

**CICLOPIROX OLAMINA: DESENVOLVIMENTO,
VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE
ANÁLISE**

por

Ana Laura Venquiaruti Escarrone

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração de 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.**

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**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

**CICLOPIROX OLAMINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS DE ANÁLISE**

elaborada por
Ana Laura Venquiaruti Escarrone

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt
(Presidente/Orientador)**

Prof. Dr. Leandro Machado Rocha (UFF/ Niterói)

Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde (UFSM/ Santa Maria)

Santa Maria, 12 de setembro de 2006.

DEDICO ESTE TRABALHO

Á minha família, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

Ao Ednei, pelo incentivo, amor e paciência, sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Celso, pela orientação, amizade e paciência.

À professora e sempre amiga Luciane, por ser um exemplo de profissional e ser humano.

À Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, pelo apoio e suporte técnico;

À ANVISA, especialmente ao Dr. Victor Hugo Costa Travassos da Rosa, que possibilitou a execução deste trabalho de pesquisa.

Aos amigos e colegas da Farmacopéia Brasileira, pela amizade.

À amiga Nara, pelo auxílio nas correções ortográficas deste trabalho.

À amiga Isabel, pelo seu companheirismo e amizade.

Aos amigos da UNIFRA, em especial ao Marcos, Milene, Cláudio, Rosane, Júnior, Cléber e Marta, pela ajuda incansável e enorme amizade.

Ao professor Ednei Primel, pela orientação constante.

Ao professor Renato Zanella, pela atenção e ajuda.

À professora Margareth Athayde, pelo carinho com que sempre me recebeu na Docência orientada.

Aos familiares, em especial Romilda, Paulo e Luiza, pelo amor e apoio.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

CICLOPIROX OLAMINA: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE

AUTORA: Ana Laura Venquiaruti Escarrone

ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso F. Bittencourt

Data e Local da Defesa:

A frequência de infecções fúngicas tem aumentado, drasticamente, nas duas últimas décadas em decorrência do prolongamento da vida, inclusive de pacientes gravemente enfermos, em razão do avanço da capacidade da ciência e da tecnologia médica. Esta sobrevida ocasionou a manifestação de infecções fúngicas em novas proporções, o que aumentou o interesse pelo estudo dos fármacos antifúngicos.

O ciclopirox olamina é um agente antifúngico sintético com amplo espectro de ação, com atividades antiinflamatória e antibacteriana inerentes. Este fármaco não possui monografia oficial na Farmacopéia Brasileira. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para quantificação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (UV) e Ensaio Microbiológico por difusão em ágar. Na determinação por CLAE-UV, as análises foram conduzidas em coluna de fase reversa C18, na temperatura de 30 °C. No Ensaio microbiológico por difusão em ágar utilizou-se planejamento 3x3, empregando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo teste. Ambos os métodos apresentaram linearidade, precisão e exatidão adequados.

Palavras-chaves: Ciclopirox olamina, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Difusão em ágar, Validação.

ABSTRACT

Dissertation for obtaining the degree of Master
Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

CICLOPIROX OLAMINA: DEVELOPMENT, VALIDATION AND COMPARISON OF ANALYSIS METHODOLOGIES

AUTHOR: Ana Laura Venquiaruti Escarrone

ADVISOR: Prof. Dr. Celso F. Bittencourt

Date and Place of Defense:

The frequency of fungal infections has risen drastically during the last decades due to the increasing human lifespan, even in cases of grave sickness, because of the advance in the capacity of science and medical technology. This survival rate has brought about a manifestation of fungal infections at new proportions, which has raised the interest in studying anti-fungal drugs.

Ciclopirox olamina is a synthetic anti-fungal agent with a wide spectrum of action, with inherent anti-inflammatory and anti-bacterial activities. This drug does not have an official monograph in the Brazilian Pharmacopeia. In this study, methods for the quantification of ciclopirox olamina as a raw material and in a topical solution were developed and validated, using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with detection in the ultraviolet region, and a microbiological assay by agar diffusion. In the determination by HPLC-UV, the analyses were conducted in a reverse phase column C18, at a temperature of 30°. In the microbiological assay by agar diffusion, 3x3 planning was used, employing *Candida albicans* ATCC 10231 as a microorganism test. Both methods presented adequate linearity, precision and accuracy.

Key Words: Ciclopirox olamina, High Performance Liquid Chromatography, Agar diffusion, Validation.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Considerações gerais	3
2.2 Características físico-químicas do ciclopirox olamina	4
2.3 Mecanismo de ação	5
2.4 Indicações e apresentações disponíveis	6
2.5 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	7
2.6 Atividades antibacteriana e antiinflamatória	10
2.7 Segurança do fármaco	12
2.8 Metabolismo e Características Farmacocinéticas	13
2.9 Métodos de determinação	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Materiais	17
4.1.1 Substância química de referência (SQR)	17
4.1.2 Matéria-prima	17
4.1.3 Forma farmacêutica	17
4.1.4 Solventes e reagentes	17
4.1.5 Equipamentos e acessórios	18
4.2 Metodologia	19
4.2.1 Introdução	19
4.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	21
4.2.2.1 Descrição dos parâmetros utilizados	21
4.2.2.2 Derivatização pré-coluna	22
4.2.2.3 Preparação da curva analítica	23
4.2.2.4 Cálculo para determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica	24
4.2.2.5 Especificidade	25
4.2.2.6 Exatidão	27
4.2.2.7 Robustez	28
4.2.2.8 Precisão	29
4.2.3 Ensaio Microbiológico por difusão em ágar - cilindro em placa	29

4.2.3.1 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19	30
4.2.3.1.1 Preparo dos materiais	30
4.2.3.1.2 Preparo dos meios de cultura e diluentes.....	30
4.2.3.1.3 Padronização do método.....	31
4.2.3.1.4 Preparação do inóculo	32
4.2.3.1.5 Preparo da solução de ciclopirox olamina SQR	32
4.2.3.1.6 Preparo da solução de ciclopirox olamina matéria-prima	32
4.2.3.1.7 Preparo da solução de ciclopirox olamina solução tópica.....	33
4.2.3.1.8 Ensaio	33
4.2.3.1.9 Cálculos	33
4.2.3.1.10 Validação do método analítico	34
4.2.3.1.10.1 Linearidade	34
4.2.3.1.10.2 Teste de recuperação	34
4.2.3.1.10.3 Precisão.....	35
4.2.3.2 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose ágar.....	36
4.2.3.2.1 Preparo de materiais.....	36
4.2.3.2.2 Preparo dos meios de cultura e diluentes.....	36
4.2.3.2.3 Padronização do método.....	37
4.2.3.2.4 Preparação do inóculo	37
4.2.3.2.5 Preparo da solução de ciclopirox olamina SQR	38
4.2.3.2.6 Preparo da solução de ciclopirox olamina matéria-prima	38
4.2.3.2.7 Preparo da solução de ciclopirox olamina solução tópica.....	38
4.2.3.2.8 Ensaio	39
4.2.3.2.9 Cálculos	39
4.2.3.2.10 Validação do método analítico	39
4.2.3.2.10.1 Linearidade	39
4.2.3.2.10.2 Teste de recuperação	40
4.2.3.2.10.3 Precisão.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	42
5.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico	42
5.1.2 Obtenção da curva de calibração	42
5.1.3 Especificidade.....	46
5.1.4 Exatidão	46
5.1.4.1 Exatidão para ciclopirox olamina matéria-prima	46
5.1.4.2 Exatidão para ciclopirox olamina solução tópica.....	47
5.1.5 Robustez	48
5.1.6 Precisão.....	48
5.2 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19	50
5.2.1 Linearidade	50
5.2.2 Teste de recuperação	52
5.2.2.1 Teste de recuperação para ciclopirox olamina matéria-prima.....	52
5.2.2.2 Teste de recuperação para ciclopirox olamina solução tópica	52
5.2.3 Precisão.....	53
5.2.3.1 Repetibilidade de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.....	53
5.2.3.2 Precisão intermediária de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica	53
5.2.4 Resultados de potência	54
5.3 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar	56

5.3.1 Linearidade	56
5.3.2 Teste de recuperação	58
5.3.2.1 Teste de recuperação para ciclopirox olamina matéria-prima.....	58
5.3.2.2 Teste de recuperação para ciclopirox olamina solução tópica	59
5.3.3 Precisão.....	59
5.3.3.1 Repetibilidade de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.....	59
5.3.3.2 Precisão intermediária de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.....	60
5.3.4 Resultados de potência	61
5.4 Análise comparativa dos métodos propostos	63
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	66
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9. ANEXOS.....	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do ciclopirox olamina.....	4
FIGURA 2 – Representação gráfica da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, obtida através de CLAE-UV e sua respectiva equação da reta.....	43
FIGURA 3 – Cromatograma obtido para o ciclopirox olamina SQR, na concentração de 10 µg/ml.....	45
FIGURA 4 – Cromatograma obtido para o ciclopirox olamina SQR, na concentração de 40 µg/ml.....	45
FIGURA 5 – Cromatograma obtido para o ciclopirox olamina SQR, na concentração de 80 µg/ml.....	45
FIGURA 6 – Representação gráfica da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, obtida através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	51
FIGURA 7 - Representação gráfica da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, obtida através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Saboraud-dextrose 4% ágar.....	57
FIGURA 8 – Representação gráfica da análise comparativa das médias encontradas nos diferentes métodos para o ciclopirox olamina matéria-prima.....	64
FIGURA 9 - Representação gráfica da análise comparativa das médias encontradas nos diferentes métodos para o ciclopirox olamina matéria-prima.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima de ciclopirox olamina, obtida contra os microrganismos testados, expressa em µg/ml.....	9
TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima encontrada para três agentes antifúngicos, expressa em µg/ml, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas..	11
TABELA 3 - Parâmetros utilizados para a execução do método por CLAE-UV.....	22
TABELA 4 - Concentrações finais da solução padrão para obtenção da curva de calibração de ciclopirox olamina por CLAE-UV.....	24
TABELA 5 - Diluições realizadas para o teste de recuperação para ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de CLAE-UV.....	28
TABELA 6 - Parâmetros utilizados na avaliação da potência de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	31
TABELA 7 – Diluições realizadas para o teste de recuperação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	35
TABELA 8 – Parâmetros utilizados na avaliação da potência de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar.....	37
TABELA 9 – Diluições realizadas para o teste de recuperação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica método através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar.....	40
TABELA 10 – Valores de áreas absolutas para a curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de CLAE-UV.....	43
TABELA 11 - Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de CLAE-UV.....	44

TABELA 12 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, realizado em amostras de ciclopirox olamina matéria-prima, através de CLAE-UV.....	47
TABELA 13 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, realizado em amostras de ciclopirox olamina solução tópica, através de CLAE-UV.....	47
TABELA 14 - Alterações sofridas e valores experimentais obtidos durante a quantificação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na avaliação da robustez do método.....	48
TABELA 15 - Valores experimentais obtidos para o doseamento de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de CLAE-UV, em diferentes dias.....	49
TABELA 16 - Valores experimentais obtidos para o doseamento de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de CLAE-UV, em um mesmo dia	49
TABELA 17 - Diâmetros médios dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	50
TABELA 18 - Análise de variância (ANOVA) dos halos de inibição determinados para obtenção da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	51
TABELA 19 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, para ciclopirox olamina matéria-prima.....	52
TABELA 20 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, através do Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, para ciclopirox olamina solução tópica.....	52
TABELA 21 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, em um mesmo dia.....	53
TABELA 22 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, em diferentes dias.....	54
TABELA 23 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina matéria-prima, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	55
TABELA 24 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.....	56

TABELA 25 - Diâmetros médios dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar.....	57
TABELA 26 - Análise de variância (ANOVA) dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar.....	58
TABELA 27 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar, para ciclopirox olamina matéria-prima.....	58
TABELA 28 - Valores experimentais obtidos no teste de recuperação, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar, para ciclopirox olamina solução tópica.....	59
TABELA 29 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar, em um mesmo dia.....	60
TABELA 30 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar, em diferentes dias.....	61
TABELA 31 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina matéria-prima, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar.....	62
TABELA 32 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouroud-dextrose 4% ágar.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collections
°C	Graus centrígrados
C18	Octadecilsilano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de Variação Percentual
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
gl	Graus de Liberdade
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
µg	Micrograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanômetros
r	Coefficiente de correlação de Pearson
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SQR	Substância Química de Referência
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

O ser humano tem tido contato com fungos desde épocas remotas da história, beneficiando-se dos seus usos e sofrendo as conseqüências de suas infecções (VERA e CERVERA, 2001). As infecções fúngicas em humanos variam de micoses simples, superficiais e de fácil tratamento até micoses sistêmicas, disseminadas a vários órgãos e que são potencialmente fatais (SILVA, 2002).

Em um indivíduo com saúde normal, a maioria das infecções por fungos não se disseminam em função da competição com a flora bacteriana normal. Quando o sistema imunológico está comprometido existe aumento na probabilidade de ocorrência dessas infecções (QUINDÓS, 2002).

Atualmente são oferecidas novas possibilidades terapêuticas para doenças até recentemente consideradas fatais, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), leucemias, neoplasias sólidas, afecções crônicas e irreversíveis dos rins, coração e fígado, melhorando o prognóstico dos pacientes. Com isso, tem surgido uma população de imunodeprimidos, ensejando, ao mesmo tempo, o aparecimento de processos micóticos oportunistas e de resistência aos fármacos disponíveis (LORTHOLARY e DUPONT, 1997).

A introdução de novos agentes antifúngicos na terapêutica, nas três últimas décadas, permitiu um importante progresso no tratamento das micoses superficiais e sistêmicas (ARAÚJO e SILVEIRA, 1996).

O ciclopirox olamina é um agente antifúngico derivado da hidroxipiridona que difere, em estrutura e mecanismo de ação, dos demais antimicóticos. Este antifúngico inibe a recaptação celular de compostos essenciais e, em altas concentrações, pode alterar a permeabilidade da célula fúngica (GUPTA e SKINNER, 2003). Possui um amplo espectro de ação contra dermatofitoses na pele, unhas e cabelos, sendo um agente fungicida e fungistático com atividades antiinflamatórias e antibacteriana inerentes (GUPTA, 2001).

O presente trabalho contempla o estudo do desenvolvimento e validação de metodologias para a determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção na região do Ultravioleta (CLAE-UV) e Ensaio Microbiológico por difusão em ágar.

O desenvolvimento de novas metodologias para a determinação deste fármaco justifica-se no fato de sua grande utilização terapêutica e, também, pela ausência de monografia para o ciclopirox olamina em nosso código oficial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais

Infecções superficiais causadas por fungos representam um dos problemas sanitários de maior alcance na população mundial de todas as idades, podendo ser comparadas com as cáries dentárias e os resfriados, quanto à sua incidência e prevalência (VERA e CERVERA, 2001).

As infecções fúngicas têm sido importantes causas de mortalidade e morbidade em pacientes cirúrgicos e em outras condições imunossupressivas, como em pacientes transplantados ou infectados por SIDA (JONHSON, 2000).

A resposta terapêutica para as infecções fúngicas superficiais teve grande evolução a partir dos dois últimos séculos, melhorando não só sua eficiência e espectro de ação como também sua tolerabilidade e tempo de tratamento (CARAZO *et al.*, 1999). Existe uma série de agentes tópicos usados para o tratamento de micoses superficiais. Muitos dos fármacos mais antigos, como a violeta genciana, o enxofre e o iodo dificilmente são indicados na atualidade (ARAÚJO e SILVEIRA, 1996).

Nesse sentido podem-se considerar três etapas no desenvolvimento de fármacos antifúngicos. A primeira, atingindo a década de 1940-1950, na qual se utilizaram tratamentos tópicos tradicionais que atuavam como esfoliantes químicos da camada córnea (queratolíticos) e antifúngicos fracos. Entre os preparados de maior uso destacou-se o unguento de Whiffield (ácido benzóico 6% e ácido salicílico 3%), os corantes fenólicos como fuccina 0,3% e violeta genciana 0,5%, entre outros.

Numa segunda etapa, entre os anos de 1950 e 1980, foram sintetizados os primeiros antifúngicos de uso tópico e sistêmico, como o tolnaftato, a haloprogina, a griseofulvina e os imidazólicos (econazol, miconazol, clotrimazol e cetoconazol). Também nesta época foram introduzidos os inibidores da síntese de pirimidinas, como a 5-fluorocitosina e os poliênicos, como a nistatina e a anfotericina B.

A terceira etapa começou na década de 1980, com o desenvolvimento de novos triazóis: itraconazol, fluconazol e voriconazol; de novas formulações de antifúngicos poliênicos já conhecidos (anfotericina B em lipossomas, complexo lipídico ou em dispersão coloidal, nistatina em lipossomas, etc...); das alilaminas (naftifina, terbinafina, etc...), novas moléculas ativas por

via oral e de outros antifúngicos de uso tópico exclusivo, como ciclopirox olamina e amorolfina. (VERA e CERVERA, 2001).

2.2 Características físico-químicas do ciclopirox olamina

- Nome químico: sal etanolamínico de 6-cicloexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona;
- Fórmula molecular: $C_{12}H_{17}NO_2 \cdot C_2H_7NO$;
- Massa molecular: 268,35 g/mol;
- Estrutura química: ver Figura 1;
- Aparência: pó cristalino branco ou amarelo claro;
- Solubilidade: pouco solúvel em água, muito solúvel em etanol e cloreto de metileno, pouco solúvel em acetato de etila, praticamente insolúvel em cicloexano (THE MERCK INDEX, 2001; AKIMOTO e HIRAYAMA, 2003; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2006).

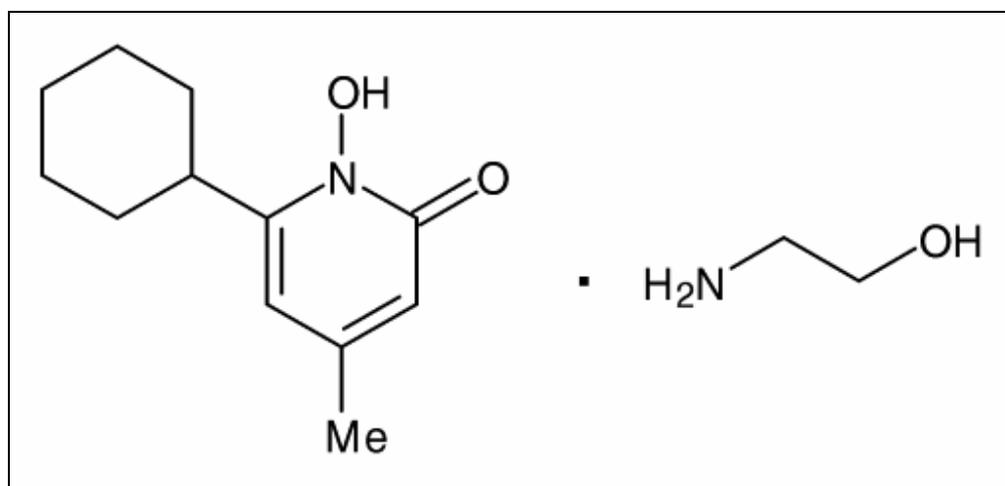


FIGURA 1 - Estrutura química do ciclopirox olamina

O ciclopirox olamina é um derivado de hidroxipiridona, formado a partir de um sal de etanolamina de 6-cicloexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona (GUPTA e PLOTT, 2004).

2.3 Mecanismo de ação

O ciclopirox olamina teve seu primeiro relato como um possível agente antifúngico em 1973 (DITTMAR e LOHAUS, 1973). A maioria dos estudos detalhando o mecanismo de ação deste fármaco foi publicada aproximadamente 30 anos atrás, na época que o ciclopirox olamina foi sintetizado e introduzido na terapêutica clínica (NIEWERTH *et al.*, 2003).

Quando sua utilização tornou-se mais freqüente, foram publicados os resultados de muitas investigações sobre sua eficácia e a comparação da sua ação com outros agentes antifúngicos (ABRANS *et al.*, 1992).

Diferentemente da maioria dos agentes antifúngicos, o ciclopirox olamina não exerce efeitos sobre a biossíntese do esterol e seu mecanismo de ação é complexo, interferindo em vários processos metabólicos da célula fúngica (KORTING e GRUUNDMANN-KOLLMANN, 1997).

Estudos demonstram que o ciclopirox olamina exerce seu efeito primário através da interferência na recaptação e na acumulação de precursores da síntese de macromoléculas da célula fúngica. A alteração na permeabilidade celular só é verificada quando o fármaco se apresenta em altas concentrações (ABRANS *et al.*, 1992).

O ciclopirox olamina possui alta afinidade por metais trivalentes, como o Fe^{+3} e Al^{+3} . A captura destes co-fatores enzimáticos essenciais tem efeito inibitório nas enzimas do citocromo, que estão envolvidos no processo mitocondrial de transporte de elétrons (KOKJOH *et al.*, 2003). Adicionalmente, a atividade da catalase e peroxidase, responsáveis pela degradação intracelular de peróxidos tóxicos, é fortemente inibida na presença deste fármaco (BOHN e KRAMER, 2000).

Estudos de SAKURAI *et al.*, de 1978, já demonstravam que a recaptação de nutrientes no meio intracelular é primariamente afetada. Nas células em crescimento, a depleção intracelular de aminoácidos essenciais e nucleotídeos secundários contribui para a redução na síntese de proteínas e aminoácidos (Sakurai *et al.*, 1978 *apud* BOHN e KRAEMER, 2000).

As investigações *in vitro*, com o emprego de microscopia eletrônica, demonstraram que o ciclopirox olamina modifica a membrana plasmática de dermatófitos e *Candida albicans*. O efeito na estrutura da célula *in vivo* demonstra visível desorganização das estruturas internas e sérios danos na membrana (GASPARINI *et al.*, 1986; DEL PALACIO HERNANZ *et al.*, 1990).

A complexidade do seu mecanismo de ação pode gerar uma diminuição na ocorrência de resistência, quando comparado a outros agentes antifúngicos. Comprovando esta afirmação, verifica-se que foram encontrados poucos relatos de cepas resistentes (BOHN e KRAEMER, 2000).

Uma característica dos derivados de hidroxipiridona, que os difere dos agentes antifúngicos usuais, é a sua ação fungicida também contra células que não estão em multiplicação. Esta propriedade é importante, uma vez que as infecções nas unhas causadas por fungos ocorrem sob condições desfavoráveis ao crescimento dos patógenos (BOHN e KRAEMER, 2000).

2.4 Indicações e apresentações disponíveis

O ciclopirox olamina é um agente antifúngico sintético de amplo espectro que inibe o crescimento de fungos (GUPTA, 1991; GUPTA *et al.*, 2003; GUPTA e SKINNER, 2003), sendo indicado para a terapia de:

- Infecções cutâneas no corpo (ex: *Tinea corporis*);
- Infecções cutâneas nos pés (ex: *Tinea pedis*);
- Infecções cutâneas na virilha (ex: *Tinea cruris*);
- Dermatite seborréica do couro cabeludo;
- Fungos do sol (ex: *Tinea versicolor* e *Pityriasis versicolor*) e várias outras infecções por fungos, como *Candida monilia*.

É o fármaco de primeira escolha no tratamento tópico de candidíases cutâneas, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea pedis* e *Tinea versicolor* e de segunda escolha no tratamento de onicomicoses (EFFENDY, 1995; GUPTA *et al.*, 2003; ALY *et al.*, 2003a; ALY *et al.*, 2003b).

O ciclopirox olamina está disponível nas seguintes formas farmacêuticas: creme, solução tópica, suspensão tópica, esmalte, xampu e pó (MARTINDALE, 2005). No Brasil, está disponível nas formas de creme dermatológico, creme vaginal, xampu, esmalte e solução tópica (DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas, 2005-06; DICIONÁRIO Terapêutico Guanabara, 2005-06).

2.5 Atividade antifúngica *in vitro*

O ciclopirox olamina é um agente fungicida e fungistático, com atividade *in vitro* contra amplo espectro de fungos, incluindo dermatófitos, actinomicetos, fungos dimórficos, eumicetos, entre outros gêneros. Para a maioria dos dermatófitos (espécie *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) e leveduras (*Candida sp.*, *Criptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*), a concentração inibitória mínima (CIM) se encontra dentro da faixa de 0,9 a 3,9 µg/ml quando estes microrganismos estão cultivados em meio Sabouraud-dextrose, livre de certos metais. Vários outros fungos, incluindo cepas selecionadas de espécies de *Aspergillus*, são inibidos por ciclopirox olamina nas concentrações de 1,9 a 15,6 µg/ml (ABRAMS *et al.*, 1992).

O ciclopirox olamina age parcialmente por complexação de íons metálicos e conseqüentemente sua atividade *in vitro* depende da concentração de íons metálicos livres no meio utilizado para a cultura. Por isso, a composição do meio é um importante fator na determinação da CIM (MAC KERROW *et al.*, 1991).

Dois estudos independentes, realizados com modelo de pele de porcos, demonstraram resultados favoráveis. Eles verificaram a atividade do ciclopirox olamina comparando-a com os agentes antifúngicos tópicos oxiconazol, naftifina e bifonazol, sob a forma farmacêutica creme 1%. Em ambos os estudos foram demonstrados efeito inibitório de 93% para o ciclopirox olamina, enquanto que os outros agentes obtiveram menos que 50% de atividade, quando comparados ao controle (ALY *et al.*, 1989; HANEL *et al.*, 1988).

HANEL *et al.*, 1988 observaram, também, alta atividade fungicida do ciclopirox olamina em comparação com oxiconazol e bifonazol. Para a determinação desta atividade, o microrganismo *Trichophyton mentagrophytes* foi submetido, durante 1 hora, à exposição do ciclopirox olamina, na forma farmacêutica creme 1%, tendo o fármaco demonstrado efeito inibitório de 98%. Outros antifúngicos testados, nas mesmas condições, demonstraram porcentagens de atividade inferior ao medicamento de estudo. Encontrou-se a seguinte ordem de atividade: ciclopirox olamina creme 1% > oxiconazol creme 1% > bifonazol creme 1%. Esta ordem de atividade se mantém quando os fármacos são, igualmente, testados em modelo de pele humana.

O ciclopirox olamina demonstra, também, maior atividade *in vitro* contra *Candida albicans* em relação a outros antimicóticos testados. Os dados foram obtidos com o emprego do teste de ultrafiltração de tecidos, que obedece aos seguintes procedimentos de execução:

- o agente tópico é aplicado em uma porção de amostra de pele;
- as camadas da pele são separadas;
- a *Candida albicans* é inoculada nas camadas mais profundas;
- são preparadas culturas com as amostras de tecido para determinar o número de unidades formadoras de colônias.

A ordem de atividade dos cremes foi: ciclopirox olamina > tioconazol > oxiconazol > miconazol > econazol > clotrimazol > bifonazol > naftifina (ALY *et al.*, 1989).

Dados mais recentes, utilizando o método de microdiluição, preconizado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997), confirmaram a atividade antifúngica de amplo espectro do ciclopirox olamina. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima do ciclopirox olamina, obtida contra os microrganismos testados, expressa em µg/ml.

Microrganismos testados / Autores	KOKJONH <i>et al.</i> , 2003 CIM (n)	HANEL <i>et al.</i> , 1988 CIM (n)	JUE <i>et al.</i> , 1985 CIM (n)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,06-0,125 (5)	1,50 (47)	0,9-3,9 (36)
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,125 (5)	0,98 (18)	0,5-3,9 (45)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	0,3-0,6 (5)	0,98 (1)	0,9-1,9 (6)
<i>Microsporum canis</i>	0,004-0,06 (5)	0,98 (1)	0,5-3,9 (6)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,03 (4)	0,24 (1)	0,9-1,9 (8)
<i>Candida albicans</i>	0,06-0,25 (5)	1,5 (42)	0,9-3,9 (50)
<i>Malassezia furfur</i>	0,001-0,125 (5)	—	0,9-3,9 (18)
<i>Candida tropicalis</i>	-----	2,5 (15)	0,9-3,9 (7)
<i>Candida krusei</i>	-----	0,98 (11)	0,9-3,9 (15)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-----	0,98 (1)	1,9 (5)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-----	6,0 (4)	0,9-3,9 (6)
<i>Blastomyces dermatitis</i>	-----	0,98 (1)	0,9-1,9 (4)
<i>Aspergillus niger</i>	-----	1,95 (1)	3,9 (1)
<i>Aspergillus flavus</i>	-----	0,98 (2)	1,9 (2)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-----	-----	1,9-7,8 (5)
<i>Fusarium solani</i>	-----	-----	31,3 (2)

(n) número de diferentes cepas testadas para cada espécie de fungos

2.6 Atividades antibacteriana e antiinflamatória

As dermatofitoses, incluindo as onicomicoses, podem causar sérias complicações devido às infecções bacterianas secundárias. Em função disso é de suma importância a atividade antimicrobiana exercida pelo ciclopirox olamina. Este fármaco se distingue dos demais agentes antifúngicos por apresentar atividade antibacteriana mais uniforme e com maior espectro de ação (GUPTA e PLOTT, 2004).

O ciclopirox olamina possui comprovada atividade *in vitro* contra muitas bactérias gram-positivas e negativas. A atividade antibacteriana deste agente é superior, quando comparada a outros agentes antimicóticos, principalmente contra bactérias gram-negativas (ABRAMS *et al.*, 1992; BOHN e KRAEMER, 2000). Sua atividade contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* foi descrita por BELLIARDO *et al.*, 1991.

A atividade antibacteriana *in vitro* de ciclopirox olamina, nitrato de econazol e cloridrato de butenafina foi, recentemente, reportada por KOKJOHN *et al.*, 2003. Os autores utilizaram o método da microdiluição padronizada, preconizado pelo NCCLS e as CIM foram determinadas para isolados de bactérias.

O ciclopirox olamina demonstrou atividade contra todas as bactérias gram-negativas e gram-positivas testadas, apresentando variação na CIM de 0,004 a 0,25 µg/ml, conforme demonstrado na Tabela 2, que inclui também a atividade do nitrato de econazol e do cloridrato de butenafina.

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima encontrada para três agentes antifúngicos, expressa em µg/ml, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Isolados de bactérias	Número de isolados	ciclopirox olamina	nitrato de econazol	cloridrato de butenafina
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0,5	0,03	>128
<i>Streptococcus β-hemolíticos</i>	5	0,06-0,125	0,03-0,25	4-16
<i>Micrococcus luteus</i>	2	0,25-2	0,004	>32
<i>Micrococcus sedentarius</i>	3	0,25	0,002-0,015	>32
<i>Brevibacterium species</i>	5	<0,06-0,25	0,004-0,015	>32
<i>Corynebacterium species</i>	2	0,25	0,004-0,008	<0,001 > 32
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	3	0,25	0,008-0,015	<0,001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0,5-2	>128	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	5	0,5	>128	>128
<i>Escherichia coli</i>	5	0,5	>128	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0,5	>128	>128

A atividade do ciclopirox olamina contra bactérias é particularmente relevante nos casos de infecções por *Tinea pedis*, que geralmente associam-se ao crescimento de bactérias, principalmente as gram-negativas (GUPTA e PLOTT, 2004).

O ciclopirox olamina possui, também, atividade antiinflamatória inerente, fator importante uma vez que as infecções fúngicas podem ser complicadas pela presença de processos inflamatórios (GUPTA, 2001). A atividade antiinflamatória tem sido estudada através de diferentes modelos. Em um ensaio de edema induzido pelo ácido araquidônico, onde vários agentes antifúngicos foram estudados, o ciclopirox olamina demonstrou melhor efeito de inibição do edema, efeito este similar aos agentes antiinflamatórios de referência (indometacina e desoximetasona) (GUPTA, 2001). Outros estudos compararam a habilidade de preparações antifúngicas em suprimir o eritema em resposta à exposição *in vivo* aos raios UV-B, gerados por um simulador solar. O ciclopirox olamina apresentou os melhores resultados, seguido por alilaminas, azóis e hidrocortisona (BOHN e KRAEMER, 2000; ROSEN *et al.*, 1997).

Sua atividade contra bactérias gram-positivas e negativas, assim como suas propriedades antiinflamatórias, faz com que esse fármaco seja efetivo em infecções com inflamações cutâneas e dermatofitoses com infecções bacterianas secundárias (KOKJONH *et al.*, 2003).

2.7 Segurança do fármaco

Os efeitos adversos no uso de ciclopirox olamina, para o tratamento de micoses superficiais, são raros, sendo o fármaco bem tolerado após aplicação cutânea ou vaginal. Os efeitos adversos mais comumente observados incluem sensação de queimação na pele, irritação, vermelhidão, dor ou prurido, os quais são reportados em menos de 5% dos pacientes, na maioria dos estudos descritos (ABRAMS *et al.*, 1992; BOHN e KRAEMER, 2000; GUPTA e SKINNER, 2003).

Ainda não se determinou a eficácia e a segurança do fármaco para crianças menores de 10 anos de idade, mas há indicações que este medicamento não deve ser usado em gestantes ou lactantes (SILVA, 2002).

A administração subcutânea em ratos, por longo período, em concentrações maiores que 10 mg/Kg, causa reações locais (Mizukami *et al.*, 1975 *apud* JUE *et al.*, 1985).

A toxicidade deste fármaco foi testada em vários modelos animais, assim como a sua carcinogenicidade e mutagenicidade, para os quais não se demonstrou potencialidade em nenhum dos efeitos testados (JUE *et al.*, 1985; GUPTA e SKINNER, 2003).

Outro ponto importante é o fato de que, mesmo tendo sido introduzido na terapia clínica há mais de duas décadas, não houve relato de casos de resistência ao fármaco por fungos (NIEWERTH *et al.*, 2003).

2.8 Metabolismo e Características Farmacocinéticas

Depois de aplicado sobre a pele, o ciclopirox olamina penetra pela epiderme até a derme e, mesmo com a ocorrência de oclusão, somente é absorvida quantidade inferior a 1,5% do fármaco para a circulação sistêmica (GOODMAN e GILMAN, 1996).

Resultados de estudos farmacocinéticos clínicos e pré-clínicos demonstraram que a aplicação tópica de ciclopirox olamina resulta em concentrações do fármaco que excedem a CIM para os microrganismos sensíveis através da epiderme e em níveis da derme. Os resultados destes estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam a rápida permeação do ciclopirox olamina através da pele e confirma a habilidade em penetrar através das unhas (GUPTA e SKINNER, 2003; BOHN e KRAEMER, 2000; MYOUNG e CHOI, 2003).

A rápida permeação do ciclopirox olamina no estrato córneo e epiderme foi demonstrada em um modelo *in vitro*, utilizando amostras de pele humana e de porcos (ALY *et al.*, 1989).

Em testes realizados para o ciclopirox olamina e econazol, a completa supressão do crescimento de *Trichophyton mentagrophytes* foi notada após 4 e 24 horas de incubação, respectivamente (Ceschin-Roques *et al.*, 1991 *apud* ABRANS *et al.*, 1992). Este estudo relata, ainda, que a inibição completa não foi obtida com nenhum outro agente antifúngico testado além do ciclopirox olamina, incluindo clotrimazol, miconazol, ácido benzóico e tolnaftato.

Estudos sobre a permeação do fármaco foram, também, realizados *in vivo*. A cinética de absorção em humanos foi determinada em estudos realizados em 10 voluntários sadios. Ciclopirox olamina creme 1% foi aplicado nos antebraços dos voluntários e, transcorridas 2, 6 e 24 horas, foram coletadas amostras de estrato córneo (Ceschin-Roques *et al.*, 1991 *apud* ABRANS *et al.*, 1992). Estudos utilizando radioatividade e solução marcada de ciclopirox olamina a 1% demonstraram que a substância é absorvida na concentração de 1,3% da dose aplicada em porção de pele de 750 mm², com oclusão de 6 horas (PHYSICIAN'S Desk Reference, 1990 *apud* GUPTA, 2001).

O ciclopirox olamina penetra nos cabelos e nas glândulas sebáceas via epiderme e folículos pilosos. Além disso, o fármaco possui uma ação de reserva, em decorrência de depositar-se no estrato córneo (PHYSICIAN'S Desk Reference, 1999 e COMPENDIUM of Pharmaceutical and Specialties, 1999 *apud* GUPTA, 2001).

Foram realizados estudos *in vitro* para demonstrar que o ciclopirox olamina, na sua apresentação de esmalte, é capaz de atingir o sítio da infecção fúngica na unha, ou sob ela. Estes utilizaram como modelo pele de porco e unhas humanas (Cechin-Roques *et al.*, 1991 *apud* ABRANS *et al.* 1992) e, também, pele bovina e ovina (MERTIN *et al.*, 1997).

Após administração oral em ratos, o ciclopirox olamina é rapidamente distribuído para todos os tecidos, com maiores concentrações nos rins, fígado e músculo do estômago. A transferência pela placenta parece ser aparentemente insignificante (JUE *et al.*, 1985). A meia-vida é de 1,7 horas e não há tendência de acúmulo sistêmico (GOODMAN e GILMAN, 1996).

2.9 Métodos de determinação

O ciclopirox olamina encontra-se inscrito na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006), onde constam monografias oficiais para a matéria-prima e para as especialidades farmacêuticas creme e suspensão tópica. Para a determinação quantitativa destas formas farmacêuticas é indicado o método espectrofotométrico, na região do visível, empregando-se sulfato de ferro III como reagente de cor. Para a determinação da matéria-prima, é preconizado o método potenciométrico.

A substância sob estudo aparece inscrita nas Farmacopéias Européia (EUROPEAN Pharmacopeia, 2005) e Britânica (BRITISH Pharmacopeia, 2006) somente como matéria-prima, sendo determinada por meio de titulação potenciométrica.

O fármaco objeto do presente estudo não possui monografia oficial descrita na 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira.

Os procedimentos de quantificação descritos na literatura incluem determinação espectrofotométrica (USP 25, 2002), determinações polarográficas (IBRAHIN e EL-ENANY, 2003a; IBRAHIN e EL-ENANY, 2003b; MERTIN e LIPPOLD, 1997) e cromatográficas (LEHR e DAMM, 1985; BELLIARDO *et al.*, 1991; COPPI e SILINGARDI, 1992; MYOUNG e CHOI, 2003).

Nas determinações cromatográficas de ciclopirox olamina, onde se faz uso de sílica como fase estacionária, pode ocorrer problemas de adsorção do fármaco nesta fase, resultando em

curvas de calibração não-lineares (BELLIARDO *et al.*, 1991; LEHR e DAMM, 1985; GAGLIARDI *et al.*, 1998).

A literatura consultada não preconiza o Ensaio Microbiológico para a avaliação da potência do ciclopirox olamina, entretanto encontram-se publicações que descrevem a determinação de sua concentração inibitória mínima frente a uma ampla variedade de microrganismos (POLAK *et al.*, 2004; MUNOZ *et al.*, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetiva desenvolver e validar metodologias de análise para a determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.

3.2 Objetivos específicos

- desenvolver e validar procedimento analítico por CLAE, com detecção na região do ultravioleta, para a determinação do ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica;
- desenvolver e validar procedimento analítico empregando Ensaio Microbiológico de potência, utilizando o método por difusão em ágar e meio de cultura n° 19, para a determinação do ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica;
- desenvolver e validar procedimento analítico empregando Ensaio Microbiológico de potência, utilizando o método por difusão em ágar e meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, para a determinação do ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica;
- realizar análise estatística comparativa das metodologias desenvolvidas para determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substância química de referência (SQR)

Utilizou-se como SQR ciclopirox olamina produzido pela Farmacopéia Americana, tendo como número de catálogo 1134030, lote HOC207.

4.1.2 Matéria-prima

Utilizou-se o ciclopirox olamina matéria-prima de procedência chinesa, fabricado por Changzhou Cmwin, em 06/2004, lote original 20040601, distribuído pela empresa EmbraFarma Expertise, lote interno 4894, fracionado em 19/08/2004 e com validade até 06/2007.

4.1.3 Forma farmacêutica

Utilizaram-se amostras de solução tópica de ciclopirox olamina*, na concentração de 10 mg/ml, adquiridas no comércio local e que continham como veículo macrogol 400, álcool isopropílico e água purificada.

4.1.4 Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck)

*Loprox® produzido por Aventis Pharma Ltda, lote 500389, fabricado em 02/2005, com validade até 01/2008.

- Fosfato de potássio monobásico PA-ACS (Synth)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) PA-ACS (Synth)
- Hidróxido de sódio PA (Merck)
- Trietilamina PA (Merck)
- Hexano PA (Merck)
- Metanol PA (Merck)
- Metanol grau cromatográfico (Merck)
- Ácido fosfórico (Merck)
- Dimetilsulfato PA (Vetec)
- Água purificada Milli-Q
- Solução tampão pH 4,0 (Merck)
- Solução tampão pH 7,0 (Merck)
- Meio Yeast Medium agar (YMA) (Difco)
- Meio Antibiótico n° 19 (Difco)
- Meio Sabouraud Dextrose ágar (Merck)

4.1.5 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Bosch SAE 200
- Lavadora ultrasônica Unique USC 1400
- Autoclave Phenix
- Bomba de vácuo Primatec
- Câmara ultravioleta Byko Spectra
- Espectrofotômetro Espectronic Genesys 2
- Cubetas de quartzo 10 mm Helma 100 QS
- Membrana filtrante acetato de celulose 0,45 μ m, 47 mm Sartorius
- Membrana filtrante de nylon 0,45 μ m, 47 mm Wathman
- Kit de filtração Millipore
- Pipetador automático Trasferpette Brand 20-200 μ l
- Pipetador automático Transferpette Brand 0,5-5 ml

- Paquímetro digital Starrett
- Potenciômetro digital Schott FieldLAB pH
- Purificador de água Milli-Q Millipore
- Estufa digital ECB
- Membrana filtrante Minisart RC Millipore
- Vórtex Phoenix AP-56
- Forno para coluna CTO 10 Asvp Shimadzu
- Coluna LiChroCART 250-4 LiChrospher RP-18e Merck
- Pré-coluna LiChrospher RP-18e Merck
- Cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 Avp, controlador SLC-10Avp, integrador automático computadorizado com software Class VP® e injetor automático SIL-10Avp.

4.2 Metodologia

4.2.1 Introdução

A escolha de um procedimento analítico adequado requer a avaliação de múltiplos fatores, como a estrutura química e as propriedades físico-químicas do fármaco. Deve-se, também, considerar as disponibilidades econômicas de equipamentos e reagentes.

A utilização de dados analíticos não confiáveis pode conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um procedimento denominado validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A literatura consultada apresenta definições variadas de validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração das agências reguladoras. Conforme a Resolução da ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003, “a

validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003).

Os parâmetros para a validação dos métodos têm sido definidos por diversas organizações nacionais e internacionais. Algumas definições estabelecidas pelas organizações diferem entre si. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi procedida através do ICH - International Conference on Harmonization (RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 1996).

A validação dos métodos analíticos propostos neste estudo foi baseada nas diretrizes da USP 29 (2006), ICH (1996) e da Resolução RE n° 899 (BRASIL, 2003). Conforme estes guias, os principais parâmetros a serem avaliados são:

→ Linearidade: é a habilidade de produzir resultados que são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, num determinado intervalo. É recomendado que sua determinação seja realizada através de, no mínimo, cinco concentrações. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, como o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

→ Exatidão: representa a concordância entre os valores obtidos de um teste, utilizando-se um método específico, e o valor verdadeiro. A medida da exatidão é obtida pela comparação dos resultados obtidos com a análise de uma substância padrão ou com um segundo e bem caracterizado método. Pode ser avaliada, também, através de amostras contendo quantidades conhecidas de substância química de referência.

→ Precisão: é a medida da concordância entre os resultados individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente às múltiplas alíquotas de uma mesma amostra homogênea. A precisão deve ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser realizada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas de cada, ou a partir de um mínimo de seis determinações a 100% da concentração de trabalho. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em

diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através do coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR).

→ Especificidade: é a habilidade de um procedimento de correlacionar-se inequivocadamente com o analito na presença de componentes os quais se espera que possam estar presentes no ensaio. Esses interferentes são representados por impurezas, produtos de degradação, excipientes ou análogos.

→ Robustez: corresponde à capacidade do método de não ser afetado por pequenas modificações nas condições analíticas.

4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.2.1 Descrição dos parâmetros utilizados

O objetivo do estudo foi desenvolver um método simples e rápido por CLAE-UV para determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.

Encontrou-se na literatura estudos para a determinação do ciclopirox olamina em plasma, utilizando colunas em fase reversa (LEHR e DAMM, 1985; COPPI e SILINGARDI, 1992). Igualmente foram encontrados estudos para a determinação do fármaco em formas farmacêuticas líquidas de aplicação cutânea (BELLIARDO *et al.*, 1991; GAGLIARDI *et al.*, 1998).

Avaliando-se as condições de trabalho das determinações cromatográficas descritas na literatura, e após testes e modificações, foram estabelecidos os parâmetros de trabalho descritos na Tabela 3.

TABELA 3 - Parâmetros utilizados para a execução do método por CLAE-UV.

Parâmetros	Descrição
Coluna	LiChroCart 250 x 4 mm RP-18e (5µm) Merck
Pré-coluna	LiChrosphere RP-18e Merck
Fase móvel	Acetonitrila : água 1:1 (V/V)
Vazão	1,0 ml/minuto
Comprimento de onda	305 nm
Temperatura do forno da coluna	30 °C
Volume injetado	20 µl

A fase móvel foi preparada por mistura, na proporção de 1:1 (V/V), de acetonitrila e água grau cromatográfico. A mistura foi filtrada através de membrana de nylon, com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, e desgaseificada em banho de ultrassom, durante 15 minutos.

As soluções das amostras e da SQR foram filtradas previamente em membrana filtrante de porosidade 0,45 µm.

A coluna cromatográfica foi previamente condicionada, através da passagem de fase móvel, por um período de, no mínimo, 30 minutos, na vazão de 1,0 ml/min. Após a estabilização do sistema, foram injetados 20 µl de soluções amostra e SQR.

4.2.2.2 Derivatização pré-coluna

A reação de derivatização do ciclopirox olamina é um passo necessário devido à sua propriedade complexante (LEHR e DAMM, 1985).

Para a derivatização do ciclopirox olamina, efetuou-se:

- Substância química de referência:

Transferiu-se para tubo de ensaio 1 ml de solução NaOH 0,1 M, 2 ml de padrão de ciclopirox olamina diluído em fase móvel na concentração de 1 mg/ml e 200 µl de dimetilsulfato.

Agitou-se em vórtex para a completa mistura dos reagentes e deixou-se a solução em banho-maria, a 37 °C, por 20 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 200 µl de trietilamina. Submeteu-se a mistura à nova agitação em vórtex e a amostra foi diluída em fase móvel até a concentração requerida, filtrada e injetada no sistema cromatográfico.

- Matéria-prima:

Transferiu-se para tubo de ensaio 1 ml de solução NaOH 0,1 M, 2 ml de ciclopirox olamina matéria-prima diluído em fase móvel na concentração de 1 mg/ml e 200 µl de dimetilsulfato. Agitou-se em vórtex para a completa mistura dos reagentes e deixou-se a solução em banho-maria, a 37 °C, por 20 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 200 µl de trietilamina. Submeteu-se a mistura à nova agitação em vórtex e a amostra foi diluída em fase móvel até a concentração requerida, filtrada e injetada no sistema cromatográfico.

- Solução tópica:

Transferiu-se para tubo de ensaio 1 ml de solução NaOH 0,1 M, 2 ml de ciclopirox olamina solução tópica diluído em fase móvel na concentração de 1 mg/ml e 200 µl de dimetilsulfato. Agitou-se em vórtex para a completa mistura dos reagentes e deixou-se a solução em banho-maria, a 37 °C, por 20 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 200 µl de trietilamina. Submeteu-se a mistura à nova agitação em vórtex e a amostra foi diluída em fase móvel até a concentração requerida, filtrada e injetada no sistema cromatográfico.

4.2.2.3 Preparação da curva analítica

Pesou-se, analiticamente, o equivalente a 100 mg de ciclopirox olamina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e diluiu-se com fase móvel, de modo a obter solução padrão na concentração de 1 mg/ml. Transferiu-se 2 ml dessa solução para tubo de ensaio e seguiu-se o processo de derivatização, conforme descrito no item 4.2.2.2. Após, a solução resultante foi diluída até às concentrações de 0,4; 1,0; 4,0; 10; 40; 80; 100 e 200 µg/ml, utilizando-se como

diluyente a fase móvel. Na Tabela 4, encontram-se as diluições e as concentrações finais do ciclopirox olamina padrão empregadas na curva de calibração.

TABELA 4 – Concentrações finais da solução padrão para obtenção da curva de calibração de ciclopirox olamina por CLAE-UV.

Soluções	Volume da solução de		Volume final do balão (ml)	Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)
	ciclopirox olamina 200 $\mu\text{g/ml}$ (ml)	Volume do diluyente (ml)		
1	0,2	99,8	100	0,4
2	0,5	99,0	100	1,0
3	2	98,0	100	4,0
4	5	95,0	100	10
5	20	80,0	100	40
6	20	30,0	50	80
7	25	25,0	50	100

As curvas de calibração foram realizadas em triplicata e em três dias diferentes ($n=9$). As médias das áreas absolutas, correspondentes a cada diluição do padrão, foram plotadas em gráfico com as concentrações ($\mu\text{g/ml}$) nas ordenadas e as áreas absolutas nas abcissas.

A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise da regressão linear, através do método dos mínimos quadrados. As áreas absolutas utilizadas na determinação da curva de calibração foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA).

4.2.2.4 Cálculo para determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica

A concentração de ciclopirox olamina nas amostras foi determinada pela seguinte equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_P) / A_P$$

Onde:

A_A = área absoluta da amostra;

A_P = área absoluta do padrão;

C_A = concentração do ciclopirox olamina ($\mu\text{g/ml}$);

C_P = concentração do ciclopirox olamina padrão ($\mu\text{g/ml}$).

O valor percentual de ciclopirox olamina foi calculado pela equação:

$$C_A \% = C_A \cdot 100 / C_T$$

Onde:

$C_A \%$ = concentração da amostra em porcentagem;

C_A = concentração do ciclopirox olamina na amostra ($\mu\text{g/ml}$);

C_T = concentração teórica do ciclopirox olamina na amostra ($\mu\text{g/ml}$).

4.2.2.5 Especificidade

A especificidade do método analítico foi avaliada através de estudos de degradação forçada da SQR em condições hidrolíticas (ácida e alcalina), oxidantes (H_2O_2 30 volumes) e fotolíticas (luz UV 254 nm).

- Preparação da SQR nas condições normais: pesou-se, analiticamente, o equivalente a 0,05 g de ciclopirox olamina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e diluiu-se com fase móvel, de modo a obter a concentração final de 1 mg/ml; seguiu-se, após, o processo de derivatização da amostra conforme descrito no item 4.2.2.2. Após, diluiu-se até a concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$, com o mesmo solvente.

- Preparação da solução em condições de hidrólise alcalina: pesou-se, analiticamente, o equivalente a 0,05 g de ciclopirox olamina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e

diluiu-se com hidróxido de sódio 1 M, de modo a obter-se a concentração final de 1 mg/ml. Esta solução foi submetida à temperatura de 80 °C, por período de 4 horas. Decorrido este tempo, retirou-se alíquota de 2 ml da solução e neutralizou-se com 2 ml de ácido clorídrico 1 M, seguindo o processo de derivatização da amostra, conforme descrito no item 4.2.2.2. Após, diluiu-se até a concentração de 40 µg/ml, utilizando fase móvel como diluente.

- Preparação da solução em condições de hidrólise ácida: pesou-se, analiticamente, o equivalente a 0,05 g de ciclopirox olamina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml, adicionou-se 5 ml de fase móvel e completou-se o volume do balão com solução de ácido clorídrico 1 M, obtendo-se concentração final de 1 mg/ml. Esta solução foi submetida à temperatura de 80 °C, por 4 horas. Decorrido este tempo, retirou-se alíquota de 2 ml da solução e neutralizou-se com 2 ml de hidróxido de sódio 1 M, seguindo o processo de derivatização da amostra, conforme descrito no item 4.2.2.2. Após, diluiu-se até a concentração de 40 µg/ml, utilizando fase móvel como diluente.

- Preparação da solução em condições oxidantes: pesou-se, analiticamente, o equivalente a 0,05 g de ciclopirox olamina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e diluiu-se com o emprego de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes, obtendo-se concentração final de 1 mg/ml. Esta solução foi colocada em repouso, por período de 4 horas, sob a proteção da luz e à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, retirou-se alíquota de 2 ml da solução e neutralizou-se com 2 ml de ácido clorídrico 1 M, seguindo o processo de derivatização da amostra, conforme descrito no item 4.2.2.2. Após, diluiu-se até a concentração de 40 µg/ml, utilizando fase móvel como diluente.

- Preparação da solução em condições fotolíticas: pesou-se, analiticamente, o equivalente a 0,05 g de ciclopirox olamina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e diluiu-se com fase móvel até a concentração de 1 mg/ml. Esta solução foi transferida para recipiente transparente à luz UV e submetida a esta radiação, em 254 nm, a uma distância de 40 cm da fonte. Após período de 4 horas, retirou-se alíquota de 2 ml da solução, neutralizou-se com 2 ml de ácido

clorídrico 1 M, seguindo o processo de derivatização da amostra, conforme descrito no item 4.2.2.2. Após, diluiu-se até a concentração de 40 µg/ml, utilizando fase móvel como diluente.

As soluções descritas acima foram testadas nas condições descritas no item 4.2.2.1.

4.2.2.6 Exatidão

Este procedimento tem por finalidade determinar a exatidão do método por meio da adição de quantidades conhecidas de SQR às soluções de amostra.

Para a exatidão prepararam-se soluções amostra e padrão na concentração de 200 µg/ml, utilizando fase móvel como diluente.

A exatidão foi realizada em triplicata e procedeu-se da mesma forma tanto para a matéria-prima como para a solução tópica.

Transferiu-se 5 ml da solução amostra, na concentração de 200 µg/ml, para cinco balões volumétricos de 50 ml. Aos mesmos balões adicionaram-se, respectivamente, 2,5 ml; 5,0 ml; 7,5 ml e 10,0 ml da solução de SQR contendo 200 µg/ml. Os volumes finais foram completados com fase móvel, para obter as concentrações teóricas finais de 20 µg/ml; 30 µg/ml; 40 µg/ml; 50 µg/ml e 60 µg/ml, respectivamente, conforme Tabela 5.

TABELA 5 – Diluições realizadas para a exatidão para ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de CLAE-UV.

Balões	Volume de amostra (ml) 200 µg/ml	Volume do padrão (ml) 200 µg/ml	Volume de diluente (ml)	Concentração teórica final (µg/ml)
A	5,0	-----	45	20
R1	5,0	2,5	42,5	30
R2	5,0	5,0	40	40
R3	5,0	7,5	37,5	50
R4	5,0	10,0	35	60

As porcentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão (USP 29, 2006):

$$R\% = \{(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}\} \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de ciclopirox olamina na amostra adicionada de SQR;

C_{NA} = concentração de ciclopirox olamina na amostra não adicionada de SQR;

C_{SQR} = concentração de SQR adicionada à amostra.

4.2.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas variações nas condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.1.

Alteraram-se os seguintes parâmetros da metodologia analítica: proporção da mistura da fase móvel para acetonitrila: água 3:2 (V/V), vazão para 0,7 ml/min e comprimento de onda para 300 nm.

As amostras testadas nestas condições foram preparadas na concentração de 40 µg/ml e derivatizadas conforme descrito no item 4.2.2.2.

4.2.2.8 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do coeficiente de variação percentual (CV%) obtido, na determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade do método, foram realizadas seis determinações de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração teórica de 40 µg/ml, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais.

A precisão intermediária foi avaliada através da determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração teórica de 40 µg/ml, em três dias diferentes.

4.2.3 Ensaio Microbiológico por difusão em ágar - cilindro em placa

A atividade de fármacos antimicrobianos pode ser demonstrada, sob condições adequadas, através de seu efeito inibitório sobre os microrganismos (USP 29, 2006).

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar Ensaio Microbiológico por difusão em ágar-cilindro em placa, utilizando delineamento 3x3, para determinação quantitativa de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica. Foram desenvolvidos dois ensaios distintos, conforme segue.

4.2.3.1 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19

4.2.3.1.1 Preparo dos materiais

Empregaram-se placas de Petri com 20 mm de altura por 100 mm de diâmetro e cilindros de aço inoxidável com diâmetro externo de 8 mm e interno de 6 mm x 10 mm de altura. Toda a vidraria utilizada no procedimento foi previamente esterilizada a 200 - 220 °C, em estufa, por um período de 2 horas (CODE of Federal Regulation, 1996; FARMACOPÉIA Brasileira, 1988).

4.2.3.1.2 Preparo dos meios de cultura e diluentes

No Ensaio Microbiológico foram utilizados os meios YMA para manutenção do microrganismo *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collections) 10231 e o meio de cultura n° 19 para o repique do microrganismo e ensaio de potência. Os meios foram preparados de acordo com as indicações do fabricante, conforme composição abaixo e posteriormente autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

A solução tampão pH 7,2, utilizada como diluente, foi preparada segundo indicações da Farmacopéia Brasileira (1988).

Meio YMA

- Extrato de levedura..... 9,4 g
- Extrato de malte..... 2,4 g
- Peptona..... 5,0 g
- Dextrose..... 10,0 g
- Ágar..... 20,0 g
- Água..... qsp. 1000 ml

pH após a esterilização: $6,2 \pm 0,2$ à 25 °C.

Meio para antibiótico n° 19

Peptona.....	9,4 g
Extrato de carne.....	2,4 g
Extrato de levedura.....	4,7 g
Dextrose.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	10,0 g
Ágar.....	23,5 g
Água.....	qsp. 1000 ml
pH após esterilização: $6,1 \pm 0,1$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.	

4.2.3.1.3 Padronização do método

Os parâmetros utilizados para a realização do Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19 estão descritos na Tabela 6.

TABELA 6 – Parâmetros utilizados na avaliação da potência de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n°19.

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Meio de cultura	Meio de cultura para antibiótico n° 19
Volume de meio de cultura em cada placa	8 ml
Concentração de padrão e amostra	56, 84 e 126 $\mu\text{g/ml}$
Temperatura de incubação	$25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
Tempo de incubação	48 horas
Solução diluente	Tampão fosfato pH 7,2
Concentração do inóculo	1%

4.2.3.1.4 Preparação do inóculo

Repicou-se o microrganismo com auxílio de alça de platina, para tubo contendo 10 ml de meio de cultura n° 19 inclinado e incubou-se a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por período de 48 horas. Após, adicionou-se 3 ml de solução fisiológica estéril no tubo, lavando-se o crescimento microbiano e transferindo-o para frasco de Roux contendo 250 ml de meio de cultura n° 19, inclinado. Incubou-se nas mesmas condições citadas anteriormente. O crescimento ocorrido na superfície foi lavado com 50 ml de solução fisiológica estéril.

A padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 580 nm, diluindo-se a suspensão fúngica com solução fisiológica estéril até obter transmitância na faixa de $25\% \pm 2\%$. A partir desta suspensão, foi preparado o meio de cultura n° 19 inoculado a 1%.

4.2.3.1.5 Preparo da solução de ciclopirox olamina SQR

Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 0,05 g de SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com dimetilsulfóxido (DMSO), de modo a obter solução com concentração final de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 56, 84 e 126 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2.

4.2.3.1.6 Preparo da solução de ciclopirox olamina matéria-prima

Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 0,05 g de Ciclopirox olamina matéria-prima, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com DMSO, de modo a obter solução com concentração final de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 56, 84 e 126 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2.

4.2.3.1.7 Preparo da solução de ciclopirox olamina solução tópica

Transferiram-se 5 ml do conteúdo do frasco de solução tópica (Loprox® 10 mg/ml), com auxílio de pipeta de vidro calibrada, para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com DMSO, de modo a obter uma solução com concentração final de 1000 µg/ml. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 56, 84 e 126 µg/ml, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2.

4.2.3.1.8 Ensaio

Utilizaram-se seis placas de Petri para cada ensaio. Após a esterilização, transferiu-se para cada uma delas 8 ml de meio de cultura n° 19, inoculado a 1% com a suspensão padronizada do microrganismo teste. Após a solidificação da camada semeada, adicionaram-se seis cilindros em cada placa, com intervalo aproximado de 60° e raio de 2,8 cm. Transferiu-se para os cilindros, com auxílio de pipetador automático, 200 µl de cada uma das soluções amostra e padrão. As placas foram incubadas durante 48 horas a 25 °C ± 2 °C. A seguir, foi realizada a medida dos diâmetros dos halos de inibição, utilizando-se paquímetro digital. Foram realizados dez ensaios de potência microbiológica.

4.2.3.1.9 Cálculos

As médias das leituras dos halos de inibição, correspondentes a cada concentração, foram plotadas em gráfico, em papel milimetrado semilogarítimo, com os valores dos halos de inibição nas abcissas e o logaritmo das concentrações nas ordenadas. A equação da reta, para a representação gráfica da curva de calibração, foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.3.1.10 Validação do método analítico

4.2.3.1.10.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de três níveis de concentração (56; 84 e 126 $\mu\text{g/ml}$). As soluções de ciclopirox olamina SQR foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3.1.5. As curvas de calibração foram reproduzidas em três dias diferentes.

As médias das leituras dos halos de inibição, correspondentes a cada concentração, foram plotadas em gráfico de halos de inibição versus logaritmo da concentração. A equação da reta, para a representação gráfica da curva de calibração, foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.3.1.10.2 Exatidão

Para a exatidão preparou-se solução do ciclopirox olamina SQR e das amostras (matéria-prima e solução tópica) na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente DMSO. A partir desta solução, preparou-se uma segunda diluição, na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2. Foram transferidas alíquotas de 10,5 ml das soluções amostra (matéria-prima e solução tópica), para quatro balões de 25 ml, os quais foram identificados como A, R1, R2 e R3. Aos balões R1, R2 e R3 foram adicionados, respectivamente, 1,05 ml; 2,1 ml e 3,15 ml da solução de SQR de 200 $\mu\text{g/ml}$. Os volumes finais foram completados com tampão fosfato pH 7, 2, para obter as concentrações teóricas finais de 84 $\mu\text{g/ml}$; 92,4 $\mu\text{g/ml}$; 100,8 $\mu\text{g/ml}$ e 109,2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente para os balões A, R1, R2 e R3, conforme Tabela 7.

TABELA 7 – Diluições realizadas para a exatidão de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.

Balões	Volume da amostra de 200 µg/ml (ml)	Volume da solução SQR de 200 µg/ml (ml)	Volume de diluente (ml)	Concentração teórica final (µg/ml)
A	10,5	-----	14,5	84
R1	10,5	1,05	13,45	92,4
R2	10,5	2,1	12,4	100,8
R3	10,5	3,15	11,35	109,2

O teste foi realizado em triplicata, segundo descrito no item 4.2.3.1.8. As porcentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão (USP 29, 2006):

$$R\% = \{(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}\} \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de ciclopirox olamina na amostra adicionada de SQR;

C_{NA} = concentração de ciclopirox olamina na amostra não adicionada de SQR;

C_{SQR} = concentração de SQR adicionada à amostra.

4.2.3.1.10.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do coeficiente de variação percentual obtido, na determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade do método, foram realizadas seis determinações de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração teórica de 84 µg/ml, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais.

A precisão intermediária foi avaliada através da determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração teórica de 84 µg/ml, em dois dias diferentes.

4.2.3.2 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar

4.2.3.2.1 Preparo dos materiais

Empregaram-se placas de Petri com 20 mm de altura por 100 mm de diâmetro e cilindros de aço inoxidável com diâmetro externo de 8 mm e interno de 6 mm x 10 mm de altura. Toda a vidraria utilizada no procedimento foi, previamente, esterilizada a 200 - 220 °C, em estufa, por um período de 2 horas (CODE of Federal Regulation, 1996; FARMACOPÉIA Brasileira, 1988).

4.2.3.2.2 Preparo dos meios de cultura e diluentes

No Ensaio Microbiológico foram utilizados os meios YMA para manutenção do microrganismo *Candida albicans* ATCC 10231, o meio antibiótico n° 19 para o repique do microrganismo e o meio ágar Sabouraud-dextrose 4% para o Ensaio de potência. Os meios foram preparados de acordo com as indicações do fabricante, conforme composição abaixo e posteriormente autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

A solução tampão pH 7,2, utilizada como diluente, foi preparada segundo indicações da Farmacopéia Brasileira (1988).

Meio Sabouraud-dextrose ágar 4%

- Peptona..... 10,0 g
 - Ágar..... 15,0 g
 - D(+) glucose..... 40,0 g
 - Água..... qsp. 100 ml
- pH após esterilização: $5,6 \pm 0,2$ a 25 °C.

4.2.3.2.3 Padronização do método

Os parâmetros utilizados para a realização do Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar estão descritos na Tabela 8.

TABELA 8 – Parâmetros utilizados na avaliação da potência de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Meio de cultura	Sabouraud-dextrose 4% ágar
Volume de meio de cultura em cada placa	15 ml
Concentração de padrão e amostra	60; 90 e 135 µg/ml
Temperatura de incubação	25 °C ± 2 °C
Tempo de incubação	48 horas
Solução diluente	Tampão fosfato pH 7,2
Concentração do inóculo	1%

4.2.3.2.4 Preparação do inóculo

Repicou-se o microrganismo com auxílio de alça de platina, para tubo contendo 10 ml de meio antibiótico n° 19 inclinado e incubou-se a 25 °C ± 2 °C, por período de 48 horas. Após, adicionou-se 3 ml de solução fisiológica estéril no tubo, lavando-se o crescimento microbiano e transferindo-o para frasco de Roux contendo 250 ml de meio antibiótico n° 19, inclinado. Incubou-se nas mesmas condições citadas anteriormente. O crescimento ocorrido na superfície foi lavado com 50 ml de solução fisiológica estéril.

A padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm, diluindo-se a suspensão fúngica com solução fisiológica estéril até obter

transmitância na faixa de $25 \% \pm 2 \%$. A partir desta suspensão, foi preparado o meio de cultura ágar Sabouraud dextrose 4% inoculado a 1%.

4.2.3.2.5 Preparo da solução de ciclopirox olamina SQR

Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 0,05 g de SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com dimetilsulfóxido (DMSO), de modo a obter solução com concentração final de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 60, 90 e 135 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2.

4.2.3.2.6 Preparo da solução de ciclopirox olamina matéria-prima

Pesou-se, analiticamente, quantidade equivalente a 0,05 g de Ciclopirox olamina matéria-prima, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com DMSO, de modo a obter solução com concentração final de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 60, 90 e 135 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2.

4.2.3.2.7 Preparo da solução de ciclopirox olamina solução tópica

Transferiram-se 5 ml do conteúdo do frasco de solução tópica (Loprox® 10 mg/ml), com auxílio de pipeta de vidro calibrada, para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com DMSO, de modo a obter uma solução com concentração final de 1000 $\mu\text{g/ml}$. A partir desta solução, foram preparadas as concentrações de 60, 90 e 135 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2.

4.2.3.2.8 Ensaio

Utilizaram-se seis placas de Petri para cada ensaio. Após a esterilização, transferiu-se para cada uma delas 15 ml de meio ágar Sabouraud-dextrose 4% inoculado a 1% com a suspensão padronizada do microrganismo teste. Após a solidificação da camada semeada, adicionaram-se seis cilindros em cada placa, com intervalo aproximado de 60° e raio de 2,8 cm. Transferiu-se para os cilindros, com auxílio de pipetador automático, 200 µl de cada uma das soluções amostra e padrão. As placas foram incubadas durante 48 horas a 25 °C ± 2 °C. A seguir, foi realizada a medida dos diâmetros dos halos de inibição, utilizando-se paquímetro digital. Foram realizados dez ensaios de potência microbiológica.

4.2.3.2.9 Cálculos

As médias das leituras dos halos de inibição, correspondentes a cada concentração, foram plotadas em gráfico, em papel milimetrado semilogarítmico, com os valores dos halos de inibição nas abscissas e o logaritmo das concentrações nas ordenadas. A equação da reta, para a representação gráfica da curva de calibração, foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.3.2.10 Validação do método analítico

4.2.3.2.10.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de três níveis de concentração (60; 90 e 135 µg/ml). As soluções padrões de ciclopirox olamina foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3.2.5. As curvas de calibração foram reproduzidas em três dias diferentes.

As médias das leituras dos halos de inibição, correspondentes a cada concentração, foram plotadas em gráfico de halos de inibição versus logaritmo da concentração. A equação da reta,

para a representação gráfica da curva de calibração, foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.3.2.10.2 Exatidão

Para a exatidão preparou-se solução do ciclopirox olamina SQR e das amostras (matéria-prima e solução tópica) na concentração de 1000 µg/ml, utilizando-se como diluente DMSO. A partir desta solução, preparou-se uma segunda diluição, na concentração de 200 µg/ml, utilizando-se como diluente tampão fosfato pH 7,2. Foram transferidas alíquotas de 11,25 ml das soluções amostra (matéria-prima e solução tópica), para quatro balões de 25 ml, os quais foram identificados como A, R1, R2 e R3. Aos balões R1, R2 e R3 foram adicionados, respectivamente, 1,125 ml; 2,25 ml e 4,5 ml da solução de SQR de 200 µg/ml. Os volumes finais foram completados com tampão fosfato pH 7, 2, para obter as concentrações teóricas finais de 90 µg/ml; 99 µg/ml; 108 µg/ml e 117 µg/ml, respectivamente para os balões A, R1, R2 e R3, conforme Tabela 9.

TABELA 9 – Diluições realizadas para a exatidão de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Balões	Volume da amostra de 200 µg/ml (ml)	Volume da solução SQR de 200 µg/ml (ml)	Volume de diluente (ml)	Concentração teórica final (µg/ml)
A	11,25	-----	13,75	90
R1	11,25	1,125	12,625	99
R2	11,25	2,25	11,5	108
R3	11,25	3,375	10,375	117

O teste foi realizado em triplicata, segundo descrito no item 4.2.3.2.8. As porcentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão (USP 29, 2006):

$$R\% = \{(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}\} \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de ciclopirox olamina na amostra adicionada de SQR;

C_{NA} = concentração de ciclopirox olamina na amostra não adicionada de SQR;

C_{SQR} = concentração de SQR adicionada à amostra.

4.2.3.2.10.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do coeficiente de variação percentual obtido, na determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

Na repetibilidade do método, foram realizadas seis determinações de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração teórica de 90 µg/ml, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais.

A precisão intermediária foi avaliada através da determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração teórica de 90 µg/ml, em dois dias diferentes.

5. RESULTADOS

5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

A adequabilidade do sistema cromatográfico foi avaliada através da avaliação da assimetria do pico do ciclopirox olamina, que apresentou valores menores que 2.0, assim como pela avaliação do coeficiente de variação percentual (CV%) do tempo de retenção e da área do ciclopirox olamina padrão, que resultaram em valores menores que 2%.

5.1.2 Obtenção da curva de calibração

A linearidade do método foi determinada pela construção da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, no intervalo de 0,4 a 200 µg/ml.

Na Tabela 10 estão representados os valores experimentais médios das áreas absolutas obtidas para a curva de calibração do ciclopirox olamina.

TABELA 10 – Valores das áreas absolutas para a curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de CLAE-UV.

Concentração µg/ml	Áreas absolutas*			Área média ± desvio padrão	CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
0,4	15389	15604	15474	15489 ± 108,28	0,70
1,0	37435	38213	37185	37611 ± 536,12	1,43
4,0	153800	154968	152305	153691 ± 1334,84	0,87
10	335045	336004	338275	336441,33 ± 1658,82	0,49
40	1388833,5	1398966	1388724	1392174,5 ± 5881,87	0,42
80	2797647,5	2738346,6	2755323,3	2763772,47 ± 30539,98	1,11
100	3562822	3559036	3515853,3	3545903,77 ± 26093,22	0,74
200	6789682	7031706,5	6916456	6912614,83 ± 21057,96	1,75

* Cada valor corresponde à média de três determinações.

A representação gráfica da curva de calibração e a equação da reta, determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, estão representadas na Figura 2.

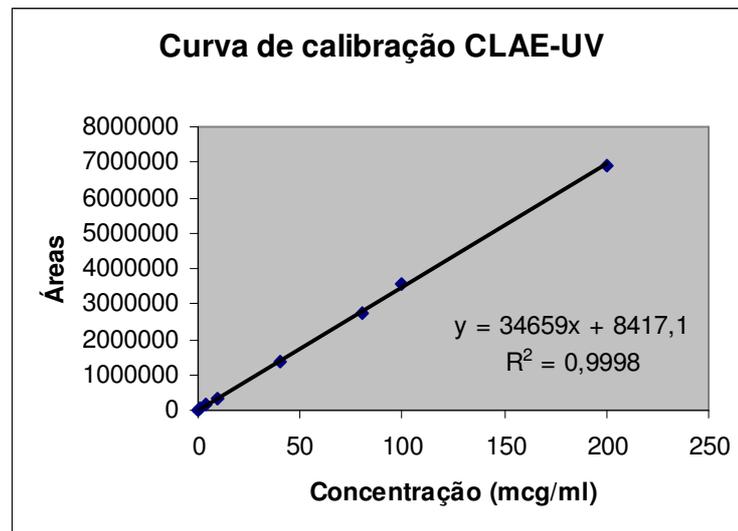


FIGURA 2 – Representação gráfica da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, obtida através de CLAE-UV e sua respectiva equação da reta.

Os resultados do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão, através da análise de variância (ANOVA), encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de CLAE-UV.

Análise estatística ANOVA					
FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA	F.C	F.T
Entre	7	1,2406E+14	1,77228E+13	8694,048499	2,74*
Regressão linear	1	1,2404E+14	1,2404E+14	60848,5388	4,49*
Desvio de linearidade	6	1,9979E+10	3329787654	1,633449274	2,74**
Resíduo	16	3,2616E+10	2038500801		
Total	23	1,24092E+14			

*Significativo para $p > 0,05$
 ** Não significativo para $p > 0,05$

Alguns cromatogramas obtidos para ciclopirox olamina SQR estão representados nas Figuras 3, 4 e 5. Cada ponto da curva de calibração foi analisado em triplicata.

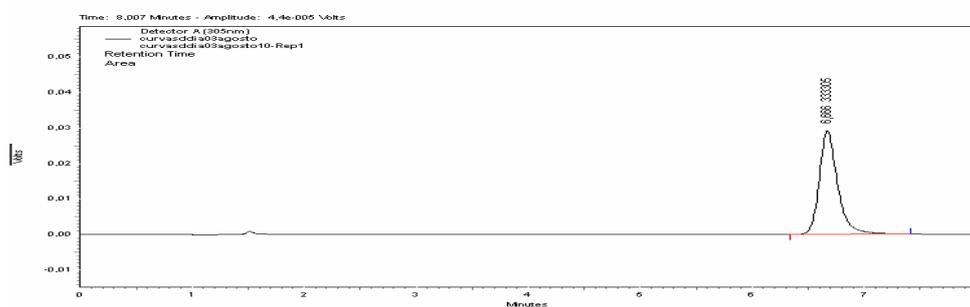


Figura 3 – Cromatograma obtido para ciclopirox olamina SQR, na concentração de 10 µg/ml.

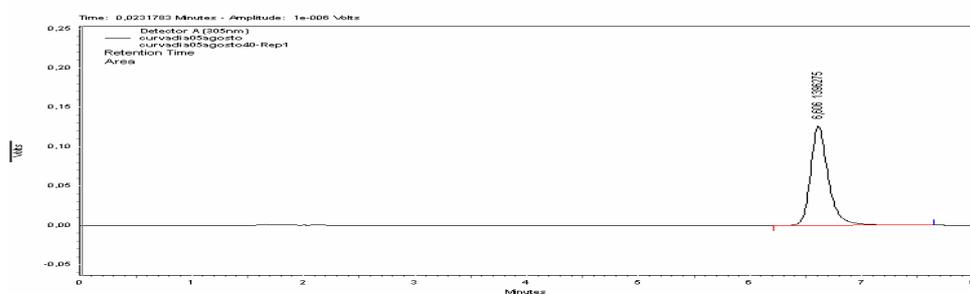


Figura 4 – Cromatograma obtido para ciclopirox olamina SQR, na concentração de 40 µg/ml.

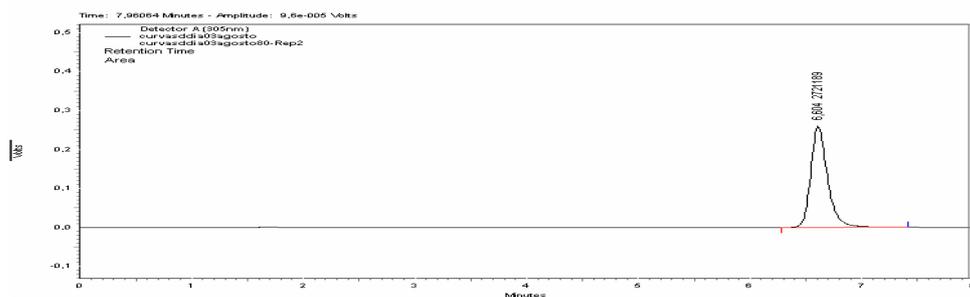


Figura 5 – Cromatograma obtido para ciclopirox olamina SQR, na concentração de 80 µg/ml.

5.1.3 Especificidade

O acompanhamento da degradação forçada da SQR de ciclopirox olamina foi realizado pela análise do teor, através do método por CLAE-UV desenvolvido neste trabalho. A solução de ciclopirox olamina SQR submetida a tratamento por ácido clorídrico 1 M, a 80 °C, durante 4 horas, demonstrou decréscimo de área de seu cromatograma. O teor médio percentual encontrado foi de 42,52% do teor da solução sem tratamento.

Em meio alcalino também se observou decréscimo na área do pico referente ao ciclopirox olamina SQR após 4 horas de tratamento com solução de hidróxido de sódio 1 M, a 80 °C. O teor médio percentual encontrado foi de 70,56% do teor da solução sem tratamento.

A solução de ciclopirox olamina SQR submetida a tratamento por peróxido de hidrogênio 30 volumes, a 80 °C, durante 4 horas, demonstrou decréscimo de área de seu cromatograma. O teor médio percentual encontrado foi de 68,18% do teor da solução sem tratamento.

Nas soluções de ciclopirox olamina SQR diluídas com fase móvel, em contato com luz UV (254 nm), não se observou degradação, após 4 horas de exposição, uma vez que o teor médio percentual obtido foi de 100,43% do teor da solução sem tratamento.

Os valores de tempo de retenção do pico referente ao ciclopirox olamina SQR não demonstraram mudanças significativas em nenhuma das condições de degradação (CV% 0,51), assim como não houve formação de picos adicionais.

5.1.4 Exatidão

5.1.4.1 Exatidão para ciclopirox olamina matéria-prima

Os resultados obtidos na exatidão de ciclopirox olamina matéria-prima, aplicando-se o método por CLAE-UV, estão demonstrados na Tabela 12.

TABELA 12 – Valores experimentais obtidos na exatidão, realizado em amostras de ciclopirox olamina matéria-prima, através de CLAE-UV.

Amostra	Quantidade de SQR adicionado (µg/ml)	Quantidade de SQR recuperada* (µg/ml)	% Recuperação	CV%
Ciclopirox olamina matéria-prima	10	10,04	100,40	0,93
	20	20,09	100,45	0,51
	30	29,96	99,86	0,75
	40	40,09	100,22	0,66

* Cada valor corresponde à média de três determinações.

5.1.4.2 Exatidão para ciclopirox olamina solução tópica

Os resultados obtidos na exatidão de ciclopirox olamina solução tópica, aplicando-se o método por CLAE-UV, estão demonstrados na Tabela 13.

TABELA 13 – Valores experimentais obtidos na exatidão, realizado em amostras de ciclopirox olamina solução tópica, através de CLAE-UV.

Amostra	Quantidade de SQR adicionado (µg/ml)	Quantidade de SQR recuperada* (µg/ml)	% Recuperação	CV%
Ciclopirox olamina solução tópica	10	10,06	100,60	1,22
	20	20,14	100,70	0,64
	30	30,07	100,23	0,65
	40	40,14	100,35	0,78

* Cada valor corresponde à média de três determinações.

5.1.5 Robustez

Os valores experimentais obtidos na determinação de ciclopirox olamina através do método por CLAE-UV, com modificações em seus parâmetros analíticos, estão representados na Tabela 14.

TABELA 14 - Alterações sofridas e valores experimentais obtidos durante a quantificação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na avaliação da robustez do método.

Parâmetros analíticos	Amostras de ciclopirox olamina	Valor encontrado*	
		µg/ml	Teor %
Fase móvel acetonitrila: água 6:4 (V/V)	Matéria-prima	39,67	99,18
	Solução tópica	39,58	98,95
Comprimento de onda 300 nm	Matéria-prima	40,42	101,05
	Solução tópica	40,89	102,23
Vazão: 0,7 ml/min	Matéria-prima	39,40	98,50
	Solução tópica	39,58	98,95

* Cada valor corresponde à média de três determinações.

5.1.6 Precisão

A precisão intermediária, para o método por CLAE-UV, foi avaliada através do doseamento de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, conforme item 4.2.3.9.3, em diferentes dias (n=3).

Os valores experimentais obtidos para a determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica por CLAE-UV encontram-se na Tabela 15.

TABELA 15 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de CLAE-UV, em diferentes dias.

Amostras de ciclopirox olamina	Dias	Concentração* µg/ml	Teor %	Teor médio ± desvio padrão	CV%
Matéria-prima	1	39,73	99,32	99,1 ± 0,40	0,41
	2	39,74	99,35		
	3	39,45	98,63		
Solução tópica	1	40,04	100,11	99,53 ± 0,60	0,60
	2	39,56	98,91		
	3	39,83	99,58		

* Cada valor corresponde à média de três determinações

Os valores experimentais obtidos para a determinação da repetibilidade para ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, pelo método de CLAE-UV, na concentração teórica de 40 µg/ml, encontram-se demonstrados na Tabela 16.

TABELA 16 – Valores experimentais obtidos para o doseamento de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de CLAE-UV, em um mesmo dia.

Amostra	Ciclopirox olamina matéria-prima		Ciclopirox olamina solução tópica	
	Teor (µg/ml)	%	Teor (µg/ml)	%
1	39,63	99,08	39,68	99,20
2	40,42	101,05	39,71	99,27
3	39,60	99,00	39,55	98,87
4	39,66	99,15	39,43	98,58
5	39,49	98,72	39,46	98,65
6	39,63	99,07	39,64	99,10
Média	99,35%		98,95%	
Desvio padrão	0,85		0,29	
CV%	0,86		0,29	

5.2 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19

5.2.1 Linearidade

A Tabela 17 apresenta os valores médios dos diâmetros dos halos de inibição, determinados pelo Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, obtidos para as soluções de ciclopirox olamina SQR, em diferentes concentrações.

TABELA 17 - Diâmetros médios dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetros médios dos halos de inibição*			Média \pm desvio padrão	CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
54	17,23	17,53	17,32	17,36 \pm 0,15	0,89
86	20,39	20,44	20,31	20,38 \pm 0,06	0,32
126	23,28	23,29	23,35	23,31 \pm 0,04	0,16

* Cada valor corresponde à média de seis placas

A representação gráfica da curva de calibração e a equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 6.

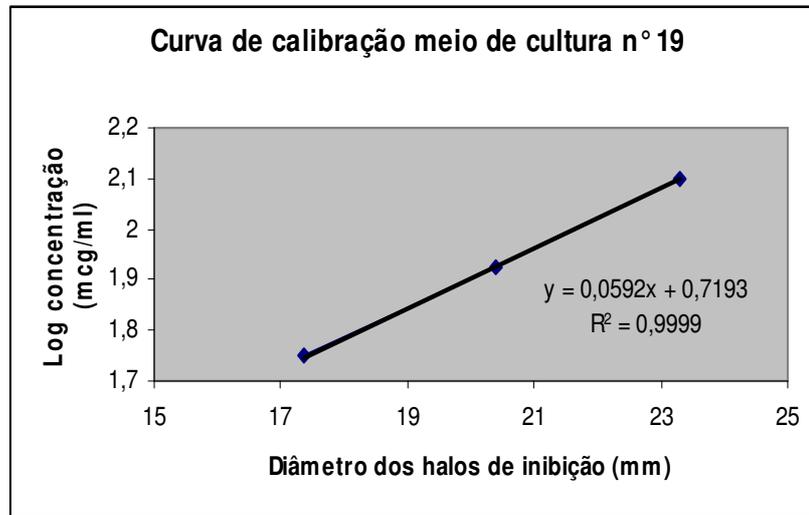


FIGURA 6 - Representação gráfica da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, obtida através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.

Os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração, através da análise de variância (ANOVA), estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 - Análise de variância (ANOVA) dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.

Análise estatística ANOVA					
FONTE DE VARIÇÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F.C	F.T
Entre doses	2	53,0486222	26,5243111	1351,74858*	9,55E+00*
Regressão linear	1	53,0442509	53,0442509	2703,27439*	1,013E+01*
Desvio de linearidade	2	0,0043713	0,0021857	0,11139**	9,550E+00**
Resíduo	3	0,0588667	0,0196222		
Total	5	53,10748889			

*Significativo para $p > 0,05$

** Não significativo para $p > 0,05$

5.2.2 Exatidão

5.2.2.1 Exatidão para ciclopirox olamina matéria-prima

Os resultados obtidos na exatidão através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19 podem ser observados na Tabela 19.

TABELA 19 - Valores experimentais obtidos na exatidão, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, para ciclopirox olamina matéria-prima.

Balão	Quantidade de SQR adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Quantidade de SQR recuperada* ($\mu\text{g/ml}$)	CV%	Recuperação %
1	8,4	8,38	1,21	99,76
2	16,8	16,82	1,08	100,12
3	25,2	25,14	0,97	99,76

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.2.2.2 Exatidão para ciclopirox olamina solução tópica

Os resultados obtidos nos testes de recuperação através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19 podem ser observados na Tabela 20.

TABELA 20 - Valores experimentais obtidos na exatidão, através do Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, para ciclopirox olamina solução tópica.

Balão	Quantidade de SQR adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Quantidade de SQR recuperada* ($\mu\text{g/ml}$)	CV%	Recuperação %
1	8,4	8,394	1,11	99,93
2	16,8	16,744	0,89	99,67
3	25,2	25,127	1,23	99,71

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.2.3 Precisão

5.2.3.1 Repetibilidade de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica

A Tabela 21 apresenta os valores experimentais de seis determinações do teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração de 84 µg/ml, realizadas no mesmo dia e nas mesmas condições.

TABELA 21 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, em um mesmo dia.

Ensaio	Ciclopirox olamina matéria-prima		Ciclopirox olamina solução tópica	
	µg/ml*	%	µg/ml*	%
1	84,244	100,29	84,042	100,05
2	84,118	100,14	84,042	100,05
3	83,832	99,80	83,597	99,52
4	83,714	99,66	84,697	100,83
5	84,034	100,04	84,454	100,54
6	83,630	99,56	84,202	100,24
Média	99,91%		100,2%	
Desvio padrão	0,29		0,45	
CV%	0,29		0,45	

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.2.3.2 Precisão intermediária de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica

Os resultados obtidos para a precisão intermediária estão descritos na Tabela 22.

TABELA 22 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, em diferentes dias.

Amostra	Dias	Precisão intermediária		Teor médio (%) \pm desvio padrão	CV%
		$\mu\text{g/ml}^*$	%		
Ciclopirox olamina matéria-prima	1	84,25	100,29	100,22 \pm 0,11	0,10
	2	84,12	100,14		
Ciclopirox olamina solução tópica	1	84,69	100,83	100,83 \pm 0,004	0,003
	2	84,70	100,83		

* Cada valor corresponde à média de 6 placas

5.2.4 Resultados de potência

Os resultados obtidos para o ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, por meio de dez Ensaio Microbiológicos empregando meio de cultura n° 19, encontram-se descritos nas Tabelas 23 e 24. Os resultados mais detalhados, incluindo as Análises de Variância (ANOVA), encontram-se no Anexo 1.

TABELA 23 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina matéria-prima, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.

Amostras de ciclopirox olamina matéria-prima	Valores de potência* %
1	99,79
2	100,56
3	100,04
4	100,84
5	100,12
6	100,08
7	100,36
8	100,50
9	99,87
10	99,82
Média	100,20%
Desvio padrão	0,35
CV%	0,35

* Cada valor corresponde à média de seis placas

TABELA 24 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19.

Amostras de ciclopirox olamina solução tópica	Valores de potência* %
1	100,94
2	100,32
3	100,29
4	100,0
5	100,24
6	100,09
7	100,02
8	100,02
9	100,22
10	100,34
Média	100,25%
Desvio padrão	0,28
CV%	0,28

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.3 Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar

5.3.1 Linearidade

A Tabela 25 apresenta os valores médios dos diâmetros dos halos de inibição, determinados pelo Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, obtidos para as soluções de ciclopirox olamina SQR, em diferentes concentrações.

TABELA 25 - Diâmetros médios dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetros médios dos halos de inibição*			Média \pm desvio padrão	CV%
	(mm)				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
60	14,135	14,268	13,805	14,07 \pm 0,24	1,70
90	17,695	17,348	17,331	17,46 \pm 0,21	1,20
135	21,005	20,405	20,551	20,65 \pm 0,31	1,50

* Cada valor corresponde à média de seis placas

A representação gráfica da curva de calibração e a equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 7.

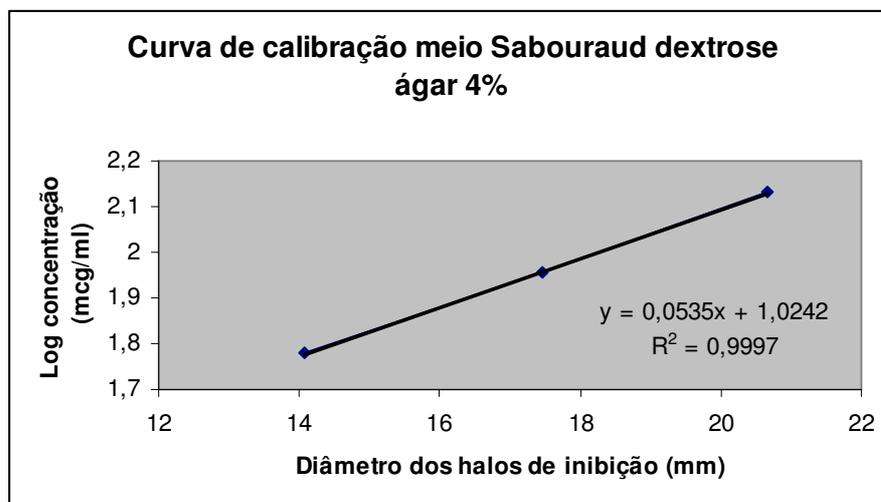


FIGURA 7 - Representação gráfica da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, obtida através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração, através da análise de variância (ANOVA), estão apresentados na Tabela 26.

TABELA 26 - Análise de variância (ANOVA) dos halos de inibição, obtidos na determinação da curva de calibração de ciclopirox olamina SQR, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Análise estatística ANOVA					
FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F.C	F.T
Entre doses	2	65,0514908	32,5257454	247,91365	9,55E+00*
Regressão linear	1	65,0328019	65,0328019	495,68486	1,013E+01*
Desvio de linearidade	2	0,0186889	0,0093444	0,07122	9,55E+00**
Resíduo	3	0,3935936	0,1311979		
Total	5	65,44508445			
*Significativo para $p > 0,05$					
** Não significativo para $p > 0,05$					

5.3.2 Exatidão

5.3.2.1 Exatidão para ciclopirox olamina matéria-prima

Os resultados obtidos na exatidão, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, podem ser observados na Tabela 27.

TABELA 27 - Valores experimentais obtidos na exatidão, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, para ciclopirox olamina matéria-prima.

Balão	Quantidade de SQR adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Quantidade de SQR recuperada* ($\mu\text{g/ml}$)	% Recuperação	CV %
1	9	9,049	99,07	1,12
2	18	17,915	99,11	0,77
3	27	27,099	99,73	1,10

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.3.2.2 Exatidão para ciclopirox olamina solução tópica

Os resultados obtidos nos testes de recuperação, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, podem ser observados na Tabela 28.

TABELA 28 - Valores experimentais obtidos na exatidão, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, para ciclopirox olamina solução tópica.

Balão	Quantidade de SQR adicionada ($\mu\text{g/ml}$)	Quantidade de SQR recuperada* ($\mu\text{g/ml}$)	% Recuperação	CV %
1	9	8,916	99,07	1,27
2	18	17,839	99,11	0,97
3	27	26,927	99,73	0,93

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.3.3 Precisão

5.3.3.1 Repetibilidade de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica

A Tabela 29 apresenta os valores experimentais de seis determinações do teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, na concentração de 90 $\mu\text{g/ml}$, realizadas no mesmo dia e nas mesmas condições.

TABELA 29 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, em um mesmo dia.

Ensaio	Ciclopirox olamina matéria-prima		Ciclopirox olamina solução tópica	
	$\mu\text{g/ml}^*$	%	$\mu\text{g/ml}^*$	%
1	90,207	100,23	90,657	100,73
2	89,946	99,94	90,351	100,39
3	89,892	99,88	89,451	99,39
4	90,837	100,93	89,847	99,83
5	90,099	100,11	89,739	99,71
6	89,010	98,90	90,405	100,45
Média	99,99%		100,08%	
Desvio padrão	0,66		0,52	
CV%	0,66		0,52	

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.3.3.2 Precisão intermediária de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica

Os resultados obtidos para a precisão intermediária estão descritos na Tabela 30.

TABELA 30 – Valores experimentais obtidos na determinação de teor de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, em diferentes dias.

Amostra	Dias	Precisão intermediária		Teor médio	CV%
		$\mu\text{g/ml}^*$	%	(%) \pm desvio padrão	
Ciclopirox olamina matéria-prima	1	89,27	99,19	99,55 \pm 0,50	0,50
	2	89,91	99,90		
Ciclopirox olamina solução tópica	1	89,75	99,72	99,54 \pm 0,25	0,25
	2	89,43	99,37		

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.3.4 Resultados de potência

Os resultados obtidos para o ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, por meio de dez Ensaio Microbiológicos empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, encontram-se descritos nas Tabelas 31 e 32. Os resultados mais detalhados, incluindo as Análises de Variância (ANOVA), encontram-se no Anexo 2.

TABELA 31 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina matéria-prima, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Amostras de ciclopirox olamina matéria-prima	Valores de potência* %
1	100,60
2	100,02
3	99,86
4	100,62
5	100,33
6	100,62
7	100,13
8	100,38
9	100,38
10	100,64
Média	100,36%
Desvio padrão	0,28
CV%	0,28

* Cada valor corresponde à média de seis placas

TABELA 32 – Valores de potência encontrados para ciclopirox olamina solução tópica, através de Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar.

Amostras de ciclopirox olamina solução tópica	Valores de potência* %
1	100,76
2	100,93
3	100,33
4	100,38
5	99,85
6	100,35
7	100,42
8	99,86
9	100,23
10	100,17
Média	100,33%
Desvio padrão	0,34
CV%	0,34

* Cada valor corresponde à média de seis placas

5.4 Análise comparativa dos métodos propostos

Os resultados obtidos na quantificação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, através dos diferentes métodos, foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e Teste de Duncan. Para a análise dos dados e confecção dos gráficos utilizaram-se os seguintes programas:

- Statistical Analysis System (SAS), versão 8.2 produzido por SAS Institute Inc.;
- Statistica, versão 5.0, produzido por Stasoft;

Os resultados da análise estatística encontram-se descritos no Anexo 3. A representação gráfica das médias encontradas para os diferentes métodos utilizados na avaliação do ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica encontra-se exposta nas Figuras 8 e 9.

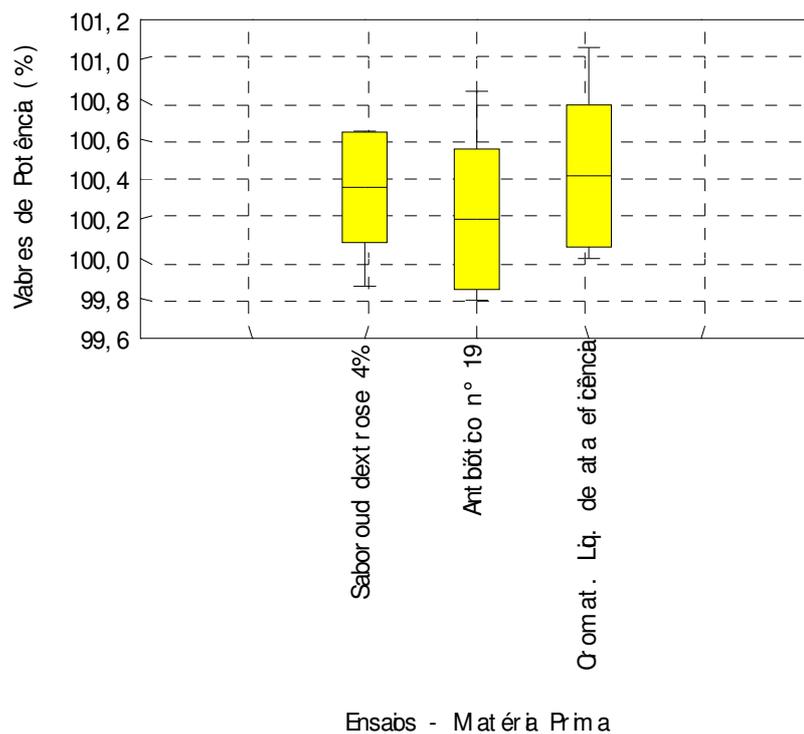


Figura 8 – Representação gráfica da análise comparativa das médias encontradas nos diferentes métodos para ciclopirox olamina matéria-prima.

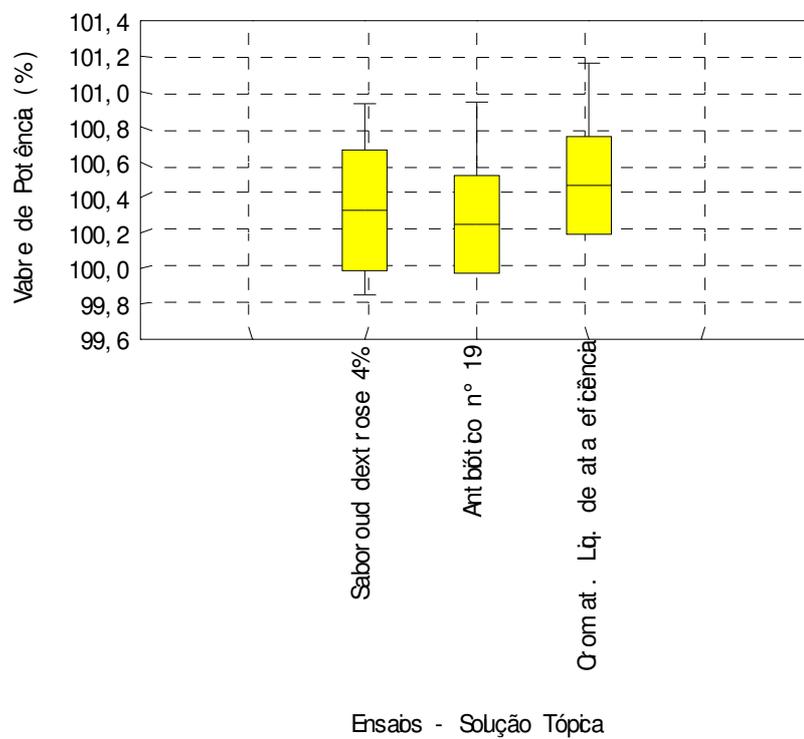


Figura 9 – Representação gráfica da análise comparativa das médias encontradas nos diferentes métodos para ciclopirox olamina solução tópica.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A escolha do método adequado para a realização de uma análise quantitativa depende de inúmeros fatores, tais como a quantidade de amostra disponível, a faixa da quantidade relativa em que, presumidamente, está o componente a determinar, a exatidão requerida, a composição química da amostra, o número de amostras a analisar e os recursos disponíveis (CHIAPPA, 2004).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) constitui-se uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica (COLLINS *et al.*, 2002). Apesar disso, requer manuseio de aparelhos dispendiosos, limitando sua aplicação a laboratórios que possuam este equipamento. É necessário também um operador com experiência para a obtenção do aproveitamento máximo do sistema (GUIMARÃES e COLLINS, 1990).

A utilização de CLAE-UV para a determinação de ciclopirox olamina em produtos farmacêuticos (BELLIARDO *et al.*, 1991; GAGLIARDI *et al.*, 1998) e fluidos biológicos (LEHR e DAMM, 1985; COPPI e SILINGARDI, 1992) tem sido reportada na literatura. Na metodologia desenvolvida a etapa de derivatização foi simplificada com relação aos trabalhos existentes, isso resultou em rapidez nas análises.

Os parâmetros analíticos selecionados para a quantificação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica por CLAE-UV satisfizeram os requisitos: rapidez, facilidade de preparação da amostra, fase móvel de simples composição, fácil preparo e baixo custo, favorecendo o aumento da vida útil da coluna cromatográfica.

Nas determinações cromatográficas do ciclopirox olamina, onde se faz uso de sílica e sílica quimicamente modificada como fase estacionária, dois problemas podem ocorrer: a formação de cauda e a adsorção irreversível de pequenas quantidades de ciclopirox olamina na coluna cromatográfica. A forte adsorção do fármaco com a fase estacionária citada é presumidamente devido às propriedades quelantes do grupo hidroxipiridona. Esta interação

resulta em curvas de calibração não-lineares. A metilação do grupo n-hidroxila livre do ciclopirox olamina resulta num derivado metoxilado, que apresenta comportamento cromatográfico normal (BELLIARDO *et al.* 1991, LEHR e DAMM, 1985; GAGLIARDI *et al.*, 1998). A reação de metilação do composto foi realizada com auxílio de dimetilsulfato, em meio alcalino. A remoção do excesso do dimetilsulfato é indispensável para se obter resultados analíticos reprodutíveis e esta etapa foi realizada pela adição de trietilamina, formando um produto o qual não interfere no ensaio (LEHR e DAMM, 1985).

Empregou-se no método proposto a coluna C18 estericamente protegida, onde agentes sililantes monofuncionais estão ligados diretamente ao átomo de silício da fase estacionária, diminuindo o número de grupos silanóis residuais (SILVA *et al.*, 2004). Este tipo de coluna foi utilizada em virtude de ser uma das mais utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade de fármacos e por minimizar a possível retenção de ciclopirox olamina na fase estacionária, devido às suas propriedades complexantes.

Testaram-se várias fases móveis, em diferentes proporções, baseando-se na literatura consultada. Optou-se pela mistura de acetonitrila/água 1:1 (V/V), em razão de esta gerar boa separação do analito e rapidez na análise, sem os inconvenientes de uma fase móvel que apresente tampão na sua constituição, a qual acarreta demora na estabilização do sistema, exigência de maiores cuidados na limpeza das colunas cromatográficas e menor vida útil destas.

Os dados da linearidade foram avaliados por análise de variância (ANOVA), onde apresentaram regressão linear significativa, para $p < 0,05$ e não foi observado desvio de linearidade, para $p < 0,05$. Esses dados, desta maneira, corroboram que a curva de calibração pode ser utilizada para a interpolação de valores experimentais, visando à determinação de ciclopirox olamina.

Para a análise da especificidade do procedimento, submeteram-se soluções de ciclopirox olamina SQR à degradação forçada, em condições ácidas, alcalinas, oxidativas e fotolíticas. Tanto em meio ácido, como alcalino e oxidativo, após exposição por 4 horas, pode-se observar um decréscimo nas áreas do pico relativo ao ciclopirox olamina, gerando resultados de teores de 42,52%; 70,56% e 68,18% da solução sem tratamento, respectivamente. Nas condições fotolíticas, no período de 4 horas, não ocorreu degradação do ciclopirox olamina, pois se obteve como valor médio de teor 100,43%. Em nenhuma das condições testadas acima se observou a formação de picos adicionais nos cromatogramas empregando CLAE-UV, devido,

provavelmente, à formação de produtos de degradação não passíveis de determinação nas condições testadas ou por essa técnica analítica.

Os valores para o teste de exatidão por recuperação estão descritos nas Tabelas 12 e 13, sendo que a média dos valores recuperados foi de 100,23% para ciclopirox olamina matéria-prima e 100,47% para ciclopirox olamina solução tópica. Os valores encontram-se dentro dos limites de 95 a 105 %, estabelecidos pelos compêndios oficiais.

O método cromatográfico desenvolvido sofreu algumas modificações nos parâmetros analíticos selecionados, a fim de verificar sua robustez frente a pequenas alterações, conforme Tabela 14.

Com relação à variação na proporção da fase móvel, onde se aumentou a proporção de acetonitrila para 3:2 (V/V), ocorreu uma diminuição no tempo de retenção do composto, devido ao aumento na força de eluição da fase móvel. Entretanto, não houve alteração significativa nos valores de teor do mesmo.

Quando se alterou o comprimento de onda para 300 nm, não foram observadas variações no tempo de retenção do composto, mas sim um pequeno aumento nas áreas absolutas do pico de ciclopirox olamina. Este fato pode ser em decorrência de uma maior absorvidade do fármaco neste comprimento de onda, verificado pelo espectro de absorção do fármaco na faixa de 200 a 400 nm.

A partir da alteração da vazão da fase móvel acetonitrila: água 1:1 (V/V) de 1,0 ml/min para 0,7 ml/min, não foram observadas alterações significativas nos valores de teor para ciclopirox olamina, somente no tempo de retenção do composto.

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais das análises de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, realizadas no mesmo dia, sob as mesmas condições, estão demonstrados na Tabela 16. O CV% encontrado foi de 0,85% e 0,29%, para ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, respectivamente. Para as análises realizadas em dias diferentes, encontraram-se valores de coeficiente médio de variação de 0,41% para ciclopirox olamina matéria-prima e 0,60% para ciclopirox olamina solução tópica, conforme Tabela 15. Os baixos valores de CV% obtidos nesse estudo indicam a precisão do método, pois todos se encontram dentro do limite aceito pelos compêndios oficiais que é de até 2% .

O Ensaio Microbiológico de difusão em ágar tem por finalidade a avaliação da potência de antimicrobianos através do halo de inibição formado pela difusão da solução do fármaco no meio adequado inoculado com o microrganismo teste. Uma vantagem deste tipo de determinação é que não requerem equipamentos especializados e dispendiosos, além de não utilizar solventes potencialmente tóxicos para o analista.

Na revisão bibliográfica realizada não se encontrou nenhuma referência quanto à utilização de Ensaio Microbiológico para a determinação da potência de ciclopirox olamina, razão pela qual se optou pelo emprego desta metodologia.

Dos diferentes microrganismos testados, selecionou-se como o mais adequado *Candida albicans* ATCC 10231. A escolha baseou-se no fato de que este microrganismo apresentou halos mais nítidos e crescimento mais regular da camada fúngica. Outros fatores levados em consideração foram a facilidade de manipulação e a disponibilidade da cepa, bem como em virtude de estudos de avaliação da susceptibilidade que referem boa atividade *in vitro* de ciclopirox olamina contra este microrganismo (KOKJONH *et al.*, 2003; HANEL *et al.*, 1988; JUE *et al.*, 1985).

Entre os diferentes planejamentos de ensaio descritos nas farmacopéias, optou-se pelo delineamento 3 x 3, preconizado pelas Farmacopéias Brasileira (1988), Britânica (2006) e Européia (2005), por permitir adequada avaliação estatística, pela facilidade de execução e por ser o planejamento adotado pela Farmacopéia Brasileira.

Das diferentes concentrações testadas, selecionaram-se as concentrações de 60, 90 e 135 µg/ml, para o Ensaio Microbiológico empregando meio Sabouraud-dextrose 4% ágar, e 56, 84 e 126 µg/ml para o Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19. Essa escolha se justifica no fato de que, com esses valores de concentração, foram obtidos halos com diâmetros adequados, nítidos e com boa separação entre as doses.

Os valores experimentais obtidos para a determinação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica pelos dois Ensaios Microbiológicos desenvolvidos estão representados nas Tabelas 23, 24, 31 e 32 e no Anexo 1. Os ensaios foram realizados em diferentes dias e em cada dia eram preparados novos inóculos e soluções amostra e SQR. Os ensaios individuais foram validados através da análise de variância (ANOVA), conforme descritos na Farmacopéia Brasileira (1988). De acordo com as farmacopéias Britânica, Européia e Brasileira, se o modelo de retas paralelas é utilizado, as duas linhas dose-resposta da amostra e da SQR devem ser

paralelas e lineares nas concentrações utilizadas no cálculo. Estas condições são verificadas por meio de análise estatística, descrita nestes códigos. Dentre as variáveis avaliadas no ensaio, aquelas que necessitam ser cumpridas para validar o método proposto estão a regressão linear e a variação entre doses, que devem ser significativas. A variação entre preparações, o desvio de paralelismo, desvio de linearidade e a variação entre placas devem ser não-significativa. Em todos os ensaios essas condições foram cumpridas.

Os Ensaio Microbiológico pelo método de difusão em ágar foram avaliados quanto à linearidade, recuperação e precisão.

Para o Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19, na avaliação da linearidade, os diâmetros médios dos halos de inibição das soluções de SQR de ciclopirox olamina foram: 17,36 mm (CV%=0,887) para a dose de 54 µg/ml; 20,38 mm (CV%=0,322) para a dose de 86 µg/ml e 23,31 mm (CV%=0,163) para a dose de 126 µg/ml. O gráfico do logaritmo da concentração (µg/ml) *versus* o diâmetro da zona de inibição (mm) foi plotado, mostrando boa linearidade na faixa de 54 a 126 µg/ml (Figura 4). A equação da reta para o método foi: $y=0,0592 + 0,7193x$ onde x é a dose e y é diâmetro da zona de inibição. O coeficiente de regressão foi $r=0,9999$. A análise de variância dos valores de linearidade (Tabela 18) demonstrou regressão linear significativa, não havendo desvio significativo de linearidade.

A precisão do método foi avaliada através de testes de repetibilidade e precisão intermediária. Para as análises realizadas no mesmo dia ($n=6$), o coeficiente médio de variação percentual foi de 0,287% para ciclopirox olamina matéria-prima e 0,451% para ciclopirox olamina solução tópica. Os resultados obtidos em diferentes dias ($n=2$) obtiveram coeficiente médio de variação percentual de 0,105% para ciclopirox olamina matéria-prima e 0,003% para ciclopirox olamina solução tópica. Como se observa, todos os valores de CV% se encontram abaixo de 2%, demonstrando a precisão do método.

A exatidão foi demonstrada através de SQR adicionada a uma quantidade conhecida de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica. Obtiveram-se valores médios de recuperação de 99,89 % para ciclopirox olamina matéria-prima e 99,77 % para ciclopirox olamina solução tópica, valores estes dentro das especificações requeridas para este teste.

Os resultados demonstram que o Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19 é adequado para a finalidade proposta, apresentando linearidade, precisão e exatidão.

Para o Ensaio Microbiológico empregando meio Sabouraud-dextrose 4% ágar, na avaliação da linearidade, os diâmetros médios dos halos de inibição das soluções de SQR de ciclopirox olamina foram: 14,069 mm (CV%=1,69) para a dose de 60 µg/ml; 17,458 mm (CV%=1,17) para a dose de 90 µg/ml e 20,65 mm (CV%=1,51) para a dose de 135 µg/ml. O gráfico do logaritmo da concentração (µg/ml) *versus* o diâmetro da zona de inibição (mm) foi plotado, mostrando boa linearidade na faixa de 60 a 135 µg/ml (Figura 5). A equação da reta para o método foi: $y = 0,0535x + 1,0242$, onde x é a dose e y é diâmetro da zona de inibição. O coeficiente de regressão foi $r = 0,9997$. A análise de variância dos valores de linearidade (Tabela 26) demonstrou regressão linear significativa, não havendo desvio significativo de linearidade.

A precisão do método foi avaliada através de testes de repetibilidade e precisão intermediária. Para as análises realizadas no mesmo dia ($n=6$), o coeficiente médio de variação percentual foi de 0,657% para ciclopirox olamina matéria-prima e 0,515% para ciclopirox olamina solução tópica. Os resultados obtidos em diferentes dias ($n=2$) obtiveram coeficiente médio de variação percentual de 0,505% para ciclopirox olamina matéria-prima e 0,248% para ciclopirox olamina solução tópica. Como se observa, todos os valores de CV% se encontram abaixo de 2%, demonstrando a precisão do método.

A exatidão foi demonstrada através de SQR adicionada a uma quantidade conhecida de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica. Obtiveram-se valores médios de recuperação de 100,14% para ciclopirox olamina matéria-prima e 99,30 % para ciclopirox olamina solução tópica, valores estes dentro das especificações requeridas para este teste.

Os resultados demonstram que o Ensaio Microbiológico empregando meio Sabouraud-dextrose 4% ágar é adequado para a finalidade proposta, apresentando linearidade, precisão e exatidão.

A análise comparativa dos métodos apresentados para a quantificação do ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica, avaliando-se os parâmetros propostos em suas validações, demonstrou que as metodologias estudadas não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Os estudos realizados nos permitem verificar que os métodos de determinação quantitativa empregados: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Ensaio Microbiológico utilizando meio Sabouraud dextrose 4% ágar e Ensaio Microbiológico utilizando meio de cultura n° 19 são estatisticamente equivalentes e podem ser utilizados na quantificação da matéria-prima e solução tópica do ciclopirox olamina.

7. CONCLUSÕES

- O método analítico por CLAE-UV, nas condições experimentais estabelecidas, demonstrou adequada linearidade, precisão, especificidade, robustez e exatidão, podendo ser empregado para determinação quantitativa de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.
- O Ensaio Microbiológico de difusão em ágar, cilindro em placa, utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo de referência e meio de cultura n° 19, nas condições avaliadas, demonstrou adequada linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para a determinação quantitativa de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.
- O Ensaio Microbiológico de difusão em ágar, cilindro em placa, utilizando *Candida albicans* ATCC 10231 como microrganismo de referência e meio de cultura Sabouraud-dextrose 4% ágar, nas condições avaliadas, demonstrou adequada linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para a determinação quantitativa de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.
- Os métodos propostos para a quantificação de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica (CLAE-UV, Ensaio Microbiológico empregando meio de cultura n° 19 e Ensaio Microbiológico empregando meio Sabouraud-dextrose 4% ágar) atenderam aos requisitos de validação analítica propostos, não apresentando, entre eles, diferenças estatisticamente significativas, demonstrando que qualquer dos métodos apresentados pode ser utilizado para a determinação quantitativa de ciclopirox olamina matéria-prima e solução tópica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, B. B; HANEL, H.; HOEHLER, T. Ciclopirox Olamine: A hydroxypyridone antifungal agent. **Clinics in Dermatology**, v. 9, p.471-477, 1992.

AKIMOTO, T.; HIRAYAMA, N. Crystal Structure of Ciclopirox olamina. **Analytical Sciences-The Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 19, p.21-22, 2003.

ALY, R.; KATZ, H.; KEMPERS, S.; LOOKINGBILL, D.; LOWE, N.; MENTER, A.; MORMAN, M.; SAVIN, R.; WORTZMAN, M. Ciclopirox gel for seborrheic dermatitis of the scalp. **International Journal of Dermatology**, v.42, p. 19-22, 2003. a.

ALY, R.; FISCHER, G.; KATZ, I.; LEVINE, N.; LOOKINGBILL, D.; MENTER, A.; MORNAN, M.; PARISER, D.; ROTH, H.; SAVIN, R.; SHAVIN, J.; STEWART, D.; TAYLOR, R.; TUCHER, S.; WORTZMAN, M. Ciclopirox gel in the treatment of patients with interdigital tinea pedis. **International Journal of Dermatology**, v.42, p. 29-35, 2003. b.

ALY, R.; MAIBACH, H.I.; BAGATELL, F.K. Ciclopirox olamine lotion 1%: bioequivalence to ciclopirox olamine cream 1% and clinical efficacy in tinea pedis. **Clinical Therapy**, v. II, p. 290-303, 1989.

ARAÚJO, M. G., SILVEIRA, M.A. Gênese de antifúngicos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 32, p. 1-10, 1996.

BELLIARDO, F.; BERTOLINO, A.; BRANDOLO, G.; LUCARELLI, C. Micro-liquid chromatography method for the determination of ciclopiroxolamine after pre-column derivatization in topical formulations. **Journal of Chromatography**, 553, p. 41-45, 1991.

BOHN, M.; KRAEMER, K.T. Dermatopharmacology of Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 4, 2000.

BRASIL, Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos.

BRITISH PHARMACOPOEIA 2006 London: Her Majesty Stationery Office, London, 2006.

CARAZO, J.L.S.; LOSADA, L.O.; SANJUAN, V. Tratamiento actual de las micosis superficiales. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. s26-s30, 1999.

CHIAPPA, R. Cloridrato de amiodarona - Estudo comparativo de metodologias de análise de matéria-prima. Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Santa Maria: UFSM 2004. Dissertação (Mestrado).

CODE OF FEDERAL REGULATION. Food and drug administration. Washington: Office of the Federal Register. Title 21, parts 300-499, 1996.

COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; TONHI, E. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionais. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.

COPPI, G.; SILINGARDI, S. HPLC methods for pharmacokinetic studies on ciclopirox olamine in rabbits after intravenous and intravaginal administration. **Il Farmaco**, v.47, p. 779-786, 1992.

DEL PALACIO HERNANZ, A.; ARTIGAS, G.J.; SALVAT, F.M.J.; ESTEBAN-MORENO, J.; LOPEZ-GOMEZ. Changes in fungal ultrastructure after short course ciclopiroxolamine therapy in pityriasis versicolor. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 15, p. 95-100, 1990.

DEF - DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS. Rio de Janeiro: Editora Publicações Médicas, 2005-2006.

DICIONÁRIO TERAPÊUTICO GUANABARA. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005-2006.

DITTMAR, W.; LOHAUS, G. HOE 296: a new antimycotic compound with a broad antimicrobial spectrum. **Drug Research**, v.23, p. 670-674, 1973.

EFFENDY, I. Therapeutics strategies in onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.4, p s3-s10, 1995.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. Council of Europe, Strasbourg, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA- 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

GAGLIARDI, L.; MULTARI, G.; CAVAZZUTI, G.; DE ORSI, D.; TONELLI, D. HPLC determination of ciclopirox, octopirox and pyrithiones in pharmaceutical and antidandruff preparations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technology**, v. 21, p. 2365-2373, 1998.

GASPARINI, G.; CONTINI, D.; TOSTI, A.; LASAGNI, A.; CAPUTO, R. The effect of ciclopiroxolamine investigated by means of the freeze-fracture technique. **Mykosen**, v. 29, p. 539-544, 1986.

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

GUIMARÃES, L.F.L.; COLLINS, C.H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In COLLINS, C.H., BRAGA, G.L.; BONATO, R.S. Introdução a métodos cromatográficos. 4 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. Cap. 9, p. 183-238.

GUPTA, S.; SHARMA, R. P.; SHARMA, N. K.; MEHROTRA, M.L. Topical Ciclopirox olamine in dermatophitoses. **Indian Journal of Pharmacology**, v.23, p.174-176, 1991.

GUPTA, A. K. Ciclopirox: an overview. **International Journal of Dermatology**, v.40, p.305-310, 2001.

GUPTA, A., K.; SKINNER, A. R. Ciclopirox for the treatment of superficial fungal infections: a review. **International Journal of Dermatology**, v.42, p. 3-9, 2003.

GUPTA, A.K.; SKINNER, A.R.; COOPER, E.A. Interdigitalis tinea pedis (dermatophytosis simplex and complex) and treatment with ciclopirox 0,77 % gel. **International Journal of Dermatology**, v. 42, p. 23-27, 2003.

GUPTA, A.K.; PLOTT, T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. **International Journal of Dermatology**, v. 43, Suppl. 1, p. 3-8, 2004.

HANEL, H.; ROETHER, W.; DITTMAR, W. Evolution of the fungicidal action of *in vitro* and in a skin model considering the influence of penetration kinetics on various standard antimycotics. **Annals of NY Academy Science**, v. 544, p. 329-337, 1988.

IBRAHIM, F.; EL-ENANY, N. Polarographic determination of ciclopirox olamine in pure substance and in different pharmaceutical preparations. **Il farmaco**, v.58, p. 1313-1318, 2003.

IBRAHIM, F.; EL-ENANY, N. Anodic polarographic determination of ciclopirox olamine in pure substance and certain pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 32, p. 353-359, 2003.

ICH-International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on validation of Analytical Procedures Q2B: Methodology, 1996.

JONHSON, R. A. HIV disease: mucocutaneous fungal infections in HIV disease. **Clinics in Dermatology**, v. 18, p. 411-422, 2000.

JUE, S.G.; DAWSON. G.W.; BRODGEN, R.N. Ciclopirox olamine 1% cream: a preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. **Drugs**, v. 29, p. 330-341, 1985.

KOKJOHN, K.; BRADLEY, M.; GRIFFITHS, B. Evaluation of in vivo activity of Ciclopiroxolamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. **International Journal of Dermatology**, v.42, p. 11-17, 2003.

KORTING, H.C.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. The hydroxypyridones: a class of antimycotics of its own. **Mycoses**, v.40, p. 243-247, 1997.

LEHR, K.H.; DAMM, P. Quantification of ciclopirox by high.-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 339, p. 451-456, 1985.

LORTHOLARY, O.; DUPONT, B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. **Clinical Microbiology Reviews**, julho, p. 477-504, 1997.

MAC KARROW, S.D.; MERRY, J.M.; HOEPRICH, P.D. Effects of buffers on testing of *Candida* species susceptibility to flucytosine. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 25, p. 885-888, 1991.

MARTINDALE, THE COMPLETE DRUG REFERENCE. 34^o ed. Pharmaceutical Press, 2005.

MERTIN, D.; LIPPOLD, B.C. In vitro permeability of the human nail and a keratin membrane from bovine hooves: prediction of the penetration rate of antimycotic through the nail plate and their efficacy. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 49, p. 866-872, 1997.

MUNOZ, A.J.C.; BRIÓ, A.R.; VALLE, O., SANTOS, P.; QUINDÓS, G. Ciclopiroxolamine: in vitro antifungal activity against clinical yeast isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 20, p. 375-379, 2002.

MYOUNG, Y.; CHOI, H. Permeation of Ciclopirox across porcine hoof membrane: effect of pressure sensitive adhesives and vehicles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 319-325, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A. Document M27-A, v. 17, p. 1-29, 1997.

NIEWERTH, M.; KUNZE, D.; SEIBOLD, M.; SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; HUDE, B. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins and resistance factors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, p. 1805-1817, 2003.

POLAK, A.; JACKEL, A.; NOACK, A.; KAPPE, R. Agar sublimation test for the *in vitro* determination of the antifungal activity of morpholine derivates. **Mycoses**, v. 47, p. 184-192, 2004.

QINDÓS, G. Las micosis em el amanecer de siglo XXI. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 1-4, 2002.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B.G.; COLLINS, C.; JARDIM, C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROSEN, T.; SCHELL, B. J.; ORENGO, I. Anti-inflammatory activity of antifungal preparations. **International journal of Dermatology**, v. 36, p. 788-792, 1997.

SILVA, P. Farmacologia. 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SILVA, R.S.; JARDIM, I.C.S.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SOUZA, M.J. Enrofloxacino: Desenvolvimento de Metodologia de Análise e Estudo da Estabilidade. Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Santa Maria: UFSM, 2001. Dissertação (Mestrado).

THE MERCK INDEX, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ. 13 ed., 2001.

USP 29, THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 29 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2006.

VERA, M.J.R.; CERVERA, A.L. Ventajas e desventajas de los antifungicos de uso tópico. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v.14, n. 3, setembro 2001.