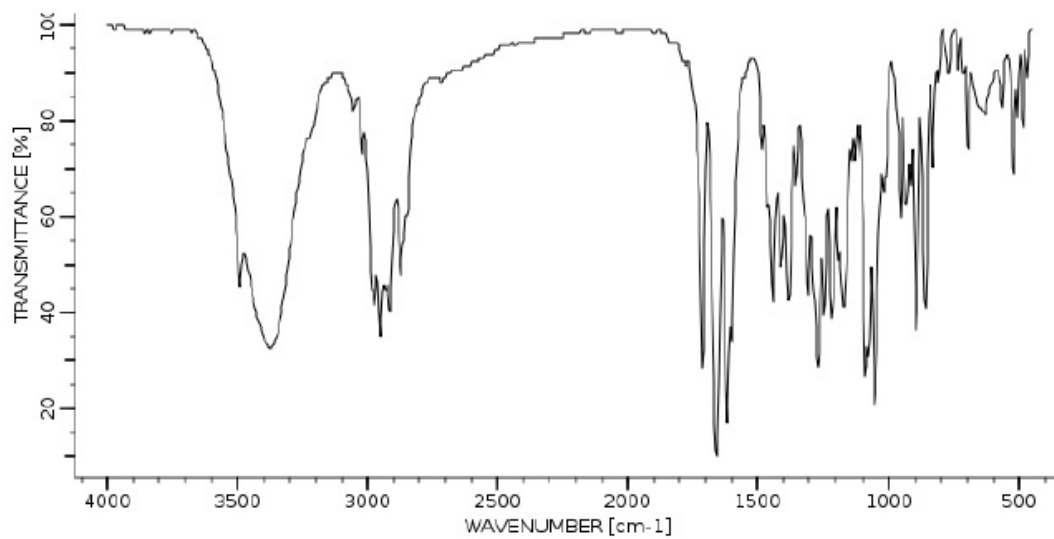


Figura 4 – Espectro na região do IV da desonida (SCIFINDER, 2012b).

A comparação entre os espectros apresentados confirma que trata-se da mesma substância. As maiores intensidades observadas no espectro experimental podem ser devido à diferenças de concentração no preparo da pastilha, no entanto, o formato, a frequência de absorção e as intensidades relativas das bandas confirmam a identidade da amostra em estudo.

As bandas de absorção características do fármaco, e as possíveis atribuições, com base na literatura consultada, encontram-se no Quadro 2.

<b>Frequencia de absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>
3370	Deformação axial de OH alcoólica
2950	Deformação axial de CH de metila
1709	Estiramento de C=O de cetona alifática
1680	Estiramento de C=O de cetona aromática
1639	Deformação axial das ligações C=C trissubstituídas
1598	Deformação axial das ligações C=C dissustituídas
1090	Deformação axial de C-O

Quadro 2 – Atribuição das principais bandas do espectro de IV da matéria-prima de desonida. Fontes: SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; PAVIA *et al.*, 2008; WATSON, 2005.

Através da análise por espectrofotometria na região do IV foi possível identificar a substância química utilizada como referência nesse trabalho, tornando essa técnica uma ferramenta indispensável para sua identificação.

### **3 CONCLUSÃO**

O conjunto de resultados obtidos pelas técnicas usadas permitiu avaliar a qualidade da matéria-prima em estudo, que passará a ser denominada SQR. Sendo que a técnica essencial na identificação da matéria-prima de desonida foi a espectrofotometria no infravermelho.

## REFERÊNCIAS

FB 5. **Farmacopéia Brasileira, 5ª edição.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Vol. 1, 2010.

MERCK INDEX, Merck & Company, Inc., 14ª Edition, White House Station, New York, 2006.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy.** 4 ed. South Melbourne: Brookscole, 2008.

SCIFINDER SCHOLAR. American Chemical Society (ACS) (2012a). “*Drugs – Synonyms and Properties*” data were obtained from *Ashgate Publishing Co.* (USA).

SCIFINDER SCHOLAR. American Chemical Society (ACS) (2012b). BIORAD: Infrared spectral data from the *Bio-Rad/Sadtler IR Data Collection* was obtained from *Bio-Rad Laboratories*, Philadelphia, PA (USA).

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectrometria no infravermelho. In: \_\_\_\_\_. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

## **CAPÍTULO 2**

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA: Assay and photodegradation kinetics of desonide lotion by an LC-UV stability-indicating method. Artigo submetido ao periódico **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**.

**Assay and Photodegradation Kinetics of Desonide Lotion  
by an LC-UV Stability-Indicating Method**

**Muriele P. Braga<sup>1</sup>, Tássia C. S. Dalcin<sup>2</sup>, Priscila Rosa<sup>1</sup>, Cristiane F. Codevilla<sup>3</sup>, Cristiane B. da Silva<sup>2</sup>,  
Clarice M. B. Rolim<sup>2</sup>, Andréa I. H. Adams<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Address correspondence to Prof. Dr. Andréa I. H. Adams. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Phone: +55 55 3220 8661. Fax: +55 55 3220 8248. E-mail: andrea.i.h.adams@gmail.com

**Key-words:** desonide, desonide photostability, desonide stability, desonide assay, desonide lotion, LC-method

**Running header:** Assay and photodegradation kinetics of desonide lotion

**Abstract:** This work describes the development and validation of an LC stability-indicating method for the quantitation of desonide lotion, followed by a photostability study of the same pharmaceutical form under exposure to UVA light (352nm). The method used a RP-18 column, mobile phase composed of a methanol:acetonitrile:water pH 5.0 mixture (50:10:40) and detection at 244 nm. The method validation followed the ICH guidelines, and its robustness was evaluated by a factorial design (2<sup>4</sup>). All the validation requirements were met, evidenced by good linearity ( $r > 0.9999$ , in the range from 10 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ), accuracy (mean recovery 100.09%), precision (intraday RSD 1.4 and 1.75%; interday RSD 1.59%), robustness and specificity. The last one was indicated by high peak purity index in all the stress conditions adopted and by good resolution

between the analite peak from adjacent peaks ( $R>2.0$ ). These data confirm the procedure suitability to routine analysis and stability studies. About the photodegradation of desonide lotion, it can be described by second-order kinetics with a  $t_{90\%}$  value of 1.58h under the experimental conditions employed in this study. The low photostability of the product evaluated justifies the need for further studies aimed at improving the formulation in order to ensure safety and therapeutic efficacy.

## INTRODUCTION

Corticosteroids remain as the most widely used topical treatment for inflammatory conditions and are considered first-line therapies for many inflammatory dermatoses including atopic dermatitis, contact dermatitis, psoriasis, and seborrheic dermatitis.<sup>[1,2]</sup> Desonide (Figure 1) is a non-fluorinated corticosteroid with glucocorticoid activity. It has been marketed in the United States since the early 70s<sup>[3]</sup> and it is the most commonly low-potency topical steroid prescribed in the USA for the treatment of atopic dermatitis.<sup>[2]</sup> Because of its low-potency, desonide can be used in the treatment of children and babies.<sup>[2]</sup> Its safety has been reported in short-term treatments in children as young as 3 months old.<sup>[3]</sup> Moreover, a global study has indicated few adverse events related to desonide treatment despite its widespread use.<sup>[4]</sup>

Many pharmaceutical forms of desonide are available such as ointment, cream, lotion, gel-cream, foam (all of them at 0.05%), and hair solution (0.1%). Although marketed for nearly four decades, there are no pharmacopoeial methods to control the desonide content in the topical formulations currently used. Moreover, there are few methods aiming to assay desonide in biological fluids reported in literature<sup>[5-7]</sup> or to quantify the drug in pharmaceutical products.<sup>[8]</sup>

The photoinstability of desonide in organic solvents (acetonitrile and isopropanol, under exposure to UVB and UVC radiation) has been reported and the degradation products observed are related to modifications in side chain and in the ring A from the steroidal skeleton.<sup>[9]</sup> Previous results obtained by our research group showed that another desonide pharmaceutical product (hair solution) undergoes fast degradation when exposed to UVA radiation.<sup>[10]</sup> Moreover, it should be emphasized that there is no recommendation in the package insert about special protection from light during use. Preliminary tests with desonide lotion targeted in this research indicated a similar result.

Photostability tests applied to drug substances aim at assessing the overall photosensitivity of a given material and are useful in the development of new products for validation purposes and in providing information necessary for handling, packaging and labeling. For pharmaceutical products, photostability tests should provide information related to the practical use of the product, such as light conditions that the product will be exposed to, according to its posology.<sup>[11]</sup>

Therefore, the aim of the present research was the development and validation of a simple and selective stability-indicating LC-UV method to assay desonide in lotion and to perform an UVA-photostability study of this pharmaceutical product, contributing to improve the quality control and therapeutic efficacy of desonide therapies.

## **EXPERIMENTAL**

### **2.1 Chemicals and reagents**

Desonide reference substance (98.55% purity) was obtained from Proactive Molecular Research (USA). Desonide lotion 0.05% (batch 11090471, Medley, Brazil) was purchased from commercial sources. Analytical grade hydrochloric acid, sodium hydroxide and phosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and 30% hydrogen peroxide from Synth (Brazil). Ultrapure water was used to prepare the mobile phase and reagents (Millipore MilliQ® A 10 water system - Billerica, USA). The other reagents, such as methanol and acetonitrile (LC grade) were purchased from Tedia (Ohio, USA).

### **2.2 Chromatographic conditions**

Quantitative analyses were performed in a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan), provided with a LC-20AT pump, SPD-M20A photodiode array detector (PDA), CBM-20A controller, Rheodyne valve (20 µL loop) and DGU-20A5 degasser. The chromatographic separation was achieved in a Phenomenex Luna® RP-18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm, 100 Å). The mobile phase consisted of methanol, acetonitrile and water, pH 5.0, adjusted with 18% phosphoric acid (*v/v*) prior to mixture (50:10:40 *v/v/v*), at a flow rate of 1.20 mL/min. It was prepared daily, filtered through a 0.45 µm Nylon membrane filter (Millipore) and degassed by sonication and vacuum before use. Quantitative measurements were based on responses by peak area integration processed by Shimadzu Class VP software, with detection performed at 244 nm.



### 2.3 Statistical software

The experimental design and statistical analysis of the robustness test were performed by data analysis Minitab® v.15 software (Minitab Inc., State College, PA, USA). General data was evaluated by ANOVA at significance level of 5 %.

### 2.4 Preparation of reference substance and sample solutions

The stock desonide solution was prepared by accurately weighing 20 mg of desonide reference substance, diluted with methanol, in order to obtain 0.5 mg/mL solution. The stock solution was stored at 2-8 °C, and diluted to appropriate diluent concentrations.

To prepare sample solution, a portion of desonide lotion (3 g, equivalent to 1.5 mg of drug) was accurately weighed in 50 mL flask. Thirty milliliters of methanol were added, and the mixture was heated at 40 °C, for 7 minutes. Subsequently, it was transferred to a 50 mL volumetric flask, and the volume was filled up with methanol, obtaining a theoretical desonide concentration of 30 µg/mL. This solution was filtered through a 0.45 µm Nylon membrane filter (Millipore) prior to analysis.

### 2.5 Validation of the LC-method

The method was validated using samples of the pharmaceutical form of desonide lotion, according to guidelines of ICH. <sup>[12,13]</sup>

#### 2.5.1 Specificity

The method specificity was evaluated by analysis of placebo solution and by stress testing. All the following excipients, reported in the package insert, were mixed in quantities currently used in this type of formulation <sup>[14]</sup>: cetostearyl alcohol, diethylene glycol monostearate, sorbitan stearate, petrolatum, propylene glycol, sodium lauryl sulfate, methylparaben, propylparaben, sodium edetate, citric acid and water. Then, placebo was submitted to the same procedure as that used in sample preparation (section 2.4).

The specificity of the method was also established by quantitation and purity of the desonide peak after stress testing in alkaline, acidic and oxidative media, high temperature and exposure to UVA radiation. Peak purity index above 0.9999 was considered acceptable. <sup>[15]</sup> In all conditions, samples solutions containing around 0.05 mg/mL were prepared by accurately weighing 3 g of desonide lotion (equivalent to 1.5 mg of drug), followed by

the addition of 30 mL of methanol, heating at 40 °C for 7 minutes and by the degradation treatment. Specific conditions are described below (n=3/condition).

#### 2.5.1.1 Acidic and Basic Hydrolysis

Ten milliliters of hydrochloric acid (HCl) 0.1 M or 10 mL of sodium hydroxide (NaOH) 0.1 M were added to the sample solution, for acidic hydrolysis or basic hydrolysis, respectively. Solutions were maintained at room temperature for 3 hours and neutralized with base or acid. The entire content was transferred to a 50 mL volumetric flask and the volume was filled up with methanol and filtered, resulting in a final theoretical concentration of 30 µg/mL.

#### 2.5.1.2 Oxidative condition

Ten milliliters of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 % were added to the sample solution and stored protected from light at room temperature for 24 hours. Later, the entire content was diluted with methanol to achieve a final concentration of 30 µg/mL.

#### 2.5.1.3 Thermal stress

Sample solution at 30 µg/mL was placed in a sealed glass bottle and placed in a dry oven at 70 °C for 24 h. After this period, aliquots of the solutions were analyzed by the LC-UV method.

#### 2.5.1.4 Photodegradation

One milliliter of sample solution (30 µg/mL) was submitted to UVA radiation (352 nm) for 3 hours in a covered transparent container in a light chamber. Containers with sample solution wrapped with kraft paper were also placed in the chamber in order to verify any interference due to temperature rise inside the chamber. Immediately after the exposure, solutions were analyzed.

#### 2.5.2 Linearity

Responses from three independent analytical curves of desonide reference substance in five concentration levels in the range from 10 to 100 µg/mL (10, 20, 50, 75 and 100 µg/mL) were obtained. Linearity was studied by linear regression, which was evaluated by the least-squares method.

### 2.5.3 Precision

Precision was determined by repeatability and intermediate precision, through the preparation of sample solutions with nominal concentration of 30 µg/mL (described in section 2.4) and was expressed as relative standard deviation (RSD).

The repeatability was determined by the assessment of six independent sample solutions in the same concentration and conditions (day, analyst and experimental conditions - intraday). Intermediate precision was verified by analyzing six sample solutions prepared independently, with the same nominal concentration, but changing analyst and day.

### 2.5.4 Accuracy

Accuracy was determined by the addition of desonide reference solution to placebo, prepared as described at Section 2.5.1. To placebo lotion (3 g) were added 0.75, 1.5 or 2.25 mL of desonide reference solution (1.0 mg/mL); after, the same extraction procedure applied to samples was performed the solutions obtained were diluted with methanol in order to obtain 15, 30 and 45 µg/mL, which correspond to 50, 100 and 150 % of nominal analytical concentration. This procedure was realized in triplicate. <sup>[12]</sup>

### 2.5.5 Robustness

Robustness was assessed by variations in the analytical conditions and by evaluating the stability of solutions. Multivariate experimental design is recommended in robustness tests.<sup>[16]</sup> Thus, in order to study the simultaneous variation of factors considered in the analytical responses, a full factorial design was used to evaluate the effects of four factors in two levels ( $2^4$ ), in duplicate, totaling 32 experiments. The following variables were tested: pH of the mobile phase, eluent flow rate, column manufacturer and acetonitrile content in the mobile phase. Table 1 shows the lower and upper levels adopted for each factor. For each condition, analytical responses such as drug assay and chromatographic parameters (tailing factor, retention factor and theoretical plates) were assessed. The normal distribution graph was used to identify significant effects ( $p < 0.05$ ).

To demonstrate the stability of desonide solutions, the stock desonide reference substance solution was kept at temperature of 2 to 8 °C for 96 hours; after this period, the solution was diluted to 30 µg/mL and analyzed. Also, sample solutions at 30 µg/mL (work solutions) were maintained at room temperature (21 °C) for 12 h in order to demonstrate their stability over a day of analysis. As responses, the desonide content in these solutions was

compared to the content of the respective solutions at time zero, and changes in the chromatographic pattern were checked.

## **2.6 System Suitability**

The system suitability was determined according to the United States Food and Drug Administration (US-FDA)<sup>[17]</sup> to confirm that the equipment was suitable for the analysis to be performed. To measure it, chromatographic parameters and the RSD value obtained from the injection of six replicates of the reference solution at 30 µg/mL were determined.

## **2.7 Photostability study of the desonide lotion**

The photostability study was carried out by adding a thin layer accurately weighted (around 3 g) of the desonide lotion, on open petri dishes (60 x 15 mm), followed of exposure to UVA radiation (352 nm) in the light chamber. Concurrently, placebo and samples protected from light (control) were exposed in order to evaluate the interference of the heat inside the chamber, as recommended by the ICH guideline.<sup>[18]</sup>

Throughout a 24-hour period, the entire content of the petri dishes was removed at different time intervals (1, 2, 6, 10, 15 and 24 h), and solutions were prepared as described in section “sample preparation” (n=3/condition), to achieve a solution with concentration of 30 µg/mL. The remaining desonide content was determined by comparison with the desonide content recovered from control samples.

Quantification was performed using the previously validated LC-method and the kinetics of the degradation model was determined using the correlation between the variables concentration and time. Linear correlation coefficients (*r*) for each kinetic order were obtained, observing that coefficient closer to unity indicates the reaction order.<sup>[19]</sup> The degradation rate constant (*k*), and *t*<sub>90</sub> parameters (time to decrease the drug content to 90 %) were also calculated.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1 Optimization of the method**

Several mobile phases based on acetonitrile, methanol and water were assessed. Suitable chromatographic parameters were obtained, as well as a mobile phase composed of methanol, acetonitrile and water, pH 5.0

(50:10:40 v/v/v). The addition of acid to the mobile phase suppresses the ionization of acid functional groups and promotes greater interaction between the analyte and the stationary phase.<sup>[20]</sup> Thus, at pH 5.0, desonide remains in its unionized form, considering the pKa value (12.9<sup>[21]</sup>) and the acid groups of its molecular structure. The use of acetonitrile resulted in tailing factor values near 1.0. On the other hand, the use of methanol improved the resolution between peaks of desonide and excipients. The wavelength was experimentally defined after spectral scanning of the ultraviolet zone (190-380 nm). Desonide detection was performed at 244 nm, which is the wavelength of maximum desonide absorption, where no interference from components of the formulation or mobile phase was observed. To provide separation, a column commonly use in analytical laboratories was employed.

These conditions were used to validate the LC-method applied to assess the desonide content in the lotion. A typical chromatogram obtained by this method is shown in Figure 2. Good resolution between peaks of desonide and excipients was obtained, being the retention time of desonide peak around 7.3 minutes, with good symmetry. Peaks of excipients were identified by individual analysis of each placebo component (Figure 2c).

### **3.2 Validation of the analytical method**

#### *3.2.1 Specificity*

Initially, the method specificity was evaluated by examining the chromatograms of placebo solution and desonide sample solution at concentration of 30 µg/mL. The chromatogram shown in Figure 2c indicates that excipients do not interfere with the desonide detection. In addition, peak purity analysis made by DAD detector confirmed no interference from the formulation excipients, since desonide peak was free from any co-elution, demonstrating that the method developed is specific for the analysis of desonide in this pharmaceutical product.<sup>[22]</sup>

The efficacy and safety of pharmaceuticals cannot be ensured unless their quality is maintained during their shelf lives.<sup>[19]</sup> The susceptibility of a compound under different conditions can be investigated by the stress testing, which is an important tool used to predict stability-related problems, providing information about the intrinsic stability of a drug substance.<sup>[13]</sup> Moreover, stress testing is used during analytical development in order to confirm the ability of the method to quantify the analyte in complex mixtures, such as excipients and degradation products.

To confirm the stability-indicating capacity of the method, stress testing was carried out under different stress conditions.<sup>[12,13]</sup> Table 2 shows the remaining desonide content after forced degradation study and Figure 3 shows the resulting chromatograms for each condition adopted. Despite the decrease observed in the residual desonide content, no relevant extra peaks were observed in the chromatograms. Degradation occurred in the most of stress conditions performed, being desonide more affected by basic medium and radiation. Moreover, through the results obtained, it is possible to deduce the stability of the sample solution to heating. The desonide peak proved to be free from other substances, indicated by the peak purity index above 0.9999, which confirms the method specificity.

### 3.2.2 Linearity

The data obtained from the peak area of desonide reference substance solutions in the range from 10 to 100 µg/mL were submitted to statistical analysis by the linear-regression model, showing that the response under the experimental conditions is linear within the concentration range. The calibration curve and the correlation coefficient value obtained was  $y = 35607x - 2552.2$  and 0.99994, respectively, where  $x$  is the concentration and  $y$  is the absolute peak area (mAU). The validity of the test was verified by ANOVA, which showed significant linear regression and non-significant linearity deviation at a confidence level of 95 %.

### 3.2.3 Precision

The method precision was evaluated by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Results shown in Table 3 indicate good repeatability (RSD 1.40 %) and low inter-day variability (RSD 1.75 %). The results obtained are in agreement with recommended values,<sup>[23]</sup> indicating the precision of the method proposed.

### 3.2.4 Accuracy

Accuracy was determined by adding the desonide reference substance solution to the placebo, according to recommendations of ICH,<sup>[12]</sup> in triplicate, and at three concentration levels (50%, 100% and 150%) of the method nominal concentration. The results were expressed in terms of recovery percentage and the respective RSD. As shown in Table 4, the mean recovery was 100.09%, indicating the suitability of the conditions adopted (solvent volume, time, extraction temperature and dilutions) for the quantitation of desonide in lotion, within the desired range.

### 3.2.5 Robustness

The method robustness was evaluated using the full factorial design in order to investigate the effect of each variation simultaneously. It must be emphasized that this statistical strategy allows the evaluation of variations induced in the analytical methodology with better quality.

As variations, pH changes in the mobile phase, flow rate, column manufacturer and acetonitrile content in mobile phase were investigated, which can be considered critical parameters. The experimental design, with conditions and results obtained, are summarized in Table 5. As responses, desonide assay of sample solutions at 30 µg/mL, injected in a randomized sequence (n=2), and chromatographic parameters (T, tailing factor; K', capacity factor and N, theoretical plates) were considered.

After calculating the effects of the variations performed using the Minitab® statistical software v.15, the analysis of variance (ANOVA) allows identifying which of the factors induced significant differences in responses. Figure 4 shows that pH value of the mobile phase and manufacturer column induced major effects on the analytical response (desonide assay); however, no effect is greater than the critical effect, at the confidence level of 95 %. In other words, non-significant factors were detected in all analyses. Regarding the chromatographic parameters, all the differences observed in their responses fell into the range recommended. <sup>[17]</sup>

The overall results indicate the robustness of the method developed, since it is defined as a measure of the method ability to provide unchanged results, even under small changes in the analytical conditions. <sup>[12, 16]</sup>

### 3.3 Solution stability

The stability of solutions was examined, and it was observed that responses such as retention time and desonide content of solutions remained unchanged; no other significant changes were observed during this period. Thus, this indicates that the stock desonide reference substance solution (1 mg/mL) was stable at least for 96 hours, under refrigeration and the desonide lotion solution (30 µg/mL) was stable over a day of analysis (12 h), kept at room temperature (21 °C), which is enough to perform the analytical procedure.

### 3.4 System suitability

The system suitability was evaluated by six replicate injections of working desonide reference substance solution (30 µg/mL), with the aid of the *Shimadzu Lab Solutions* software. The chromatographic parameters obtained were in agreement with the following specification: <sup>[17]</sup> theoretical plates, 3100 (RSD 1.5 %); resolution, 2.1

(RSD 1.2 %); tailing factor, 1.02 (RSD 1.4 %); capacity factor, 11.9 (RSD 0.7 %). The RSD values between areas of six injections and the retention time were 1.9 % and 0.7 %, respectively. Taken together, these results indicate that the system is suitable to the analysis to be performed.

### 3.5 Photostability study

Photostability of pharmaceutical products should be evaluated during the formulation development in order to investigate the effects of formulation and packaging on the stability of the final product. The data obtained provide a basis for storage recommendations, as well as to establish specific recommendations about sun exposure and concomitant use of sunscreen or sunglasses in order to minimize adverse effects.

The photostability of desonide lotion to UVA-radiation (352 nm) was assessed by exposing about 3 g of formulation to a light chamber. The residual desonide content and generation of degradation products were monitored by the method developed during 24 hours. Concurrently, placebo and control samples (lotion protected from light) were submitted to the same conditions, and evaluated at the end of 24 hours. Temperature inside the chamber was daily monitored and kept between 25 and 35 °C.

The results are shown in Figures 5 and 6. It can be observed that the pharmaceutical product evaluated was very sensitive to UVA-radiation, since after 15 h, the remaining desonide content was around 51%. In addition, this decrease was exclusively due to radiation, in the conditions evaluated, since in the control samples, the residual content of the drug was around 100%.

After 24 h of exposure, the lotion developed a brownish color, which was not observed in the placebo lotion. No extra peaks were observed in the range from 200 to 800 nm, which could be related to this visual effect; however, changes in color upon exposure to radiation are not necessarily related to the extent of chemical degradation of the material being evaluated.<sup>[11]</sup> Weight loss during the experiment was also observed, which could be attributed to water evaporation, since it constitutes about 70 % of the formulation. This effect was observed in sample and placebo, but not in the control sample.

The degradation kinetics was determined by the decrease in drug concentration over time. The degradation of desonide lotion follows a second-order kinetic, since there is a linear relationship between the inverse of the residual concentration *versus* time<sup>[19]</sup> ( $r = 0.9973$ ), which was described by the equation:  $y = 0.0021x + 0.0328$ . From this data, the  $t_{90}$  (time for 10% decomposition, considered as shelf-life for most pharmaceutical products) was obtained, being 1.58 h. This result is very worrisome, since it could be related to impairments of the



expected therapeutic effect, in addition to the contact of significant levels of degradation products with the skin. It is important to emphasize that the manufacturer establishes the application of the product during the day, and there is no special recommendation in the label.

For many drugs, there is a relationship between *in vitro* photoinstability and the occurrence of adverse biological effects. In this work, UVA radiation was applied, as recommended by the ICH guidelines. However, in environmental conditions, the combination of UVB radiation, which is more energetic, can lead to a faster decrease of the desonide content, as well as to the generation of photoproducts, to which biological safety data are not available.

## CONCLUSION

The results of the validation study showed that the LC-method is specific, precise, accurate, robust and linear in the range from 10 to 100 µg/mL, without any interference of excipients or degradation products, meeting the ICH requirements. Even being a lotion, the sample preparation is very simple, and requires no previous steps to extract hydrophobic excipients. Thus, the LC-method proposed was successfully applied for the assessment of desonide lotion and proved to be accurate to the quantitative analysis during stability studies, contributing to improve the quality and safety of this type of products. The results obtained in photodegradation studies suggest the low stability of this pharmaceutical product and the need for further studies aimed at improving the formulation.

## REFERENCES

1. Hengge, U. R., Ruzicka T., Schwartz R.A., Cork, M.J. 2006. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology* 54: 1-15.
2. Gelbard, C. M., Herbert, A. A. 2009. Desonide hydrogel: advances in vehicle technology. *Expert Review of Dermatology* 4 (1): 23-27.
3. Hebert, A. A., & The Desonide Foam Phase III Clinical Study Group. 2008. Desonide foam 0.05%: Safety in children as young as 3 months. *Journal of the American Academy of Dermatology* 59 (2): 334-340.
4. Wong, V. K., Fuchs, B., Lebwohl, M. 2004. Overview on desonide 0.05%: a clinical safety profile. *Journal of Drugs in Dermatology* 3 (4): 393-397.
5. Pujos, E., Flament-Waton, M.M., Paise, O., Grenier-Loustalot, M.F. 2005. Comparison of the analysis of corticosteroids using different techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(1): 244-254.
6. Mazzarino, M., Torre, X., Botrè, F. 2008. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(4): 681-698.
7. Dikunets, M. A., Appolonova, S. A., Rodchenkov, G. M. 2009. Simultaneous determination of a broad spectrum of nonconjugated xenobiotics by highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* 64(8): 854-864.
8. Lopes, S.B., Sarraguça, J.A., Prior, J. A. V., Lopes, J. A. 2012. Development of an HPLC assay methodology for a desonide cream with chemometrics assisted optimization. *Analytical Letters* 45: 1390–1400.
9. Iqbal, J., Hussain, A., Gupta, A. 2006. Photochemistry of desonide, a non-fluorinated steroidal antiinflammatory drug. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 54(6): 836-838.
10. Dalla Santa, F., Sperotto, L. E., Braga, M. P., Dalcin, T. C. S., Codevilla, C. F., Meneghini, L. Z., Donato, E. M., Rolim, C. M. B., Bergold, A. M., Adams, A. I. H. 2012. Development and validation of a simple stability-indicating LC-method and UVA photostability study of desonide hair lotion. *Current Analytical Chemistry*, in press.
11. Tønnesen, H. H. 2004. *Photostability of drugs and drug formulations*. Boca Raton: CRC Press.
12. ICH – 2005. *Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).

13. ICH – 2003. *Guidance for Industry: Stability Testing of New Drug Substances and Products*. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf)
14. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. 2009. *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
15. Watson, D. G. 2005. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone.
16. Dejaegher, B., Heyden, Y. V. 2008. Screening Designs (Part 2) Data Analysis, *LC-GC Europe* 21(2): 1-8.
17. United States Food and Drug Administration (US-FDA). 1994. *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*.
18. ICH – 1996. *Guideline on Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products*. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf)
19. Yoshioka, S., Stella, V. J. 2002. *Stability of drugs and dosage forms*. New York: Kluwer Academic Publishers.
20. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. 1997. *Practical HPLC method development*. New York: Wiley.
21. Scifinder Scholar. American Chemical Society (ACS). 2012. *Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2012 ACD/Labs)*.
22. Bakshi, M., Singh, S. 2002. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28: 1011-1040.
23. Shabir, G. A. 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987 (1-2): 57-66.

*Table 1.* Parameters for the 2<sup>4</sup> full factorial design to determine the robustness

<b>Factor</b>	<b>Lower level (-)</b>	<b>Higher level (+)</b>
pH of mobile phase	4.50	5.50
Eluent flow rate	1.00 mL/min	1.40 mL/min
Trademark of column	Waters <sup>®</sup>	Phenomenex <sup>®</sup>
Ratio of acetonitrile	9% (v)	11% (v)

**Table 2.** Assay of desonide in lotion sample solution under stress testing

<b>Condition</b>	<b>Desonide assay (%)<sup>a</sup></b>	<b>Peak purity index<sup>a</sup></b>
HCl 0.1 M (3 h)	95.94	0.99999
NaOH 0.1 M (3 h)	85.01	0.99999
24 h/ 70 °C	101.97	0.99999
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (24 h)	94.60	0.99999
UVA light (352 nm, 3 h)	84.27	0.99999

<sup>a</sup> n=2/condition.

**Table 3.** Method repeatability and intermediate precision to desonide lotion

	<b>Assay (%)</b>	<b>Mean (%)</b>	<b>RSD</b>
Day 1	102.29	103.43	1.40
	104.28		
	103.51		
	104.88		
	101.13		
	104.48		
Day 2	102.12	102.43	1.75
	99.05		
	103.39		
	104.20		
	102.94		
	102.85		
	<b>Interday (n=12)</b>	102.93	1.59

**Table 4.** Accuracy data for proposed desonide LC method

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		Recovery (%)	Mean recovery (%)
	Added	Recovered <sup>b</sup>		
		14.94	99.60	
R <sub>1</sub>	15.00	14.92	99.46	99.80
		15.05	100.33	
		29.93	99.77	
R <sub>2</sub>	30.00	30.32	101.07	100.30
		30.02	100.07	
		44.93	99.84	
R <sub>3</sub>	45.00	44.71	99.35	100.17
		45.59	101.31	
		<b>Mean recovery (% , n=9)</b>		
			<b>RSD</b>	0.69

<sup>a</sup> reference substance; <sup>b</sup> mean of three determinations.

**Table 5.** Full factorial design and results of the analysis of the robustness of the analytical method

Run order	pH	Flow rate (mL/min)	Column <sup>a</sup>	% AC <sup>b</sup> (v/v)	Assay (%)	T <sup>c</sup>	k <sup>rd</sup>	N <sup>e</sup>	Run order	pH	Flow rate (mL/min)	Column <sup>a</sup>	% AC <sup>b</sup> (v/v)	Assay (%)	T <sup>c</sup>	k <sup>rd</sup>	N <sup>e</sup>
1	5.50	1.40	A	11	102.74	1.08	3.75	3028	17	4.50	1.00	B	9	103.06	1.07	10.73	5199
2	5.50	1.40	B	11	104.68	1.07	6.01	4200	18	4.50	1.00	B	11	105.84	1.04	3.95	4572
3	4.50	1.40	A	11	103.01	1.08	3.67	3378	19	4.50	1.40	A	11	105.82	1.05	3.66	3158
4	5.50	1.00	A	9	104.43	1.03	6.95	3736	20	4.50	1.00	B	11	104.47	1.04	4.30	4572
5	5.50	1.00	B	11	103.66	1.10	8.84	5146	21	4.50	1.40	B	11	102.88	1.06	5.68	4086
6	5.50	1.00	B	9	106.74	1.07	5.75	4850	22	4.50	1.40	B	11	104.89	1.06	5.64	4018
7	4.50	1.00	A	11	103.98	1.09	5.53	3639	23	4.50	1.00	A	9	104.50	1.02	6.52	3673
8	4.50	1.00	A	11	106.63	1.09	3.59	3760	24	5.50	1.00	B	11	106.48	1.10	8.79	4989
9	4.50	1.40	A	9	105.34	1.01	4.37	3171	25	5.50	1.40	B	9	103.74	1.05	6.50	4211
10	4.50	1.40	B	9	103.40	1.06	7.43	4486	26	4.50	1.40	A	9	105.33	1.00	4.35	3285
11	5.50	1.40	B	11	103.88	1.08	6.05	4267	27	5.50	1.40	A	9	106.64	1.05	4.48	3092
12	5.50	1.00	A	9	102.93	1.01	6.92	3770	28	5.50	1.40	A	9	105.64	1.05	6.55	4124
13	4.50	1.00	A	9	105.01	1.06	6.53	3762	29	4.50	1.40	B	9	103.09	1.07	7.46	4486
14	5.50	1.40	A	9	103.99	1.08	4.51	3178	30	5.50	1.00	A	11	105.58	1.06	5.66	3454
15	5.50	1.00	A	11	104.20	1.08	5.68	3481	31	4.50	1.00	B	9	102.04	1.08	10.79	5472
16	5.50	1.40	A	11	105.60	1.06	3.69	3524	32	5.50	1.00	B	9	105.17	1.07	5.73	4807

<sup>a</sup> Column: A: Waters<sup>®</sup>; B: Phenomenex<sup>®</sup>;<sup>b</sup> % Acetonitrile in mobile phase (v/v);<sup>c</sup> Tailing factor;<sup>d</sup> Capacity factor;<sup>e</sup> Theoretical plates.



## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Chemical structure of desonide

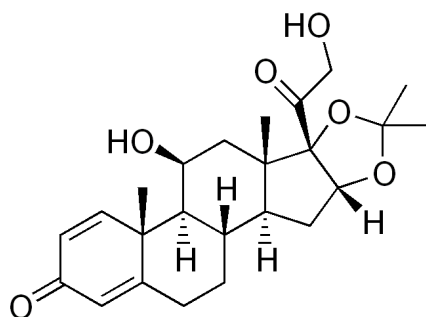
**Figure 2.** Typical chromatogram of desonide reference substance (a); desonide lotion at 30 µg/mL (b); placebo lotion (c). Peaks: methylparaben (1) and propylparaben (2)

**Figure 3.** Chromatograms of desonide lotion after acid stress (a) – HCl 0,1 M/3 h; basic stress (b) – NaOH 0,1 M/3 h; oxidative treatment (c) – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %/24 h and UVA radiation (d) – 3 h. Peaks: methylparaben (1); propylparaben (2) and hydrogen peroxide (4)

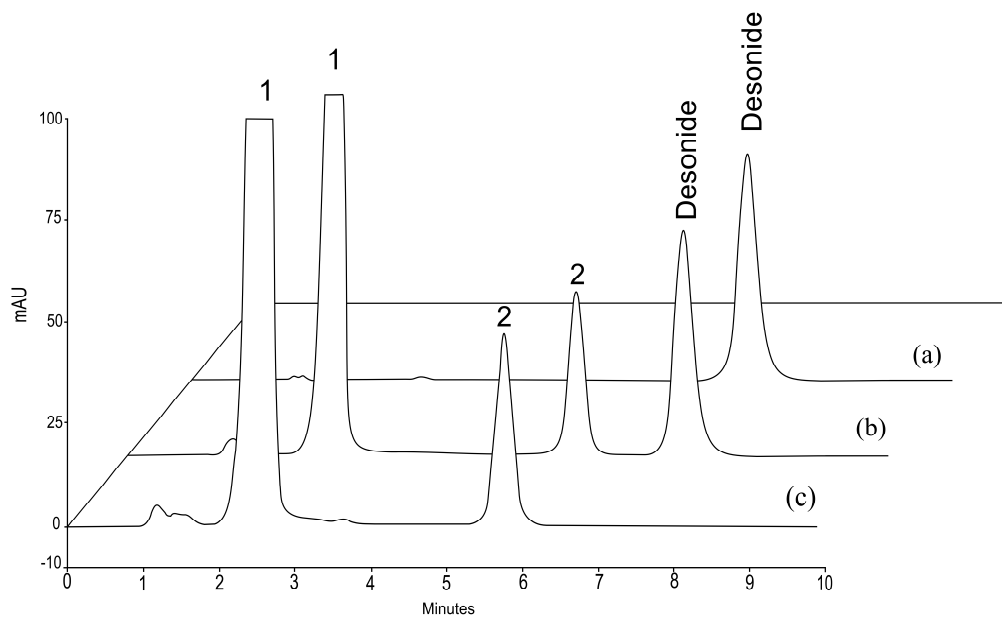
**Figure 4.** Pareto chart of the standardized effects of the factors discussed in the robustness of the assay method

**Figure 5.** Chromatograms of degradation of desonide lotion: (a) at zero time, and (b) after 24 hours of exposure to UVA radiation

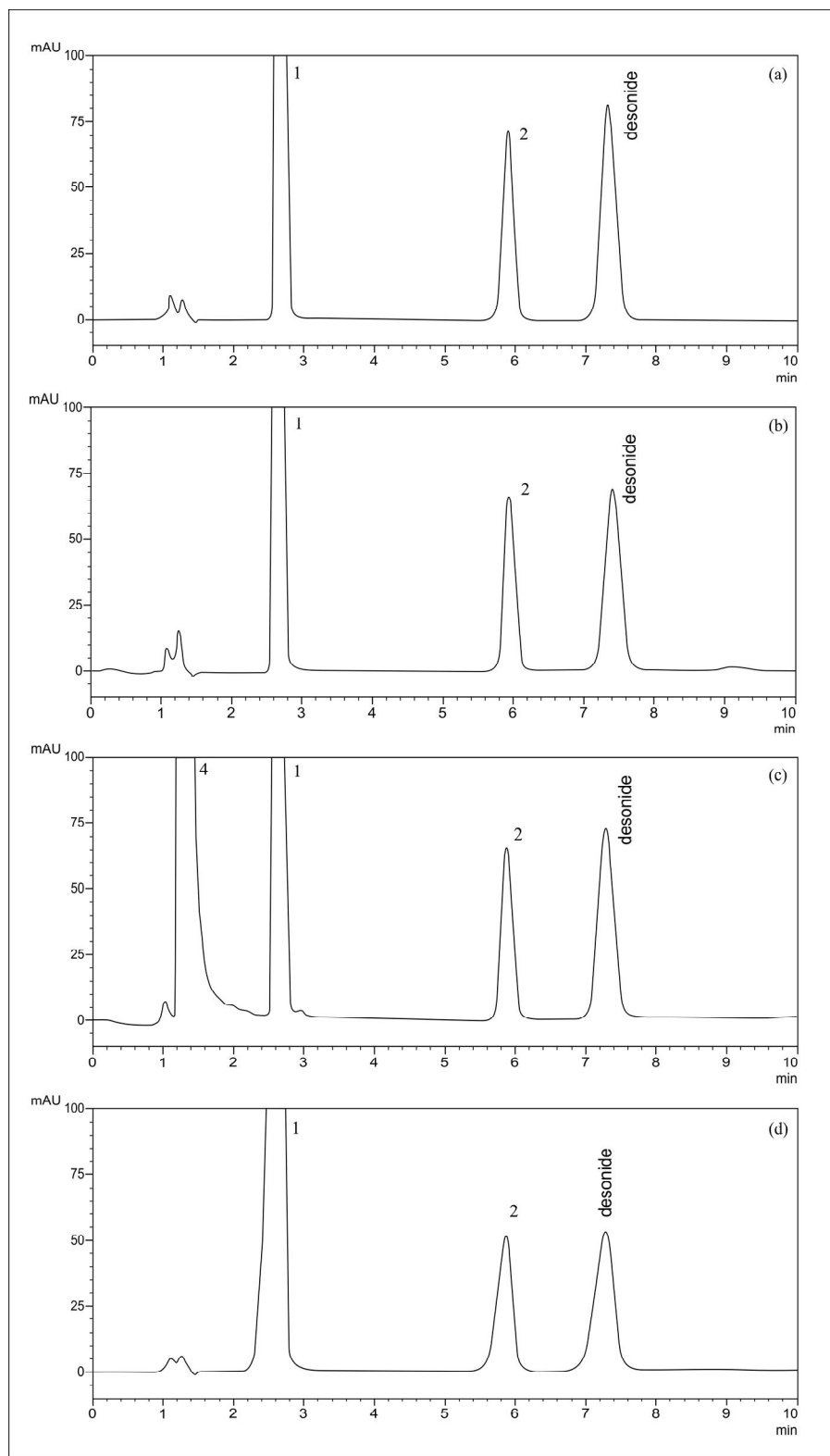
**Figure 6.** Results of desonide lotion assay, under exposure to UVA radiation



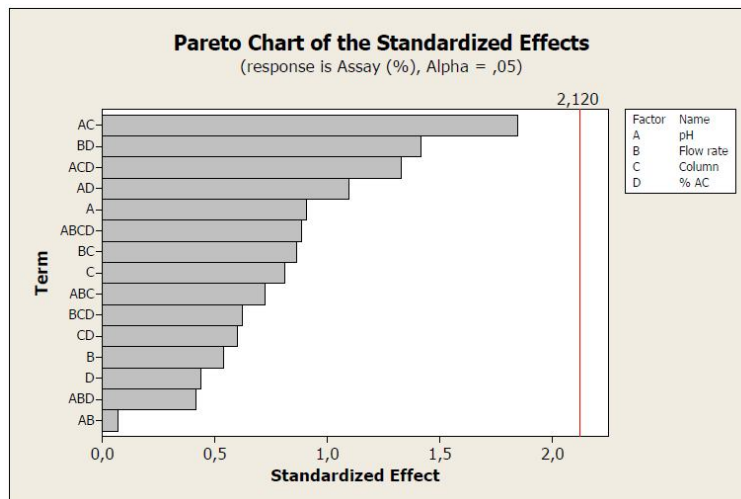
*Figure 1*



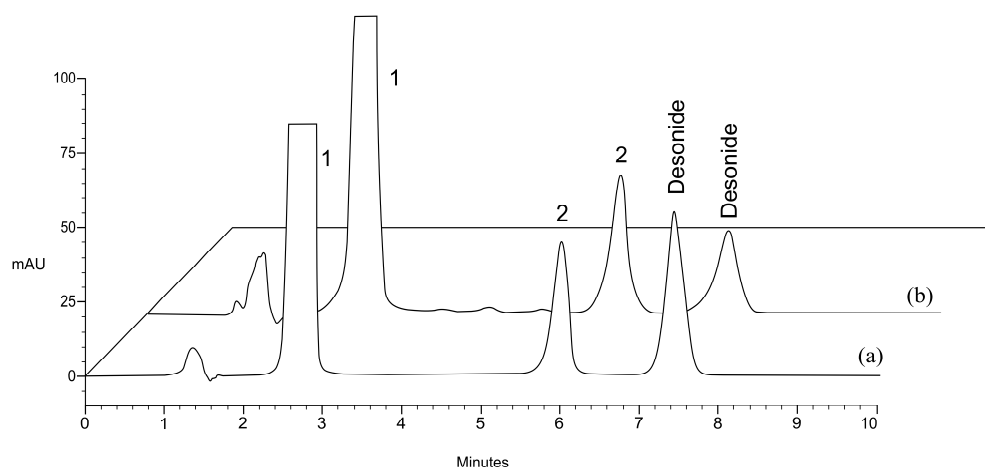
**Figure 2**



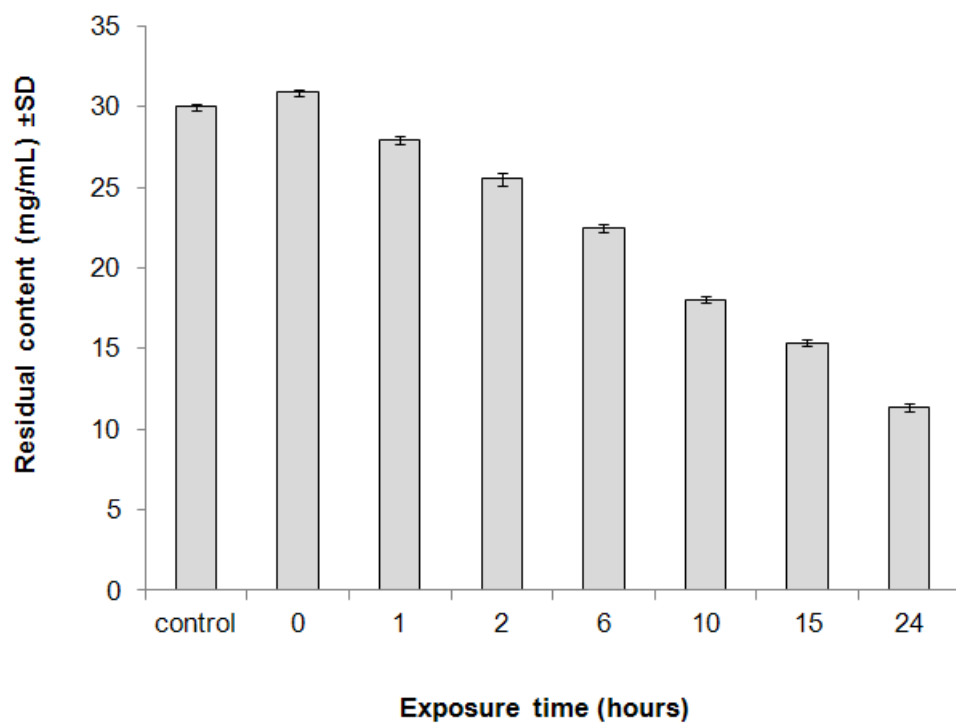
**Figure 3**



*Figure 4.*



**Figure 5**



*Figure 6.*

# **CAPÍTULO 3: GEL CREME DE DESONIDA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DOSEAMENTO POR CLAE ATRAVÉS DA OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA E ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE**

## **1 INTRODUÇÃO**

A forma farmacêutica gel creme da desonida foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de várias desordens da pele, principalmente dermatite atópica leve a moderada em pacientes a partir de 3 meses de idade. Esta formulação oferece os benefícios de um veículo hidrogel, o qual geralmente é mais bem tolerado e apresenta maior aceitação pelos pacientes do que outros destinados ao uso tópico (GELBARD; HERBERT, 2009).

A exemplo das demais formulações de desonida, não há monografia farmacopeica para a formulação em gel creme. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação de sua qualidade.

Segundo Bakshi e Singh (2002) o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis é de fundamental importância durante as diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação, de estabilidade e controle de qualidade. De acordo com a ICH (2005) os métodos analíticos aplicados a novas substâncias devem ser validados e adequados para a detecção e a quantificação inclusive dos produtos de degradação e, ainda, devem ser capazes de demonstrar que as impurezas próprias do fármaco não interferem com ou são separadas dos produtos de degradação presentes na matéria-prima.

Uma boa ferramenta para ser incluída nas estratégias de desenvolvimento da metodologia ou na melhoria do desempenho analítico é a abordagem multivariada, que, sem custos adicionais pode proporcionar redução no número de experimentos e, conseqüentemente, no tempo e no custo de uma análise de rotina. Além disso, a abordagem multivariada permite a investigação dos efeitos de interação entre os parâmetros, o que não é possível com uma abordagem univariada (FERREIRA et al., 2004).



Dentre os métodos analíticos quantitativos instrumentais, a CLAE figura como o mais usado no controle de qualidade de medicamentos. Por sua especificidade, possibilita a análise da substância ativa em meio a matrizes complexas, impurezas e produtos de degradação, sendo o método preferencial para estudos de estabilidade (WATSON, 2005).

Os testes de estabilidade visam estabelecer o prazo de validade do produto (pelos estudos de longa duração, acelerado e de acompanhamento), bem como a estabilidade intrínseca de fármacos e formulações (pelos testes de degradação forçada).

O teste de fotoestabilidade dos fármacos e das suas respectivas formas farmacêuticas é importante para garantir a qualidade durante todo o prazo de validade do produto. Os protocolos básicos para novos fármacos e respectivos produtos são descritos nas diretrizes da ICH para testes de fotoestabilidade (ICH, 1996).

Diferentes tipos de reações podem ser iniciadas fotoquimicamente, como redução, desalquilação, hidrólise, oxidação, isomerização, rearranjo de anéis, polimerização ou remoção de diversos substituintes, como halogenados ou grupos carboxílicos (TØNNESEN, 2001).

Compostos contendo grupos cromóforos, tais como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações são mais sensíveis à radiação luminosa. Uma condição para que ocorra a reação fotoquímica é que a molécula absorva energia luminosa na região de comprimento de onda da fonte de radiação. Dessa forma, lâmpadas germicidas, com emissão de 254 nm, têm sido utilizadas em alguns estudos de fotoestabilidade (NUDELMAN, 1975; MOORE, 2004).

Fármacos sensíveis à luz podem ser afetados pela luz solar (especialmente radiação ultravioleta) e por fonte de luz artificial (lâmpada fluorescente). A exposição inapropriada à luz pode levar à fotodegradação da substância ativa, podendo formar um produto inativo, pode, ainda, alterar as propriedades físico-químicas, além de originar produtos tóxicos de fotodegradação. É conhecido que certos produtos de degradação apresentam maior toxicidade que a substância ativa que os originou. Assim, é importante que durante o estudo de estabilidade de um produto seja avaliada a possível alteração na toxicidade do produto final (NUDELMAN, 1975; TØNNESEN, 2001).

Considerando a carência de metodologias para avaliação da desonida, a variabilidade das condições cromatográficas que podem ser utilizadas no desenvolvimento de um método por CLAE e a fotoinstabilidade da matéria-prima e de outras formulações de desonida já avaliadas, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método simples e confiável por CLAE para análise de desonida em gel creme através de uma abordagem multivariada e realizar estudo de fotoestabilidade da formulação através da exposição à radiação UVA (352 nm).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Planejamento experimental**

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios, estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo principal de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo (MONTGOMERY, 2000).

Nos últimos 60 anos a procura por métodos científicos que diminuam o número de ensaios e aumentem a precisão dos resultados tem sido cada vez maior. Embora esta metodologia tenha sido proposta ainda na década de 50, somente nos últimos anos ela tem sido mais intensamente utilizada (RODRIGUES; LEMMA, 2009). Em revisão de literatura realizada por esses autores foi evidenciado um aumento crescente e exponencial do número de artigos que utilizaram análise de superfícies de respostas e, conseqüentemente, planejamentos fatoriais. São apontadas como vantagens do planejamento experimental (MONTGOMERY, 2000; RODRIGUES; LEMMA, 2009):

- A redução do número de experiências ou repetições e melhoria da qualidade das informações obtidas através dos resultados. Isto significa sensível redução do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final;

- A análise simultânea de fatores analíticos, o que permite verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os mesmos. Pela análise isolada dos fatores dificilmente será atingida a condição otimizada, pois não será possível detectar a interação entre eles;

- A otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo, sendo esta uma das grandes vantagens do planejamento fatorial.

Nesse contexto, o planejamento experimental vem sendo utilizado com o objetivo de aprimorar métodos analíticos e tem possibilitado, por exemplo, melhorar o desempenho de análises por CLAE, através da obtenção de maior resolução dos picos cromatográficos, assim como a minimização de reagentes dispendiosos, sem prejuízo na qualidade dos resultados (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

O planejamento estatístico de experimentos permite a definição de uma superfície de resposta, a qual permite a localização dos valores referentes aos fatores que são considerados ideais. Neste caso, o método envolve os seguintes passos: (1) seleção dos fatores instrumentais que são conhecidos por influenciar nas propriedades cromatográficas. Os níveis de variação em cada um dos fatores selecionados devem, também, ser definidos nesta fase; (2) seleção de um desenho apropriado para o conjunto de fatores que garanta a avaliação dos efeitos principais, e se for o caso, de efeitos quadráticos e de quaisquer interações; (3) a execução das análises definidas na etapa anterior e a aplicação de análise de regressão para calcular os coeficientes do modelo matemático da superfície de resposta; (4) a utilização deste modelo matemático para localizar a resposta ótima na região delimitada pelos intervalos definidos para cada um dos fatores considerados e a verificação experimental, a fim de validar o modelo; e (5) se o resultado for satisfatório o processo é concluído. Se, no entanto, os objetivos propostos não são atingidos, o processo repete-se, através da seleção de outra região experimental para o estudo (com novos valores para os níveis dos fatores) ou fixando os valores de alguns fatores já estudados e incluindo novos fatores no modelo (SIOUFFI; PHAN-TAN-LUU, 2000; CELA et al., 2012).

Dessa forma, o planejamento experimental é uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos processos e no aprimoramento de processos em utilização. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de

processos, a redução da variabilidade de resultados, dos tempos de análise e dos custos envolvidos (MONTGOMERY, 2000; RODRIGUES; LEMMA, 2009).

Existem vários modelos de planejamento experimental a serem utilizados, sendo que os planejamentos fatoriais (completos ou fracionários) são comumente utilizados nas etapas de triagem, ou seja, na determinação das variáveis e das interações significativas entre elas; após pode ser executada uma metodologia de análise de superfície de resposta com a finalidade de encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada. Dentre os diversos modelos encontram-se o delineamento composto central (DCC) e a matriz Doehlert (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Diversos artigos da área relatam a utilização dessas ferramentas estatísticas na obtenção de condições otimizadas e de confiabilidade nas respostas obtidas (MEDENICA et al., 2004; ARAGÃO et al., 2005; MAMANI et al., 2008; BONFILIO et al., 2009; ACEVSKA et al., 2012).

Nesse trabalho, empregou-se como experimento de triagem um planejamento fatorial completo, através da análise da influência de três fatores (pH, proporção de metanol e fluxo da fase móvel), seguido de uma análise da superfície de resposta obtida através do delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme orienta Rodrigues e Lemma (2009), para análise de dois ou três fatores simultaneamente.

### **3 EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Substância química de referência, amostra e reagentes**

A substância química de referência de desonida (SQR) foi obtida da *Proactive Molecular Research* (EUA), com teor declarado de 98,55%. O gel creme de desonida a 0,05% - Adinos<sup>®</sup> (Aché, lote: 1201991) foi adquirido em farmácias comerciais. O ácido clorídrico e hidróxido de sódio de grau analítico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e peróxido de hidrogênio a 30% da Synth (Brasil). Para o preparo da fase móvel e dos reagentes foi utilizada água ultrapura (Milipore

MiliQ<sup>®</sup> A10 *water system* – Billerica, EUA). Os reagentes de grau cromatográfico (metanol e acetonitrila) foram adquiridos da Tedia (Ohio, EUA).

### 3.2 Condições cromatográficas

As análises quantitativas foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU LC-20AT (Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, central de controle CBM-20A, injetor manual Rheodyne (20 µL de *loop*) e desgaseificador DGU-20A5.

Após ensaios preliminares (através do DCCR) foram selecionados os melhores parâmetros para a validação do método. Dessa forma, a separação cromatográfica foi obtida em uma coluna C<sub>18</sub> Luna Phenomenex<sup>®</sup>, 150 x 4,6 mm (5 µm, 100 Å) e pré-coluna Phenomenex<sup>®</sup>. A fase móvel foi constituída de uma mistura de metanol, acetonitrila e água pH 7,0, 50:10:40 (v/v/v), a um fluxo de 1,0 mL/min. O pH da fase móvel foi ajustado com trietilamina antes da mistura com a fase orgânica. A fase móvel foi preparada diariamente, filtrada através de uma membrana de *nylon* de 0,45 µm (Millipore) e desgaseificada por ultrassom e vácuo antes da utilização. A determinação quantitativa foi baseada nas respostas por integração da área dos picos, processados pelo *software* Shimadzu *Lab Solutions*, sendo a detecção efetuada em 244 nm.

### 3.3 Software estatístico

O desenho experimental e análise estatística dos dados para análise da robustez do método foram realizadas pelo *software* de análise de dados MINITAB 15 (Minitab Inc., State College, PA, EUA).

### 3.4 Preparo das soluções

#### 3.4.1 Soluções estoque e de trabalho de desonida SQR

A solução estoque de desonida SQR foi preparada através da pesagem de 20 mg de desonida SQR, em balão volumétrico de 20 mL, tendo seu volume completado com metanol, a fim de obter solução estoque 1,0 mg/mL. Esta solução foi armazenada sob refrigeração e diluiu-se com metanol às concentrações apropriadas, quando necessário.

#### 3.4.2 Solução amostra

Para o preparo da solução amostra foram pesados exatamente cerca de 3 g de gel creme de desonida (equivalente a 1,5 mg de fármaco) em béquer de 50 mL, adicionaram-se 30 mL de metanol e levou-se ao aquecimento (40 °C) por 5 minutos. Após, a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume completado com metanol, obtendo-se concentração teórica de desonida de 30 µg/mL, sendo esta a concentração de trabalho. Antes da injeção no cromatógrafo, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante utilizado nas injeções.

### 3.5 Otimização dos parâmetros cromatográficos

A otimização do método analítico foi realizada através do método de DCCR, a fim de avaliar quais as melhores condições para a separação e a quantificação de desonida na amostra de gel creme. Todos os dados foram processados utilizando o *software* MINITAB 15 (Minitab Inc., State College, PA, EUA). O desenho experimental foi construído através da utilização de um planejamento fatorial completo, para avaliar os efeitos de três fatores em dois níveis ( $2^3$ ), superior (+) e inferior (-), incluindo seis pontos centrais e seis pontos axiais. Os fatores analisados

e seus níveis foram os seguintes: pH da fase móvel (5,0 e 7,0), proporção de metanol na fase móvel (35% e 65%) e fluxo da fase móvel (0,8 e 1,2 mL/min). As condições estudadas estão apresentadas no Quadro 1.

<b>Fator</b>	<b>Nível inferior (-)</b>	<b>Nível superior (+)</b>
pH da fase móvel	5,00	7,00
Fluxo do eluente	0,80 mL/min	1,20 mL/min
Proporção de metanol	35% (v)	65% (v)

Quadro 1 - Parâmetros do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) para determinar a metodologia analítica.

A solução amostra na concentração de 30 µg/mL foi utilizada nesses experimentos (seção 3.4.2). As respostas analíticas verificadas foram: número de pratos teóricos ( $N$ ), assimetria de pico ( $A$ ), fator capacidade ( $k$ ), resolução ( $R$ ) e tempo de retenção ( $T_r$ ) para o pico de desonida na amostra analisada.

### 3.6 Validação do método

A validação do método foi realizada seguindo as especificações nacionais (BRASIL, 2003) e internacionais (FDA,1994; ICH, 2005) para os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez.

#### 3.6.1 Identificação da amostra

A identificação do fármaco no gel creme foi realizada através da comparação do tempo de retenção do pico da desonida frente à solução de desonida SQR. Os picos relativos aos excipientes (conservantes) foram primeiramente identificados pela análise individual dos mesmos e, posteriormente, pela mistura comercial dos

conservantes (composta por fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno).

### 3.6.2 Adequabilidade do sistema (*system suitability*)

Com o objetivo de confirmar que o equipamento utilizado estava apropriado para as análises realizadas, avaliou-se a adequabilidade do sistema. Tal ensaio foi realizado pela injeção de seis alíquotas da solução de trabalho de desonida SQR (seção 3.4.1) nas quais foram avaliados o fator de capacidade ( $k$ ), a assimetria ( $A$ ) e o número de pratos teóricos ( $N$ ) dos picos referentes à desonida.

### 3.6.3 Especificidade

Esse parâmetro foi avaliado pela determinação da pureza do pico da desonida, na presença de excipientes e produtos de degradação. A interferência de potenciais produtos de degradação foi investigada através da avaliação da pureza do pico de desonida, após os testes de degradação forçada. Soluções amostra de desonida gel creme foram expostas à degradação térmica, fotólise, oxidação, hidrólise ácida e básica. Para cada condição adotada, foram analisadas duas soluções independentes da amostra, preparadas conforme descrito a seguir:

- *Degradação térmica*: aquecimento da solução amostra (30 µg/mL), a 70 °C, por 24 horas.
- *Fotólise*: exposição da solução amostra (30 µg/mL) em cubetas de plástico transparentes com tampa (Brand® 1,00 mL, dimensões 12,5 x 12,5 x 45 mm) à lâmpada de radiação UVA (352 nm) em câmara espelhada internamente com dimensões de 100 x 25 x 25cm (L x A x P) por 5 horas. Cubetas contendo a solução amostra envoltas com papel *craft* também foram colocadas à câmara com o objetivo de verificar alguma interferência devida à elevação da temperatura em seu interior, denominadas controle escuro.
- *Oxidação*: durante o preparo da solução amostra, conforme descrito na seção 3.4.2, após o período de aquecimento (40 °C, por 5 minutos), acrescentou-se 10 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, v/v) ao béquer. Dessa forma, a solução amostra permaneceu exposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, por 24 horas, e após foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume final ajustado com metanol.



- *Hidrólise ácida*: após o período de aquecimento da solução amostra, acrescentou-se 10 mL de ácido clorídrico (HCl 1M) ao béquer, permanecendo assim por 6 horas. Após, a solução foi neutralizada com NaOH 2M e transferida para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume final ajustado com metanol.

- *Hidrólise básica*: após o período de aquecimento da solução amostra, acrescentou-se 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH 1M) ao béquer, permanecendo assim por 10 minutos. Após, a solução foi neutralizada com HCl 2M e transferida para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume final ajustado com metanol.

Alíquotas da solução amostra foram centrifugadas antes da injeção (4000 rpm por 15 minutos). Os resultados obtidos foram comparados com os da solução de desonida SQR e expressos na forma de teor residual. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico de desonida.

#### 3.6.4 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas analíticas independentes com solução de desonida SQR, em cinco níveis de concentração, na faixa de 5 a 100 µg/mL. A partir de uma solução de desonida SQR em metanol, na concentração de 500 µg/mL, alíquotas de 1 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100, 50, 25, 10 e 5 mL, tendo seus volumes ajustados com metanol, obtendo-se, respectivamente, as concentrações finais de 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL.

Esse procedimento foi realizado em triplicata, sendo que foram realizadas três determinações para cada solução preparada. A curva analítica foi obtida a partir dos valores das áreas dos picos de desonida *versus* concentrações de desonida SQR nas soluções correspondentes, obtendo-se o coeficiente de correlação e a equação da reta, calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificação da linearidade do método.

### 3.6.5 Precisão

A precisão foi determinada pela repetibilidade e precisão intermediária, pela análise de soluções amostra do gel creme de desonida na concentração nominal de 30 µg/mL, preparadas conforme descrito na seção 3.4.2. A repetibilidade foi expressa através do desvio padrão relativo (DPR) de seis determinações realizadas nas mesmas condições (dia e analista). Por sua vez, a precisão intermediária foi avaliada através do DPR obtido em dois dias diferentes de análise (n = 12).

A concentração ( $C_a$ ) em µg/mL das soluções amostra de desonida (gel creme) foi determinada de acordo com a equação abaixo:

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$A_a$  = área absoluta do pico para a solução amostra de desonida gel creme

$C_{SQR}$  = concentração da solução de desonida SQR

$A_{SQR}$  = área absoluta do pico para a solução de desonida SQR

O teor (C%) de desonida no gel creme foi calculado a partir da seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução amostra de desonida

$C_t$  = concentração teórica da solução amostra de desonida

### 3.6.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através do teste de recuperação de quantidades crescentes de solução de desonida SQR adicionadas à amostra de gel creme, gerando soluções de concentrações correspondentes a 70, 100 e 130% da concentração de trabalho (30 µg/mL). Esse procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentagem de recuperação.

Preparou-se inicialmente, uma solução de desonida SQR a 1,0 mg/mL em metanol. Para o preparo das soluções amostra acrescidas de desonida SQR (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>) foram adotados os seguintes procedimentos:

- Pesou-se, exatamente cerca de 1,5 g do gel creme (correspondente a 0,75 mg de desonida) em béquer de 50 mL. Adicionou-se, alternativamente, os seguintes volumes da solução de desonida SQR a 1mg/mL: 250 µL, 750 µL e 1250 µL, a fim de preparar respectivamente as soluções R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Adicionou-se 30 mL de metanol às soluções com posterior aquecimento (40 °C), por 5 minutos. Após, cada solução foi transferida quantitativamente para balões volumétricos de 50 mL, tendo seus volumes ajustados com metanol para obtenção de soluções nas concentrações de 20 µg/mL, 30 µg/mL e 40 µg/mL, que correspondem a 70, 100 e 130% da concentração usual do método.

O teor de desonida proveniente da amostra foi calculado considerando o teor médio obtido no estudo da precisão (n=12) e a massa pesada para o preparo de cada solução. Considerou-se o teor excedente como proveniente da solução adicionada de desonida SQR, apresentado como percentual de recuperação, o qual foi calculado pela equação abaixo.

$$R\% = [(C_R - C_D) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C<sub>R</sub> = concentração de desonida nas soluções acrescidas de padrão (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> em µg/mL)

C<sub>D</sub> = concentração de desonida oriunda do gel creme (µg/mL)

C<sub>SQR</sub> = concentração da solução de desonida SQR adicionada (µg/mL)

O teste de recuperação foi executado dessa forma porque a baixa concentração de fármaco na amostra permitiu que fosse feita apenas uma diluição da mesma. Sendo assim, o procedimento usual do teste de recuperação, no qual se preparam quatro soluções amostra, em três das quais são adicionados volumes conhecidos de solução SQR e a última é usada como referência para o cálculo da contribuição da amostra no teor obtido nas soluções, não pôde ser usado.

### 3.6.7 Robustez

A capacidade do método analítico desenvolvido em permanecer inalterado sob pequenas alterações foi testada a fim de avaliar sua robustez.

Para isso, uma abordagem fatorial foi adotada, utilizando-se um planejamento fatorial completo para avaliar os efeitos de três fatores em dois níveis ( $2^3$ ), em duplicata e com a adição de três pontos centrais, totalizando 19 experimentos.

Foram testados os seguintes fatores:

- proporção de metanol na fase móvel (45% a 55%),
- pH da fase móvel (6,5 a 7,5)
- fluxo (0,9 a 1,1 mL/min).

Os testes realizados estão descritos no Quadro 2. Para efetuar a série de experimentos planejados foi utilizada solução amostra na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$ , a qual foi analisada em duplicata, sendo que a ordem de execução foi aleatória.

A principal resposta avaliada foi o teor percentual de desonida no gel creme em cada condição adotada. Foram avaliados também variações no tempo de retenção ( $T_r$ ), número de pratos teóricos dos picos de desonida ( $N$ ), assimetria do pico em questão ( $A$ ) e a resolução do pico correspondente à desonida dos demais picos ( $R$ ). O gráfico de Pareto foi utilizado para identificar os efeitos significativos ( $p < 0,05$ ).

Experimento	Metanol (% v/v)	pH	Fluxo (mL/min)
1	45	7,5	0,9
2	55	7,5	1,1
3	45	6,5	0,9
4	55	6,5	1,1
5	45	7,5	0,9
6	55	6,5	0,9
7	45	6,5	0,9
8	45	6,5	1,1
9	50	7,0	1,0
10	55	7,5	0,9
11	45	6,5	1,1
12	50	7,0	1,0
13	55	6,5	0,9
14	45	7,5	1,1
15	55	7,5	0,9
16	55	6,5	1,1
17	45	7,5	1,1
18	50	7,0	1,0
19	55	7,5	1,1

Quadro 2 - Projeto fatorial para análise da robustez do método analítico para desonida por CLAE.

### 3.7 Estudo de fotoestabilidade do gel creme de desonida

O estudo da fotoestabilidade do gel creme de desonida foi realizado adicionando-se 3 g da formulação comercial em placas de petri (60 x 15 mm) de vidro, abertas, as quais foram expostas à lâmpada UVA (352 nm), em uma câmara espelhada internamente com dimensões de 100 x 25 x 25cm (L x A x P). Amostras do gel creme de desonida, nas mesmas condições, porém protegidas da luz através

do revestimento com papel *craft* foram analisadas com o objetivo de avaliar a interferência do calor sobre a degradação, conforme recomendação da ICH (1996).

Ao longo de até 48 h de exposição, as amostras do gel creme foram retiradas da câmara (2, 6, 10, 15, 24, 36 e 48 h), tendo todo o conteúdo da placa de petri transferido para um béquer de 50 mL, sendo adicionado a este 30 mL de metanol. Após, foi levado ao aquecimento a 40 °C por 5 minutos, e a solução foi então transferida para balão volumétrico de 50 mL, tendo seu volume completado com metanol, obtendo-se assim uma concentração teórica de desonida na amostra de 30 µg/mL e, posteriormente, submetida à centrifugação por 15 minutos a 4000 rpm.

O teor de desonida em cada amostra foi determinado pela injeção do sobrenadante em cromatógrafo a líquido. Dessa forma, as amostras foram avaliadas quanto ao teor residual do princípio ativo e a possível formação de produtos de degradação. A quantificação foi realizada através do método de CLAE previamente validado e determinou-se a ordem de reação da degradação, utilizando como base a correlação existente entre as variáveis concentração e tempo. Foram obtidos os coeficientes de correlação linear ( $r$ ), observando que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem de reação. Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação ( $k$ ), e o período de vida útil  $t_{90\%}$  (tempo necessário para que o teor de fármaco atinja 90% na formulação) também foram obtidos (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Otimização do método**

A partir de testes preliminares, identificaram-se as condições iniciais mais relevantes, as quais foram otimizadas através de delineamento fatorial.

As condições ideais foram identificadas através da superfície de resposta obtida por um DCCR de  $2^3$  fatores, em duplicata, com 8 pontos em cubo, 6 pontos

centrais e 6 pontos axiais, totalizando 20 ensaios. Este procedimento proporciona uma via eficiente para determinar a melhor condição analítica a partir de um número selecionado de análises.

Uma vez que a resolução do pico de desonida é muito importante, pela possibilidade de co-eluição de excipientes da amostra, decidiu-se usar esse parâmetro como resposta analítica principal a ser analisada. Considerando-se ainda que o tempo de retenção deva ser relativamente curto, a fim de reduzir o tempo de análise e consumo de fase móvel, esse parâmetro também foi levado em consideração. Além desses, foram avaliados ainda outros parâmetros cromatográficos significativos, tais como: assimetria do pico, número de pratos teóricos e fator capacidade.

Seguindo esse raciocínio, foi obtido um gráfico de superfície de resposta para a resolução ( $R$ ) através do *software* utilizado (Figura 1).

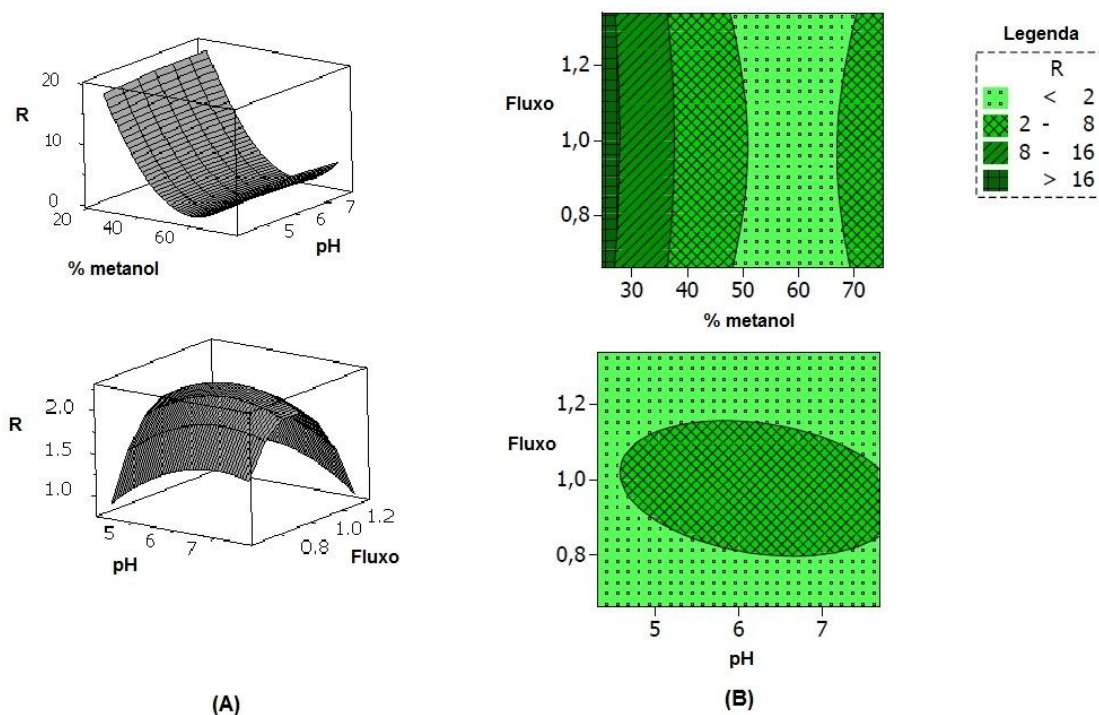


Figura 1 – (A) Superfície de resposta e (B) curvas de contorno obtidas através do delineamento composto central rotacional para a resolução.

Como verificado na Figura 1, o aumento na proporção de metanol na fase móvel conduziu a uma redução da resolução, porém a mesma se manteve dentro dos valores de referência ( $R > 2,0$ ) em toda a faixa estudada (35 a 65%). Por outro lado, valores de pH em torno de 7,0 levaram a um aumento na resolução. Ainda, tem-se boa resolução usando fluxo de 1,0 mL/min combinado ao pH 7,0, observando-se queda na resolução para valores de fluxo menores e maiores do que 1,0 mL/min. Portanto, utilizando os valores de pH mais elevados dentro do domínio experimental, qualquer proporção de metanol poderia ser utilizada sem alteração significativa da resposta analítica. Porém, ao serem avaliados os resultados para os outros parâmetros cromatográficos, verificou-se que a proporção de 50% de metanol na fase móvel conduz a uma boa separação cromatográfica, com tempo de corrida adequado.

Considerando-se os parâmetros cromatográficos analisados em cada condição estudada, a melhor condição para a separação e quantificação da desonida na amostra foi alcançada através da seguinte combinação de fatores: fase móvel composta por metanol:acetonitrila:água(50:10:40) com pH da água ajustado para 7,0 e fluxo de 1,0 mL/min, sendo estas as condições adotadas para a realização das análises por CLAE do gel creme de desonida.

## **4.2 Validação do método**

### **4.2.1 Identificação da amostra**

A Figura 2 ilustra os cromatogramas obtidos a partir da análise das soluções da desonida SQR, do gel creme (na concentração de 30 µg/mL) e dos conservantes da formulação.



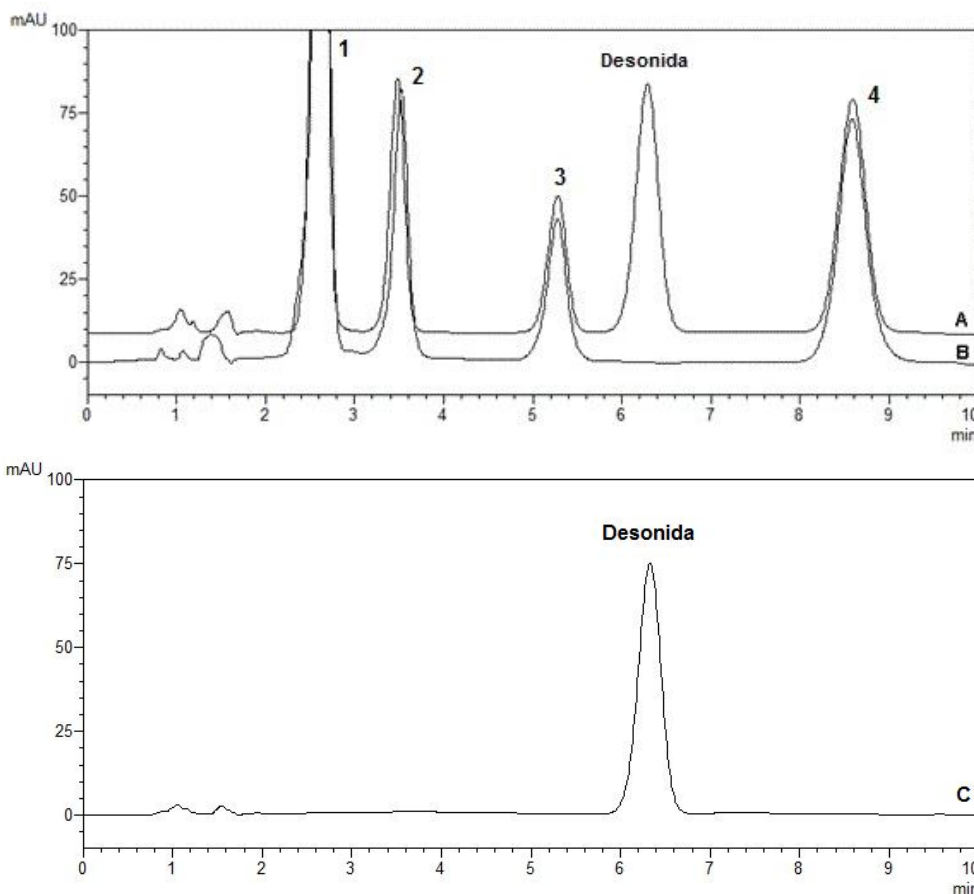


Figura 2 – Cromatogramas: da solução amostra (A), mistura dos conservantes (B) e da desonida SQR (C). Condições analíticas: coluna C18 (Luna Phenomenex®, 150 x 4,6 mm (5 µm, 100 Å), fase móvel metanol:acetonitrila:água pH 7,0 (50:10:40 (v/v/v), fluxo 1,00 mL/min, detecção 244 nm. Picos: Metilparabeno (1); etilparabeno (2); propilparabeno (3) e butilparabeno (4).

Através da análise dos cromatogramas, verificou-se que o pico de desonida na amostra apresenta o mesmo tempo de retenção da desonida SQR. Além disso, os conservantes presentes na formulação comercial apresentaram picos bem resolvidos em relação ao da desonida, mostrando, assim, a capacidade do método em determinar o fármaco na formulação. A identificação dos picos presentes na mistura comercial dos conservantes (Cheminol®) foi realizada através da injeção individual do metilparabeno e do propilparabeno, os quais apresentaram tempo de retenção de 2,3 e 5,3 minutos respectivamente. Os picos do etilparabeno e do butilparabeno foram inferidos através da relação existente entre a polaridade da

molécula e a ordem de eluição no cromatograma. Dessa forma, sugere-se que o etilparabeno seja o primeiro dos dois a eluir, por ser mais polar.

#### 4.2.2 Adequabilidade do sistema

O teste de adequabilidade do sistema foi realizado pela repetição de seis injeções da solução de desonida SQR (seção 3.4.1), na concentração de 30 µg/mL. De acordo com a FDA (1994), o fator de capacidade (k) deve ser superior a 2, a assimetria inferior a 2 e número de pratos teóricos superior a 2000. Estes parâmetros foram calculados utilizando o *software Shimadzu LabSolutions*. O tempo de retenção observado foi de 6,3 min; pratos teóricos superior a 2800; fator de capacidade superior a 2,2 e assimetria cerca de 0,96. Dessa forma, todos os parâmetros estão em conformidade com as recomendações da FDA (1994).

#### 4.2.3 Especificidade

A especificidade do método indica a capacidade de medir com exatidão a resposta do analito na presença de componentes da amostra potencialmente interferentes ou produtos de degradação.

O cromatograma ilustrado na Figura 3 mostra que, após o estudo de degradação forçada, picos adicionais foram observados apenas na condição de hidrólise básica, em que a desonida se mostrou mais suscetível, alcançando um teor residual de 30% em apenas 10 minutos de contato (Tabela 1). Porém, foi possível verificar, através do detector de DAD, que mesmo na presença desse pico adicional, o pico de desonida apresentou-se puro e bem resolvido, indicando uma adequada separação através da metodologia proposta, o que confirma a especificidade do método.

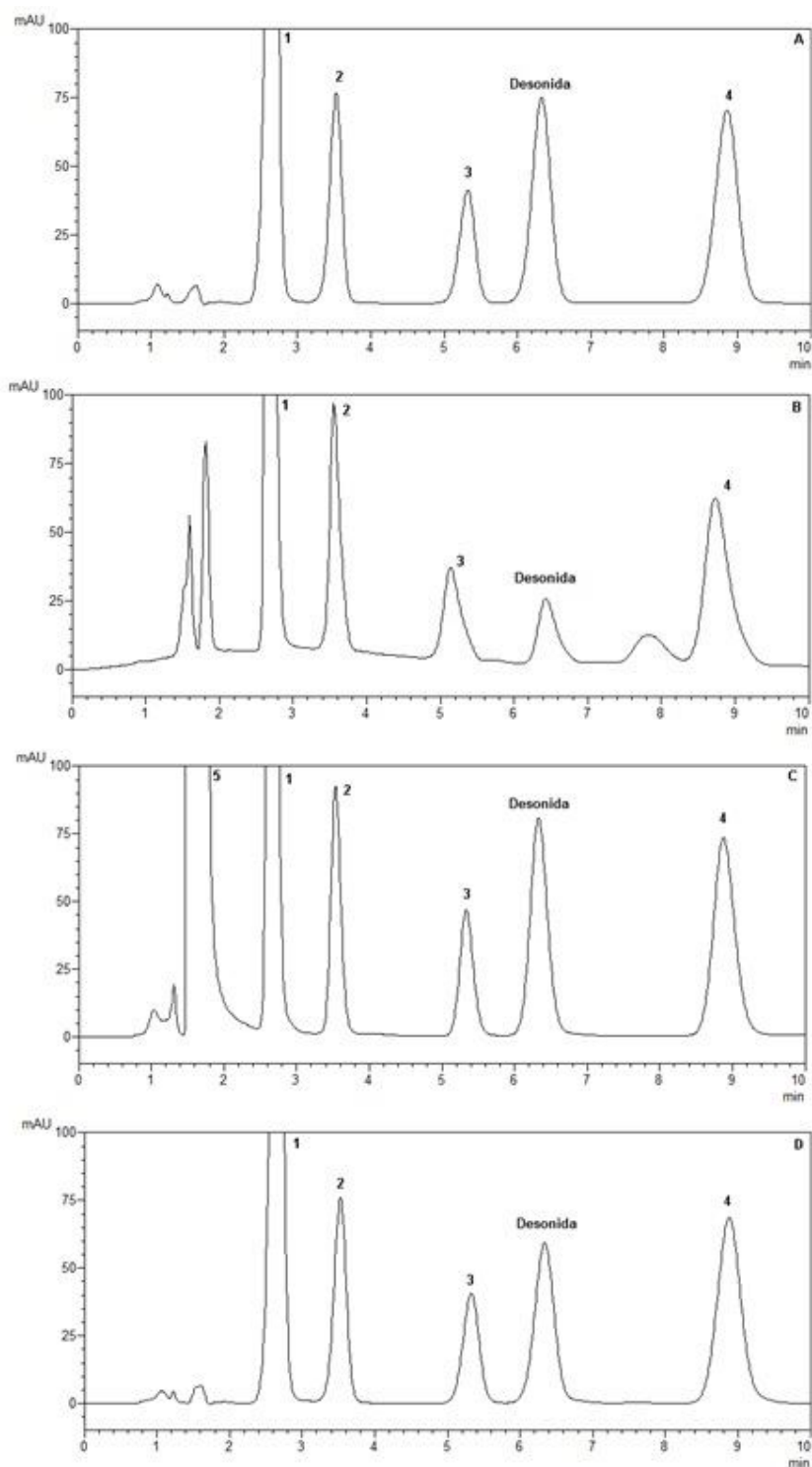


Figura 3 - Cromatogramas do gel creme de desonida. Hidrólise ácida (A) – HCl 1M/6h (correspondente ao mesmo cromatograma da amostra íntegra); hidrólise básica (B) – NaOH 1 M/10 min; oxidação (C) – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%/24 h e radiação UVA (D) – 5 h. Picos: Metilparabeno (1); etilparabeno (2); propilparabeno (3); butilparabeno (4) e peróxido de hidrogênio (5).

Tabela 1 - Teores percentuais de desonida na solução amostra do gel creme sob estudo de degradação forçada

<b>Condição</b>	<b>Teor de desonida (% ± DPR)<sup>a</sup></b>	<b>Índice de pureza do pico<sup>a</sup></b>
HCl 1 M (6 h)	99,45 ± 0,13	0,9999
NaOH 1 M (10 min)	30,13 ± 0,89	0,9999
70 °C (24 h)	100,28 ± 1,38	0,9999
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (24 h)	94,54 ± 0,51	0,9999
Radiação UVA (352 nm, 5 h)	82,74 ± 1,35	0,9999

<sup>a</sup> n=2 por condição.

#### 4.2.4 Linearidade

A curva analítica (concentração *versus* área absoluta do pico) representada na Figura 4 apresenta a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) obtidos. O coeficiente de correlação mostrou-se superior a 0,99 indicando uma adequada correlação entre a concentração de desonida e a área do pico. A validade do ensaio foi verificada por meio da análise de variância (ANOVA), que mostrou haver regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo, em nível de confiança de 95%, nas condições e faixas de concentração avaliadas (Tabela 2).

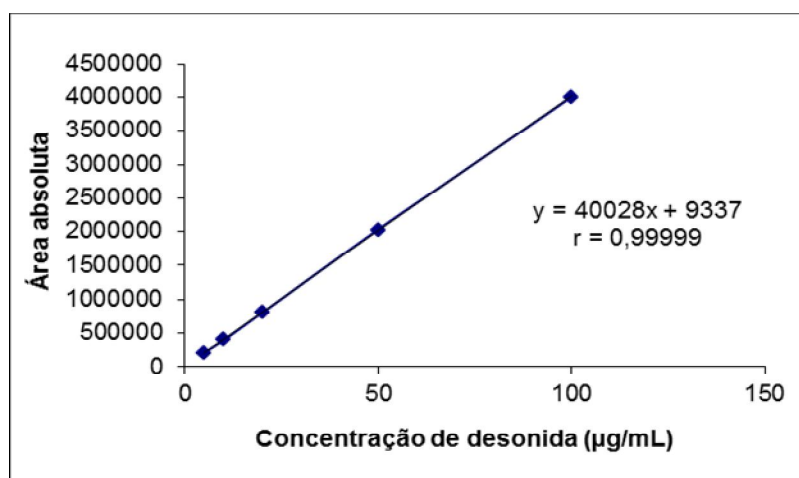


Figura 4 – Representação da curva analítica média e equação da reta pelo método por CLAE da desonida, na faixa de 5 a 100 µg/mL.

Tabela 2 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva analítica de desonida por CLAE

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	$2,97063 \cdot 10^{13}$	$7,42657 \cdot 10^{12}$	21227,1612	3,48*
Regressão linear	1	$2,97051 \cdot 10^{13}$	$2,97051 \cdot 10^{13}$	84905,3728	4,96*
Desvio de linearidade	3	$1,14 \cdot 10^9$	381585728,2	1,0907	3,71
DENTRO (resíduo)	10	3498616901	349861690,1		
Total	14	$2,97098 \cdot 10^{13}$			

\* significativo para  $p < 0,05$ .

Dessa forma, os dados obtidos indicaram que o método é linear na faixa de concentração de 5 a 100 µg/mL.

#### 4.2.5 Precisão

Os valores de DPR observados nos ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária foram inferiores a 2%, confirmando que o método é suficientemente preciso (ICH, 2005) (Tabela 3).

Tabela 3 - Ensaio de repetibilidade e precisão intermediária do método de CLAE para doseamento da desonida gel creme.

	<b>Teor (%)</b>			<b>Teor médio intra-dia (%)</b>	<b>DPR</b>
Dia 1	94,73	98,22	97,65	96,33	1,59
	96,95	95,93	94,50		
Dia 2	96,53	96,33	96,83	95,56	1,20
	94,11	94,52	95,04		
<b>Teor médio entre-dias (%)</b>					95,83
				<b>DPR</b>	1,03

#### 4.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através da recuperação da SQR, em triplicata, em três níveis de concentração: de 70 a 130% da concentração nominal do método (30 µg/mL), adicionada no início do procedimento.

Foram determinadas as médias das recuperações, expressas em termos de percentagem de recuperação e do DPR. Como mostrado na Tabela 4, os percentuais médios de recuperação para cada concentração foram: 100,01; 100,66 e 99,50 para as concentrações de 20, 30 e 40 µg/mL, respectivamente, indicando a adequação do método desenvolvido para a quantificação da desonida na amostra de gel creme.

Tabela 4 - Percentual de recuperação da SQR de desonida adicionada ao gel creme comercial de desonida inicialmente pesado

	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada	Recuperada		
R <sub>1</sub>	5,00	5,05	101,08	100,01
		4,97	99,53	
		4,97	99,43	
R <sub>2</sub>	15,00	15,07	100,50	100,66
		14,97	99,84	
		15,24	101,65	
R <sub>3</sub>	25,00	24,40	97,60	99,50
		24,92	99,68	
		25,30	101,23	
			<b>Recuperação média (%)</b>	100,39
			<b>DPR</b>	1,23

#### 4.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da introdução de pequenas alterações no processo analítico, seguido da análise do efeito sobre o teor da amostra quantificada.

Para isto, a proporção de metanol na fase móvel ( $50 \pm 5,0 \%$ ), o pH da água na fase móvel ( $7,0 \pm 0,5$ ) e fluxo ( $1,0 \pm 0,1 \text{ mL/min}$ ) foram alterados simultaneamente, utilizando um planejamento fatorial completo de  $2^3$ , em duplicata e com três pontos centrais (19 ensaios), realizados em ordem aleatória.

Para efetuar essa série de experimentos planejados foram utilizadas soluções amostra do gel creme de desonida na concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$ . Na Tabela 5, as combinações de fatores e seus níveis são mostrados juntamente com os resultados de cada análise.

Tabela 5 - Projeto fatorial e resultados da análise da robustez do método analítico para desonida por CLAE

Experimento	Metanol (% v/v)	pH	Fluxo (mL/min)	Teor (%)
1	45	7,5	0,9	97,11
2	55	7,5	1,1	99,24
3	45	6,5	0,9	98,98
4	55	6,5	1,1	99,25
5	45	7,5	0,9	97,41
6	55	6,5	0,9	99,11
7	45	6,5	0,9	97,19
8	45	6,5	1,1	96,60
9	50	7,0	1,0	99,85
10	55	7,5	0,9	98,40
11	45	6,5	1,1	99,83
12	50	7,0	1,0	100,81
13	55	6,5	0,9	100,30
14	45	7,5	1,1	99,01
15	55	7,5	0,9	99,81
16	55	6,5	1,1	98,75
17	45	7,5	1,1	99,86
18	50	7,0	1,0	98,68
19	55	7,5	1,1	98,16

Após calcular os efeitos de cada parâmetro, através do *software* de estatística MINITAB® 15, a avaliação estatística, por meio da ANOVA, indica se há evidências de efeito significativo no resultado analítico pela modificação dos parâmetros do método. A Figura 5 (gráfico de Pareto) ilustra os efeitos dos fatores entre os dois níveis, indicando que não há efeito significativo entre eles.



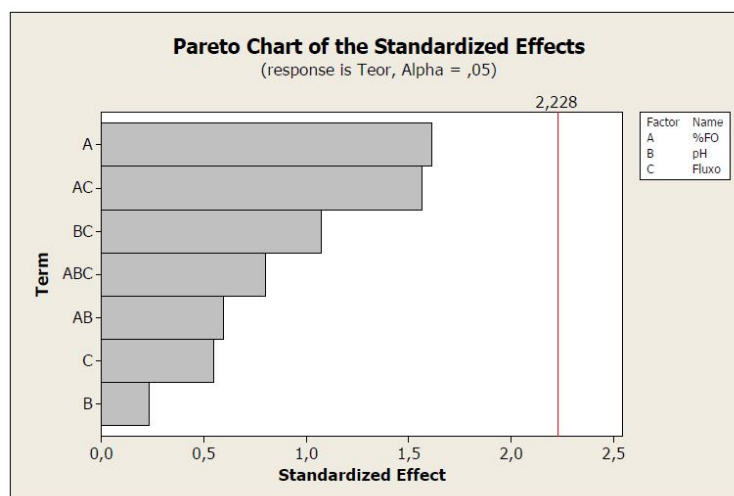


Figura 5 – Gráfico de Pareto para as variações de fatores avaliadas na robustez da metodologia por CLAE para desonida.

O gráfico de Pareto é a plotagem dos valores obtidos para os efeitos da variação de cada fator, apresentando o efeito crítico numa linha vertical, de forma que se possa visualizar qual fator apresenta um efeito significativo (DEJAEGER; HEYDEN, 2008).

Pode-se observar que o maior efeito observado é o relativo à mudança no percentual de fase orgânica na fase móvel. Entretanto, nenhum efeito é maior do que o efeito crítico, em nível de confiança de 95%, ou seja, o efeito dos fatores não é significativo. Além disso, não foram visualizadas alterações relevantes no padrão cromatográfico quando foram feitas modificações nas condições experimentais, ou seja, o número de pratos teóricos, a assimetria e a resolução do pico da desonida sofreram alterações que não ultrapassaram os valores recomendados.

Tais resultados mostram que o método cromatográfico proposto para o doseamento da desonida em gel creme é robusto, uma vez que a robustez do método é definida como a medida da sua capacidade em permanecer inalterado sob pequenas alterações nas condições analíticas (HEYDEN et al., 2001; ICH 2005).

Cabe salientar ainda que essa estratégia estatística permite a avaliação do estudo da variação na metodologia analítica com uma melhor qualidade, uma vez em que são avaliadas várias alterações simultaneamente, condição que ocorre mais comumente na rotina de um laboratório de controle de qualidade.

### 4.3 Estudo de fotoestabilidade do gel creme de desonida

Alíquotas do gel creme foram dispostas em placas de petri, seguidas de exposição à radiação UVA por até 48 horas. Ao longo desse período, porções foram removidas e o teor residual quantificado pelo método de CLAE desenvolvido e validado.

Para cada tempo de exposição foram utilizadas três amostras independentes, sendo que o teor obtido representa uma média de três determinações para cada uma das três amostras.

Ainda, com a finalidade de avaliar a interferência do calor no interior da câmara, também foram avaliadas amostras do gel creme protegidas da luz através do revestimento com papel *craft* (denominadas de controle escuro – CE), sendo preparadas e quantificadas da mesma forma, frente à amostra não submetida à radiação. Os resultados estão demonstrados na Tabela 6 e ilustrados nos cromatogramas da Figura 6.

Tabela 6 - Resultados do teor residual de desonida no gel creme após fotodegradação (UVA, 352 nm)

<b>Tempo (h)</b>	<b>Teor residual de desonida (<math>\mu\text{g/mL}</math>)*</b>	<b>Teor residual de desonida (%)*</b>	<b>DPR</b>
0	28,98	96,60	0,51
2	27,94	93,12	1,79
6	24,01	80,04	1,94
10	22,37	74,57	1,30
15	20,67	68,89	0,22
24	15,74	52,45	1,89
36	12,50	41,67	0,94
48	6,76	22,53	4,82
48 (CE)	30,29	100,98	1,76

\* média de três determinações.

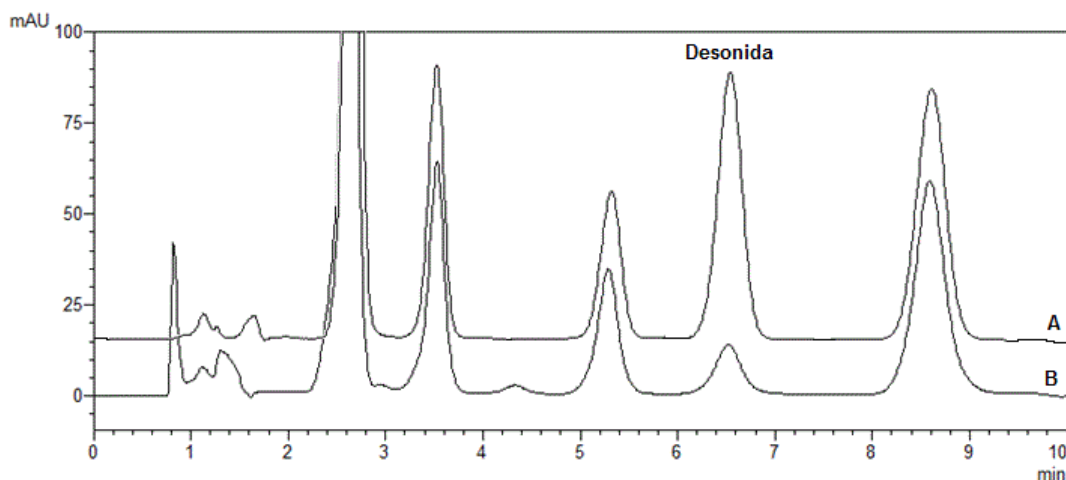


Figura 6 - Cromatogramas da fotodegradação do gel creme de desonida: (A) no tempo zero, e (B) após 48 horas de exposição em UVA (352 nm). Condições analíticas: coluna C18 (Luna Phenomenex®, 150 x 4,6 mm (5  $\mu$ m, 100 Å), fase móvel metanol:acetonitrila:água pH 7,0 (50:10:40 (v/v/v), fluxo 1,00 mL/min, detecção 244 nm.

Através da correlação entre as variáveis *concentração* e *tempo* foi possível determinar a ordem de reação da degradação de desonida na formulação após a exposição à radiação. Cabe salientar que, para determinar a cinética de reação, os ensaios devem ser conduzidos até um estágio avançado de degradação (cerca de 50%), pois do contrário, os valores obtidos podem ser pouco precisos e geralmente superiores aos valores reais (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001).

Com objetivo de determinar a ordem de reação, foram plotados os seguintes gráficos:

- A. Ordem zero: concentração ( $\mu$ g/mL) x tempo de exposição à radiação UV;
- B. Primeira ordem: logaritmo da concentração ( $\mu$ g/mL) x tempo de exposição à radiação UV;
- C. Segunda ordem: 1/concentração ( $\mu$ g/mL) x tempo de exposição à radiação UV.

A partir dos gráficos, foram obtidos os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) para cada caso, observando que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem de reação (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001). O gráfico obtido com a melhor correlação linear está apresentado na Figura 7.

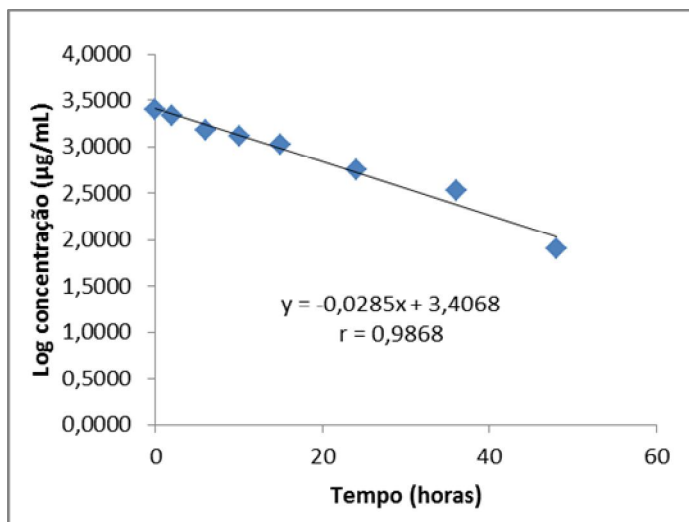


Figura 7 - Representação gráfica da cinética de primeira ordem de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada da amostra de desonida gel creme em câmara de luz UV de 352 nm.

Pela avaliação dos resultados ilustrados na Figura 7, sugere-se que a degradação da desonida nas condições testadas obedeceu à cinética de primeira ordem, tendo em vista o melhor coeficiente de correlação apresentado nessa condição ( $r = 0,9868$ ).

A constante de velocidade de reação ( $k$ ), nesse caso, pode ser obtida através da inclinação da reta ou pela seguinte relação:

$$k = 2,303/t \times \log C_0/C$$

Considerando o coeficiente angular, observou-se que a taxa de degradação da desonida no gel creme é de aproximadamente  $0,0285 \mu\text{g/mL/h}$ , isto é, a cada hora de exposição à radiação UVA (352 nm) o teor residual de desonida na amostra decresce aproximadamente 2,85% (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001).

O tempo necessário para que 10% do fármaco seja degradado na amostra, também conhecido por período de vida útil ou  $t_{90\%}$ , é um parâmetro muito importante, pois representa o limite aceitável para o teor de substância ativa na

maioria dos medicamentos, sendo utilizado para determinar o tempo de prateleira, ou seja, o prazo de validade.

Para reações de primeira ordem, o  $t_{90\%}$  pode ser estipulado através da seguinte relação:

$$\begin{aligned}t_{90\%} &= 0,104/k \\t_{90\%} &= 0,104/0,0285 \\t_{90\%} &= 3,65\end{aligned}$$

O valor de  $t_{90\%}$  indica que, nas condições experimentais, em cerca de 3,6 horas, o teor de desonida na amostra será de 90%. Adicionalmente, os resultados observados para o controle escuro indicaram que a degradação sofrida pela desonida na formulação foi somente devido à luz, sem influência da temperatura atingida no interior da câmara (35 °C).

O ensaio conduzido nesse estudo levou em consideração somente a radiação UVA, porém o sol emite radiações ainda mais energéticas, as quais possivelmente são capazes de degradar a desonida em maior extensão.

O conhecimento da interação fármaco-radiação luminosa é um pré-requisito necessário para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos estáveis e seguros, pois a fotodegradação pode levar a outros problemas, como a formação de subprodutos durante o tempo de armazenagem que podem causar efeitos adversos ao paciente. Dessa forma, os estudos de fotoestabilidade podem fornecer informações relacionadas ao uso prático do produto, sendo úteis para aconselhar o paciente a evitar a exposição solar direta sobre o local onde o medicamento foi administrado, a fim de minimizar possíveis efeitos colaterais causados pela interação do fármaco com a pele sob exposição aos raios UV (TØNNESEN, 2001).

## 5 CONCLUSÃO

Através da utilização do delineamento experimental foi possível chegar às condições de separação ótimas para a determinação de desonida na formulação de gel creme, a partir de um número relativamente pequeno de experimentos. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que o método por CLAE foi adequadamente otimizado e validado e preencheu todos os requisitos estabelecidos em normas nacionais e internacionais. O mesmo consiste em método simples e capaz de separar o fármaco de seus excipientes e possíveis produtos de degradação, tornando-o um método indicativo de estabilidade e contribuindo assim para a melhoria do controle de qualidade.

Através do estudo de fotoestabilidade, foi possível determinar que a desonida na formulação gel creme, quando exposta à radiação UVA, sofre degradação que obedece à cinética de reação de primeira ordem, com  $t_{90\%}$  de cerca de 3,6 horas.

Os resultados obtidos no estudo de fotoestabilidade indicam a importância do desenvolvimento analítico para produtos não contemplados em códigos oficiais, de modo a possibilitar ações de farmacovigilância em produtos sob comercialização.

## 6 REFERÊNCIAS

ACEVSKA, J. et al. Chemometric approach for development, optimization and validation of different chromatographic methods for separation of opium alkaloids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 1117-1129, 2012.

ARAGÃO, N. M. et al. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 67, p. 1007-1013, 2005.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BONFILIO, R. et al. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. **Talanta**, v. 80, p. 236-241, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2003.

CELA, R.; ORDOÑEZ, E. Y.; QUINTANA, J. B.; RODIL, R. Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, (article in press), 2012.

DEJAEGER, B.; HEYDEN, Y. V. Screening Designs (Part 2) Data Analysis, **LCGC Europe**, v. 21(2), 2008.

FDA - United States Food and Drug Administration (US-FDA). Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, J. B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.

GELBARD, C. M; HERBERT, A. A. Desonide hydrogel: advances in vehicle technology. **Expert Review of Dermatology**. v. 4, n.1, p. 23-27, 2009.

HEYDEN, Y. V. et. al. Guidance for robustness:ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723–753, 2001.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1B: **Photostability testing of new drug substances and products**, 1996.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2(R1): **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 2005.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química**. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

MAMANI, M. C. V. et al. Use of experimental design and effective mobility calculations to develop a method for the determination of antimicrobials by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 76, p. 1006-1014, 2008.

MEDENICA, M. et al. Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity. **Journal of Chromatography A**, v. 1031, p. 243-248, 2004.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**, New York: Wiley, 2000.

MOORE, D. E. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions. In: TØNNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. London: Taylor & Francis, 2004.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita, 2009.

SIOUFFI, A. M.; PHAN-TAN-LUU, R. Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 75–106, 2000.



TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

**USP 35.** The United States Pharmacopeia, 35<sup>rd</sup>. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

## 4 DISCUSSÃO GERAL

Métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, ensaios de dissolução, estudos de estabilidade e análise de fármacos em matérias-primas, produtos farmacêuticos e matrizes biológicas. Nesse contexto, observou-se que a desonida vem sendo comercializada há quase quatro décadas no mercado mundial e até agora poucas publicações voltadas à sua quantificação em suas mais variadas apresentações foram relatadas. Adicionalmente, não são apresentadas monografias farmacopeicas para a quantificação da desonida como matéria-prima ou em formulações.

Além dos diversos parâmetros a serem avaliados durante o desenvolvimento e validação de um método analítico, também devem ser avaliadas características globais do método, como a praticidade e a simplicidade de execução, tempo necessário para o preparo das amostras e para a realização das análises, custos com materiais e solventes, além da disponibilidade dos equipamentos necessários para a análise pretendida.

O conjunto desses fatores e as características do fármaco conduziram ao emprego de duas metodologias de quantificação: a CLAE e a espectrofotometria derivada (UVD). A primeira por se tratar do método analítico indicador de estabilidade mais amplamente empregado, uma vez que apresenta alta capacidade de resolução, sensibilidade e especificidade se comparado aos métodos convencionais de análise (BAKSHI; SINGH, 2002); e a segunda por ser uma técnica analítica confiável e reprodutível, observando-se vantagens em relação à espectrofotometria convencional, como maior sensibilidade e seletividade em amostras onde ocorre interferência entre seus constituintes (OJEDA; ROJAS, 2004), como é o caso das formulações avaliadas, cujos conservantes absorvem em comprimentos de onda próximos ao da desonida.

Entretanto, no decorrer do trabalho, constatou-se que não seria possível utilizar o método de espectrofotometria UVD, pois a concentração dos conservantes nas formulações é muito maior do que a concentração de desonida, impossibilitando encontrar uma ordem de derivatização que viabilizasse a quantificação da desonida, sem a interferência dos excipientes. Vale salientar que a formulação de loção

cremosa apresenta dois conservantes (metilparabeno e propilparabeno) e o gel creme, quatro conservantes (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabeno), os quais absorvem no comprimento de onda de 250 nm, que é muito próximo ao comprimento de onda de máxima de absorção da desonida (244 nm).

Dessa forma, as análises foram conduzidas somente por CLAE. Por esse método, foi possível identificar e quantificar a desonida em meio aos excipientes presentes nas formulações e aos produtos de degradação formados nos estudos de degradação forçada. O emprego do DAD possibilitou a determinação da pureza dos picos cromatográficos, sendo que em todas as condições de degradação, os picos referentes à desonida atenderam ao requisito de pureza adotado.

Dessa forma, os métodos desenvolvidos e validados nesse trabalho para a determinação de desonida em loção cremosa e gel creme mostraram-se específicos, característica que permitiu classificá-los como métodos indicativos de estabilidade.

No decorrer do estudo, utilizaram-se ferramentas quimiométricas e aplicou-se o planejamento experimental na avaliação da robustez do método proposto para a loção cremosa. No caso do método aplicado ao gel creme, o planejamento experimental foi adotado na fase de otimização e também no estudo da robustez.

O planejamento experimental vem sendo cada vez mais utilizado para obtenção de melhores resultados em um menor tempo e com menores custos, pois através de seu emprego é possível avaliar a interação de diversos fatores simultaneamente sobre respostas analíticas, sendo extremamente útil na avaliação da interferência de algum parâmetro específico e, ainda, na obtenção de condições ideais de análise.

Após a validação dos métodos para cada formulação, realizou-se o estudo de fotoestabilidade das mesmas, o qual foi motivado por meio de relatos obtidos na literatura, que reportam a fotoinstabilidade dos corticoides (LACHMAN; DELUCA; AKERS, 2001), mais especificamente da desonida (IQBAL; HUSAIN; GUPTA, 2006).

Esta informação foi comprovada através de trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, cujos resultados indicaram a instabilidade frente à radiação UVA (352 nm) da desonida matéria-prima e na forma de solução capilar.

A seguir, serão discutidos separadamente a validação dos métodos analíticos e o estudo de fotoestabilidade realizados para cada formulação. A Tabela

1 apresenta de maneira sucinta uma comparação dos métodos e estudo de fotoestabilidade para as formulações estudadas.

Desenvolveu-se e validou-se procedimento por CLAE em fase reversa para determinação da desonida em loção cremosa, conforme descrito no **CAPÍTULO 2**. O método proposto empregou coluna cromatográfica C<sub>18</sub>, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade. A fase móvel constituída por metanol, acetonitrila e água pH 5,0, ajustado com ácido fosfórico a 18% (v/v), mostrou-se adequada para a separação e a quantificação da desonida na amostra comercial, proporcionando tempo de retenção de 7,3 minutos para a desonida, e parâmetros cromatográficos adequados.

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas de soluções da amostra comercial e de uma amostra placebo, onde foi possível avaliar que os excipientes da formulação não interferem na quantificação da desonida na amostra empregada. Realizou-se, também, o estudo de degradação forçada, empregando-se condições ácidas, alcalinas, meio oxidativo, temperatura elevada e radiação UVA. Apesar de ter ocorrido redução no teor residual de desonida na maioria das condições, não foram observados a formação de picos adicionais. Os índices de pureza elevados, acima de 0,9999, confirmaram a especificidade do método.

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 10 a 100 µg/mL ( $r = 0,99994$ ). A análise de variância, realizada com os resultados obtidos através das curvas analíticas, mostrou regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade, em nível de confiança de 95%.

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. O teor médio obtido na determinação da desonida em loção cremosa na repetibilidade foi de 103,43%, com valor de DPR de 1,40% ( $n = 6$ ), e na precisão intermediária o teor médio foi de 102,43% ( $n = 12$ ), com DPR de 1,59%. Os baixos valores de DPR indicaram a precisão do método proposto.

A exatidão foi determinada através da adição de solução de desonida SQR ao placebo, preparado em laboratório. A recuperação média de 100,09% indicou a adequabilidade do método.

Para o estudo da robustez foi utilizado um delineamento fatorial completo ( $2^4$ ), tendo sido avaliada a influência de variações no pH, na proporção de

acetonitrila na fase móvel, no fluxo e na marca comercial da coluna cromatográfica. No entanto, após avaliação estatística, nenhuma das modificações propostas interferiu na quantificação da desonida, nem mesmo provocou alterações relevantes nos parâmetros cromatográficos avaliados. Assim, o método desenvolvido mostrou-se robusto.

Através da avaliação de cada parâmetro preconizado pela literatura, foi possível concluir que a metodologia proposta pode ser empregada para o controle de qualidade da desonida na formulação de loção cremosa, bem como para estudos de estabilidade.

Em seguida, foi conduzido o estudo de fotoestabilidade da formulação, realizado através da exposição da amostra à radiação UVA (352 nm), por até 24 horas. Através da redução no teor residual de desonida foi possível observar a grande fotoinstabilidade da formulação, a qual teve seu teor reduzido pela metade após 15 horas de exposição.

Relacionando o decréscimo na concentração de desonida na loção cremosa ao longo do tempo, determinou-se que sua degradação nas condições empregadas, segue cinética de segunda ordem, uma vez que existe uma relação linear entre o inverso da concentração residual *versus* o tempo ( $r = 0,9973$ ). A partir destes dados, obteve-se o  $t_{90\%} = 1,58$  horas.

Os resultados obtidos no estudo de fotoestabilidade demonstraram que a loção cremosa de desonida é bastante instável quando exposta aos raios UVA. Sendo assim, para que o efeito terapêutico seja atingido, a aplicação deve ser acompanhada de proteção à exposição solar, considerando a posologia recomendada.

De maneira similar à amostra de loção cremosa, desenvolveu-se e validou-se procedimento por CLAE em fase reversa para determinação da desonida em gel creme, conforme descrito no **CAPÍTULO 3**. O método proposto valeu-se de um planejamento experimental inicial para determinação das melhores condições cromatográficas a serem utilizadas na quantificação da desonida na amostra em questão.

Através de uso do DCCR avaliou-se a influência de três fatores na determinação da desonida em gel creme. Assim, por meio de um fatorial completo ( $2^3$ ) foi possível avaliar os efeitos do pH, proporção de metanol e fluxo da fase

móvel, simultaneamente. Como a amostra de gel creme possui vários excipientes que podem interferir na quantificação da desonida, a principal resposta avaliada foi a resolução do pico da desonida.

Após a avaliação da superfície de resposta obtida, chegou-se à conclusão sobre as condições cromatográficas a serem utilizadas na validação do método: fase móvel composta por metanol, acetonitrila e água com pH 7,0, na proporção de 50:10:40, fluxo de 1,0 mL/min e coluna C<sub>18</sub>. Nessas condições, o pico da desonida mostrou-se bem resolvido em relação aos demais, apresentando tempo de retenção de 6,3 minutos, boa simetria e número de pratos teóricos elevados.

A especificidade do método proposto foi avaliada através do estudo de degradação forçada, submetendo a formulação aos meios ácido, alcalino, oxidante, além de temperatura elevada e radiação UVA. Observou-se a formação de picos adicionais em algumas condições, porém, através do DAD, verificou-se que o pico de desonida permaneceu puro e bem resolvido, demonstrando que o método além de ser específico é, também, indicativo de estabilidade.

A metodologia sugerida mostrou-se linear na faixa de concentração de 5 a 100 µg/mL ( $r = 0,9999$ ). A análise estatística, realizada por ANOVA, indicou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e desvio de linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ).

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (entre dias). O teor médio de desonida no gel creme, no estudo da repetibilidade foi de 96,33%, com valor de DPR de 1,59% ( $n = 6$ ). Na precisão intermediária o teor médio foi de 95,83% ( $n = 12$ ), com DPR de 1,03%. Como os DPR obtidos foram inferiores a 2,0%, concluiu-se que o método proposto foi preciso.

Através da avaliação da exatidão do método, por meio do teste de recuperação da solução de desonida SQR adicionada às formulações, obteve-se teor médio de recuperação de 100,06%. Esse resultado demonstrou a exatidão do método, indicando a adequação das condições analíticas, no que tange à recuperação do fármaco a partir da formulação.

Para o parâmetro robustez, realizou-se outro planejamento experimental, dessa vez com alterações mais suaves nos fatores avaliados. Avaliaram-se, novamente, alterações no pH, na proporção de metanol e no fluxo da fase móvel.

Através do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ), tendo como resposta principal o teor de desonida na amostra, chegou-se à conclusão de que o método proposto foi robusto, uma vez que, após a avaliação estatística, não houve evidências de alterações significativas na determinação da desonida.

Assim, após o cumprimento de cada parâmetro recomendado pela literatura para a validação de metodologia analítica, concluiu-se que o método proposto pode ser utilizado no controle de qualidade do gel creme de desonida, sendo, também, indicativo de estabilidade.

Após a validação da metodologia analítica, foram conduzidos os estudos de fotoestabilidade para o gel creme, pela exposição de alíquotas de gel creme à radiação UVA (352 nm), por 48 horas. Observou-se redução no teor de desonida ao longo do tempo, sendo que em pouco mais de 24 horas de exposição, obteve-se um decréscimo de 50% em seu teor. Logo, através do estudo da cinética de reação, concluiu-se que o gel creme de desonida, sob exposição à radiação UVA, segue uma cinética de degradação de primeira ordem, onde se observa uma relação linear entre o logaritmo da concentração residual *versus* o tempo ( $r = 0,9868$ ). O  $t_{90\%}$  obtido foi de 3,65 horas, indicando a fotoinstabilidade da formulação.

Os medicamentos são utilizados terapeuticamente com base em sua eficácia e segurança. Desta forma, devem ser estáveis e manter sua qualidade até o momento do uso ou então até o término do seu prazo de validade. Essa qualidade deve ser mantida sob as mais diversas condições em que um produto farmacêutico deve enfrentar. Portanto, é fundamental entender os fatores que alteram a estabilidade de produtos farmacêuticos e identificar formas de garantir sua estabilidade (YOSHIOKA, STELLA, 2002).

Tabela 1 - Comparação dos métodos de análise por CLAE e estudo de fotoestabilidade das duas formulações de desonida estudadas

	<b>Loção cremosa</b>	<b>Gel creme</b>
<b>Validação (CLAE)</b>		
Fase móvel	MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O pH 5,0	MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O pH 7,0
Proporção da fase móvel (v/v/v)	(50:10:40)	(50:10:40)
Fluxo	1,20 mL/min	1,00 mL/min
Tempo de retenção do pico de desonida	7,3 min	6,3 min
Faixa de linearidade	10 a 100 µg/mL	5 a 100 µg/mL
Teor médio de desonida (precisão)	102,93%	95,83%
Recuperação média (exatidão)	100,09%	100,06%
Avaliação da robustez do método	Planejamento fatorial completo (2 <sup>4</sup> )	Planejamento fatorial completo (2 <sup>3</sup> )
<b>Fotoestabilidade (UVA – 352 nm)</b>		
t <sub>50%</sub>	15 h	24 h
Cinética de reação	segunda ordem	primeira ordem
t <sub>90%</sub>	1,58 h	3,65 h

Ambas as amostras estudadas apresentaram-se instáveis após exposição à radiação UVA (352 nm). Considerando que as análises para as duas amostras foram conduzidas nas mesmas condições (quantidade de produto, modo de exposição e de irradiação), é possível inferir que a loção cremosa é a formulação que degrada mais rapidamente, uma vez que seu teor residual decresce em 10% após 1,58 h de exposição à radiação, enquanto que no gel creme isso ocorre em cerca de 3,65 h. Vale lembrar que, esse tempo de exposição representa o t<sub>90%</sub> de cada formulação, sendo esse um parâmetro utilizado para a determinação do prazo de validade.

Frente aos resultados obtidos, seria imprescindível constar na bula de ambos os produtos recomendações para uso noturno ou determinando a proteção solar da região na qual os produtos são aplicados, considerando que não há dados acerca da segurança biológica da desonida após exposição à radiação e que a degradação de fármacos pode alterar os efeitos farmacológicos, resultando em modificações na eficácia e na toxicidade. Condutas semelhantes são adotadas para



formulações tópicas de isotretinoína (YOSHIOKA, STELLA, 2002; TØNNESEN, 2004b).

TØNNESEN (2004b) indica várias alternativas para proteger um fármaco da degradação provocada pela luz, tais como a utilização de embalagens opacas (que bloqueiem totalmente a entrada da luz) ou embalagens que filtrem determinados comprimentos de onda, o emprego de excipientes que apresentem um espectro de absorção semelhante ao do fármaco (chamado de princípio da sobreposição espectral) ou que sejam capazes de espalhar a radiação incidente e, ainda, o uso de antioxidantes na formulação.

Outra abordagem para proteção de fármacos fotoinstáveis é a sua associação a sistemas nanoestruturados. OURIQUE e colaboradores (2008) demonstraram tal efeito, após a obtenção de nanocápsulas de tretinoína, onde estas foram capazes de melhorar a fotoestabilidade do fármaco. A fotoestabilidade de sistemas nanoestruturados pode ser atribuída à capacidade do polímero, utilizado na obtenção das nanocápsulas, em refletir e dispersar a radiação UV (JIMENEZ et al., 2004). Ainda, também, foi relatada uma maior fotoestabilidade desse fármaco quando atribuído a outros sistemas nanoestruturados, tais como niossomas (MANCONI et al., 2003), lipossomas (IOELE et al., 2005), e complexos com ciclodextrinas (LIN et al., 2000).

Considerando que a concentração de desonida nas formulações avaliadas é a mesma e que foram adotadas condições de exposição iguais para ambas as formulações, a menor velocidade de degradação evidenciada no gel creme de desonida pode estar relacionada ao fato deste possuir um número maior de conservantes em sua formulação, quando comparado à loção cremosa. Uma vez que os parabenos apresentam seu máximo de absorção em 250 nm, região muito próxima à absorção da desonida (244 nm), estes conservantes podem estar protegendo o princípio ativo na formulação.

Outro fator pode ser a viscosidade, a qual é diferente em ambas as formulações estudadas e que é capaz de afetar as características de absorção da radiação pelo produto. Em uma formulação mais viscosa, como é o caso do gel creme (quando comparado à loção cremosa) a radiação tende a atingir apenas as moléculas mais superficiais, protegendo, dessa forma, as demais moléculas da fotodegradação (TØNNESEN, 2001).

Thoma e Kübler (1998) relataram a fotoinstabilidade da natamicina e da nistatina em preparações tópicas, as quais apresentaram alta decomposição, após aplicação do produto na pele com uma camada de 1 mm de espessura, seguida de exposição à radiação emitida por lâmpada de xenônio, com exclusão de comprimentos de onda inferiores a 290 nm. Das três pomadas de nistatina testadas, duas tiveram seu teor inicial reduzido em 13%, após 60 minutos de irradiação, e a terceira apresentou um decréscimo de 3% nesse mesmo intervalo de tempo. Os autores atribuíram a fotoestabilidade da terceira pomada à presença de óxido de zinco na formulação, o qual tem propriedades de reflexão da luz, sendo então um agente fotoprotetor da preparação. No caso da natamicina, após 30 minutos de exposição, o teor residual de fármaco foi de cerca de 50%.

A partir desses resultados, Thoma e Kübler (1998) sugeriram que deveriam ser feitas alterações nas monografias farmacopeicas para essas substâncias, no que tange à fotoproteção durante o manuseio analítico, uma vez que demonstram uma fotodegradação semelhante à apresentada pelo nifedipino, a qual sua fotossensibilidade é bastante conhecida; essas alterações seriam relacionadas à fotoproteção durante o manuseio analítico. Ainda, sugerem um alerta quanto à aplicação tópica dessas formulações, em partes descobertas do corpo, e, também, a adição de excipientes que possam absorver a radiação como forma de fotoproteção da formulação.

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível verificar a instabilidade das formulações comerciais de desonida frente à radiação UVA, gerando assim, um alerta aos fabricantes, às farmácias magistrais e aos usuários. Esse estudo aponta, também, a necessidade de novos estudos acerca da fotoproteção da desonida nas formulações, de modo a garantir que o teor de fármaco mantenha-se dentro dos limites aceitáveis durante o uso dos produtos, contribuindo, desse modo, para a eficácia e a segurança do tratamento farmacológico.

## 5 CONCLUSÕES

- A avaliação da solubilidade da desonida SQR, a determinação de seu ponto de fusão e a espectrofotometria no UV permitiram a caracterização do fármaco.
- A espectrofotometria no IV mostrou-se teste imprescindível para a identificação da matéria-prima de desonida.
- Os métodos de CLAE para determinação quantitativa da desonida em loção cremosa e em gel creme foram validados, demonstrando serem lineares na faixa estudada, específicos, precisos, exatos, robustos e indicativos de estabilidade.
- Os estudos de degradação forçada realizados nas formas farmacêuticas avaliadas indicaram a degradação da desonida em meio alcalino, ácido, oxidante e sob radiação UVA. Dentre essas, o meio alcalino é o mais crítico à estabilidade do fármaco.
- Os estudos de fotoestabilidade das formulações demonstraram que ambas as formulações analisadas degradam após exposição à radiação UVA.
- A avaliação da cinética de reação indicou que a degradação da loção cremosa segue cinética de reação de segunda ordem e o gel creme apresenta cinética de reação de primeira ordem, sendo que a velocidade de degradação da loção é maior do que a do gel creme.

## 6 REFERÊNCIAS

ADINOS: gel creme. Responsável técnico Wilson R. Farias. Guarulhos: Aché, 2009. Bula de remédio.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RE nº 1, de 29 de julho, de 2005**. Aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Lista de Medicamentos de Referência**. Atualização de janeiro, 2013. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2c33ad804ed09b20a2dda28a610f4177/Lista+A+F%C3%A1rmacos+Isolados\\_08\\_01\\_2013.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2c33ad804ed09b20a2dda28a610f4177/Lista+A+F%C3%A1rmacos+Isolados_08_01_2013.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 08 jan. 2013.

CATHCART, S. D.; THEOS, A. Inpatient management of atopic dermatitis. **Dermatologic Therapy**, v. 24, p. 249–255, 2011.

COSTA, A. D.; MACHADO, S.; SELORES, M. Corticóides tópicos: Considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, p. 367-373, 2005.

DALLA SANTA, F. et al. Development and validation of a simple stability-indicating LC-method and UVA photostability study of desonide hair lotion. **Current Analytical Chemistry**, 2013. In press.

DE FRANÇA, F. F. A. **Korolkovas: Dicionário Terapêutico Guanabara**. 16 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DEL ROSSO, J.; FRIEDLANDER, S. F. Corticosteroids: options in the era of steroid-sparing therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. S50-S58, 2005.

DESONIDA: loção cremosa. Responsável técnico Clarice Mitie Sano Yui. Campinas: Medley, 2006. Bula de remédio.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

FREEMAN, S. et al. Efficacy, cutaneous tolerance and cosmetic acceptability of desonida 0.05% lotion (Desowen<sup>®</sup>) versus vehicle in the short-term treatment of facial atopic or seborrhoeic dermatitis. **Australian Journal of Dermatology**, v. 43, p. 186-189, 2002.

GELBARD, C. M; HERBERT, A. A. Desonide hydrogel: advances in vehicle technology. **Expert Review of Dermatology**. v. 4, n.1, p. 23-27, 2009.

GINEYS, N.; GIROUD, B.; VULLIET, E. Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 2295-2302, 2010.

HAECK, I. M. et al. Topical corticosteroids in atopic dermatitis and the risk of glaucoma and cataracts. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 2, p. 275-281, 2011.

HEBERT, A. A, et al. Desonide foam 0.05%: safety in children as young as 3 months. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 2, p. 334-340, 2008.

HENGGE, U. R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n.1, p. 1-15, 2006.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1B: **Photostability testing of new drug substances and products**, 1996.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1A(R2): **Stability Testing of New Drug Substances and Products**, 2003.

IOELE, G. et al. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposomes formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 251–260, 2005.

IQBAL, J.; HUSAIN, A.; GUPTA, A. Photochemistry of desonide, a non-fluorinated steroidal anti-inflammatory drug. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 6, p. 836-838, 2006.

JIMENEZ, M. M. et al. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45–55, 2004.

JORIZZO, J. et al. Multicenter trial for long-term safety and efficacy comparison of 0.05% desonide and 1% hydrocortisone ointments in the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 74-77, 1995.

KAHANEK, N. R.; GELBARD, C. G.; HEBERT, A. A. Desonide: a review of formulations, efficacy and safety. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 7, p. 1097-1104, 2008.

KIRCIK, L.; DEL ROSSO, J. A novel hydrogel vehicle formulated for the treatment of atopic dermatitis. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 6, n. 7, p. 718-722, 2007.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química**. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LIN, H.S. et al. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-trans-retinoic acid. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 25, p. 265-269, 2000.

LOPES, S. B. et al. Development of an HPLC assay methodology for a desonida cream with chemometrics assisted optimization. **Analytical Letters**, v. 45, p. 1390-1400, 2012.

MANCONI, M. et al. 2003. Niosomes as carriers for tretinoin. Part II. Influence of vesicular incorporation on tretinoína photostability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 261–272, 2003.

MARTINS, G. A; CHAUL, A. Tratamento tópico da psoríase. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**. Consenso Brasileiro de Psoríase, 2009. Disponível em: < [http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340065482Arquivos\\_Pdfs\\_Capitulo5.pdf](http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1340065482Arquivos_Pdfs_Capitulo5.pdf) >. Acesso em: 20 jan. 2013.

MAZZARINO, M.; TURI, S.; BOTRÈ, F. A screening method for the detection of synthetic glucocorticosteroids in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry based on class-characteristic fragmentation pathways. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 1389-1402, 2008.

MERCK INDEX, Merck & Company, Inc., 14<sup>a</sup> Edition, White House Station, New York, 2006.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NGUYEN, T. T.; KRINGSTAD, R.; RASMUSSEN, K. E. Use of extraction columns for the isolation of desonida and parabens from creams and ointments for high-performance liquid chromatographic analysis. **Journal of Chromatography**, v. 366, p. 445-450, 1986.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

OURIQUE, A. F. et al. Tretinoinloaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, p.1-4, 2008.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 1-24, 2004.

PETERS, R. J. B. et al. Generic sample preparation combined with high-resolution liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for unification of urine screening in doping-control laboratories. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2583-2598, 2010.

ROCHA, N.; HORTA, M.; SELORES, M. Terapêutica tópica em dermatologia pediátrica. **Nascer e Crescer - Revista do Hospital de Crianças Maria Pia**, v. 13, n. 3, p. 215-225, 2004.

SCIFINDER SCHOLAR. American Chemical Society (ACS), 2012.

SPYRIDAKI, M. H. et al. Doping control analysis in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for the Olympic Games Athens 2004: determination of corticosteroids and quantification of

ephedrine, salbutamol and morphine. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 242-249, 2006.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: The Complete Drug Reference**. Pharmaceutical Press, 2009.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THOMA, K.; KÜBLER, N. New results in the photoinstability of antimycotics. In: ALBINI, A.; FASANI, E. **Drugs: photochemistry and photostability**. Bodmin: MPG Books Ltd, The Royal Society of Chemistry, 1998.

TOMSÍKOVÁ, H. et al. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35-58, 2012.

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1-14, 2001.

TØNNESEN, H. H. Introduction: Photostability testing of drugs and drug formulations – Why and how? In: TONNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC Press LCC, 2004a.

TØNNESEN, H. H. Formulation approaches for improving solubility and its impact on drug photostability. In: TONNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. 2<sup>nd</sup> ed. London: CRC Press LCC, 2004b.

TOUBER, M. E. et al. Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 137-146, 2007.

TUDELA, E.; MUÑOZ, G.; MUÑOZ-GUERRA, J. A. Matrix effect for multianalyte analysis by LC-MS/MS in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 901, p. 98-106, 2012.

VADAS, E. B. Estabilidade de produtos farmacêuticos. In: GENARO, A. R. (Ed.). Remington. **A Ciência e a prática em farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.



VONAPARTI, A. et al. Direct injection LC/ESI-MS horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. I. Determination of hydrocortisone. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, p. 1255-1264, 2008.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WONG, V. K; FUCHS, B; LEBWOHL, M. Overview on desonide 0.05%: a clinical safety profile. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 3, p. 393–397, 2004.