

Validação de um método analítico para a determinação de substâncias ativas em formulações farmacêuticas empregadas em “peelings” químicos

Tatiane Rodrigues Ramos, Maria Inês Rocha Miritello Santoro*,
Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, Anil Kumar Singh

Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

Nos “peelings” químicos utilizam-se formulações esfoliantes, empregadas na terapêutica de queratoses actínicas, rugas, discromias pigmentares, acne vulgar e rosácea. Na presente pesquisa, foram empregadas como amostras, a solução de Jessner (SJ) composta por resorcinol (RS) 14%, ácido salicílico (AS) 14% e ácido láctico (AL) 14% em solução alcoólica e géis de AS a 20% e RS a 30%. As técnicas utilizadas foram a espectrofotometria derivada no UV de primeira e segunda ordens em etanol absoluto para o AS e RS, respectivamente na SJ, e a espectrofotometria derivada no UV de primeira ordem em ácido sulfúrico 0,1 N para o AS e RS nos géis. Para o AS na SJ, o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9999, a precisão expressa pela média dos desvios padrão relativos (DPR) de 0,68% e a exatidão expressa pela recuperação média de 100,5%. Para o RS na SJ o r foi de 0,9999, a média dos DPR de 0,83% e a recuperação média de 100,3%. No gel de AS, o r foi de 0,9999, a média dos DPR de 0,28 e a recuperação média de 99,3%. No gel de RS, o r foi de 0,9998, a média dos DPR de 0,34 e a recuperação média de 99,9%.

Uniterms

- “Peelings” químicos
- Ácido salicílico
- Resorcinol
- Espectrofotometria derivada

*Correspondência:

M. I. R. M. Santoro
Departamento de Farmácia, Faculdade
de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo
Caixa Postal 66355,
05389-970, SP, São Paulo, Brasil
E-mail: ines@usp.br

INTRODUÇÃO

Ampla gama de substâncias químicas, como os alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, derivados fenólicos e retinóides, é utilizada em formulações para “peelings” químicos. O ácido salicílico, resorcinol e ácido láctico (Figuras 1a, 1b e 1c, respectivamente) são princípios ativos empregados em formulações esfoliantes para a execução de “peelings” químicos e que têm como objetivo produzir uma lesão controlada na pele. Estas substâncias são utilizadas no tratamento das queratoses e rugas actínicas,

discromias pigmentares, acnes vulgar e rosácea (Katsambas, Stratigos, 2001; Monheit, 2001). Por provocarem diferentes reações adversas e constituírem diversas associações de princípios ativos, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação dessas substâncias.

A Solução de Jessner (SJ) é uma formulação clássica de aplicação magistral (Batistuzzo *et al.*, 2000) e os géis de ácido salicílico e de resorcinol a 20% e 30%, respectivamente, também são de uso comum na terapêutica (Brody, 2000). Poucos métodos têm sido desenvolvidos

para determinações de ácido salicílico e de resorcinol associados em formulações farmacêuticas empregadas para “peelings”. Técnicas eletroforéticas (Gomez *et al.*, 2003) e cromatográficas (Gou, Zhou, 1998), já foram empregadas para determinar as referidas substâncias em outras matrizes.

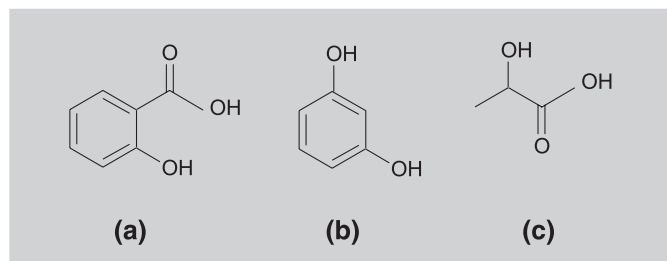


FIGURA 1 - Estruturas químicas do ácido salicílico (a), resorcinol (b) e ácido láctico (c).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e amostras

Ácido salicílico, resorcinol e ácido láctico com pureza de 99%, 100,5% e 88%, respectivamente, etanol absoluto (Labsynth[®], São Paulo/Brasil), ácido sulfúrico concentrado 96-98% grau analítico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) solução de ácido sulfúrico 0,1 N. Solução de Jessner composta por resorcinol (RS) 14%, ácido salicílico (AS) 14% e ácido láctico (AL) 14% em solução alcoólica (amostras A e B, preparada em laboratório e comercial, respectivamente), gel de ácido salicílico 20% (amostras C e D, preparadas em laboratório e comercial, respectivamente) e gel de resorcinol 30% (amostras E e F, preparada em laboratório e comercial, respectivamente) foram as amostras selecionadas para a pesquisa.

Equipamento e condições analíticas

Utilizou-se espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu[®] UV-160), células de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Usaram-se sinais na derivada de primeira ordem em 320,0 nm e sinais na segunda derivada a 280,0 nm para o ácido salicílico e resorcinol em SJ, respectivamente. Sinais a 317,2 nm e 257,6 nm na primeira derivada foram utilizados para o ácido salicílico e resorcinol em gel, respectivamente.

Preparo das soluções padrão

Para a solução de Jessner, a curva padrão do ácido salicílico foi obtida pesando-se exatamente cerca de 100,0 mg que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL

e o volume completado com etanol absoluto. Transferiram-se 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL completando-se o volume com o mesmo solvente. Desta última solução, transferiram-se 7 alíquotas diferentes para balões volumétricos de 100 mL completando-os com etanol absoluto. Foram obtidas soluções com intervalo de concentração entre 12,0 e 24,0 μg de ácido salicílico/mL. A curva padrão do resorcinol realizou-se pesando exatamente cerca de 100,0 mg, que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Obtiveram-se soluções com intervalo de concentração entre 22,0 e 34,0 μg de resorcinol/mL, através do mesmo esquema de diluição descrito.

Para o gel de ácido salicílico, realizou-se a curva padrão pesando-se exatamente cerca de 100,0 mg de ácido salicílico, que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com H_2SO_4 0,1 N. Transferiram-se 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se com H_2SO_4 0,1 N. Desta última solução, transferiram-se 7 alíquotas diferentes para balões volumétricos de 25 mL completando-os com o mesmo solvente. Foram obtidas soluções com intervalo de concentração entre 8,0 e 32,0 μg de ácido salicílico/mL.

Para o gel de resorcinol, realizou-se a curva padrão pesando exatamente cerca de 100,0 mg de resorcinol, que foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL, levando-se à marca com H_2SO_4 0,1 N. Transferiram-se 25,0 mL para balão volumétrico de 250 mL e completou-se com H_2SO_4 0,1 N. Desta última solução, transferiram-se 7 alíquotas diferentes para balões volumétricos de 50 mL completando-os com o mesmo solvente, obtendo-se soluções com intervalo de concentração entre 18,0 e 42,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de resorcinol.

Preparo das soluções das amostras

Para a determinação do ácido salicílico em SJ transferiram-se 4,0 mL de amostra para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com etanol absoluto. Transferiu-se uma alíquota de 4,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e desta última solução transferiu-se uma alíquota de 4,0 mL para balão volumétrico de 100 mL (17,92 μg de ácido salicílico/mL). Para a determinação do resorcinol, transferiram-se 5,0 mL de SJ para balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se etanol absoluto até a marca. Transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e desta última solução transferiu-se uma alíquota de 4,0 mL para balão volumétrico de 50 mL (28,0 μg de resorcinol/mL).

Para o gel de ácido salicílico, foi pesado, do gel, o equivalente a 20,0 mg de ácido salicílico e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi comple-

tado com H_2SO_4 0,1 N. Transferiram-se alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 50 mL (20,0 μg de ácido salicílico/mL).

Para o gel de resorcinol, foi pesado, do gel, o equivalente a 30,0 mg de resorcinol e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com H_2SO_4 0,1 N. Transferiram-se alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 50 mL (30,0 μg de resorcinol/mL).

Teste de recuperação (preparo das soluções)

Na SJ foram preparadas, separadamente, soluções padrão e soluções amostra com 70,0 e 56,0 $\mu g/mL$ de ácido salicílico e resorcinol, respectivamente. Alíquotas fixas de soluções da amostra e variáveis de soluções padrão foram transferidas para balões volumétricos de 50 e 25 mL na determinação do ácido salicílico e resorcinol, respectivamente. Nas amostras gel, prepararam-se separadamente soluções padrão e soluções da amostra de 70,0 e 90,0 $\mu g/mL$ de ácido salicílico e resorcinol, respectivamente. Alíquotas fixas de soluções da amostra e variáveis de soluções padrão foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL para posterior determinação.

Validação dos métodos

Os métodos foram validados segundo as diretrizes da “International Conference on Harmonization (ICH)” (ICH, 2001) e AOAC International (AOAC, 2000).

Linearidade

Foi determinada pelas curvas padrão, as quais foram obtidas em 7 níveis de concentração (12,0–24,0 $\mu g/mL$ e 22,0–34,0 $\mu g/mL$ para o ácido salicílico e resorcinol em SJ, respectivamente; 8,0–32,0 $\mu g/mL$ para o ácido salicílico em gel e 18,0–42,0 $\mu g/mL$ para o resorcinol em gel). As soluções foram preparadas em triplicata e a linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados.

Precisão

Foi determinada pela repetibilidade, utilizando todas as amostras nas mesmas concentrações, no mesmo dia. Foram preparadas e analisadas dez soluções de cada amostra e utilizado o desvio padrão médio como parâmetro estatístico.

Exatidão

Determinada pelo teste de recuperação. Todas as soluções foram preparadas em triplicata e a porcentagem

de recuperação foi calculada empregando-se a equação proposta pela AOAC International (AOAC, 2000).

Especificidade

Determinada para todos os métodos. Foram utilizados placebos (Jenke, 1996) (etanol absoluto para SJ e gel base para o gel de ácido salicílico e resorcinol). Avaliaram-se os sistemas a fim de observar respostas instrumentais ou sobreposição de bandas nos espectros.

Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados com base no desvio padrão da resposta instrumental (desvio padrão do residual da linha de regressão) e sua relação com a inclinação da reta na curva padrão construída a baixas concentrações (Swartz, Krull, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos validados são simples, rápidos e de baixo custo. Na quantificação do ácido salicílico na SJ, observou-se que na derivada de primeira ordem existe um mínimo a 320,0 nm, que corresponde unicamente a esta substância. Etanol absoluto, resorcinol e ácido láctico não apresentaram resposta instrumental nesta região nas condições descritas (Figura 2).

Para o ácido salicílico, os dados obtidos para a linearidade, pelo método dos mínimos quadrados, demonstraram um bom coeficiente de correlação (Tabela I). Os valores experimentais obtidos na quantificação indicam variabilidade satisfatória (repetibilidade) (Tabela II). Uma boa exatidão do método foi comprovada pelos testes de recuperação (Tabela III). O método mostrou-se sensível para pequenas quantidades de ácido salicílico presentes na SJ (Tabela I) e não foi observada interferência das outras substâncias que constituem a SJ.

Na determinação quantitativa do resorcinol em SJ pela derivada de segunda ordem, observou-se um máximo a 280,0 nm, que corresponde unicamente à referida substância. Nesta região, o etanol absoluto, o ácido salicílico e o ácido láctico não apresentam resposta instrumental, não interferindo, portanto, na determinação (Figura 3).

Para o resorcinol, os dados obtidos pelo método dos mínimos quadrados demonstram um bom coeficiente de correlação (Tabela I). Os valores obtidos na quantificação indicam satisfatória repetibilidade (Tabela II). Uma boa exatidão do método foi comprovada pelos testes de recuperação (Tabela III). O método mostrou-se sensível a pe-

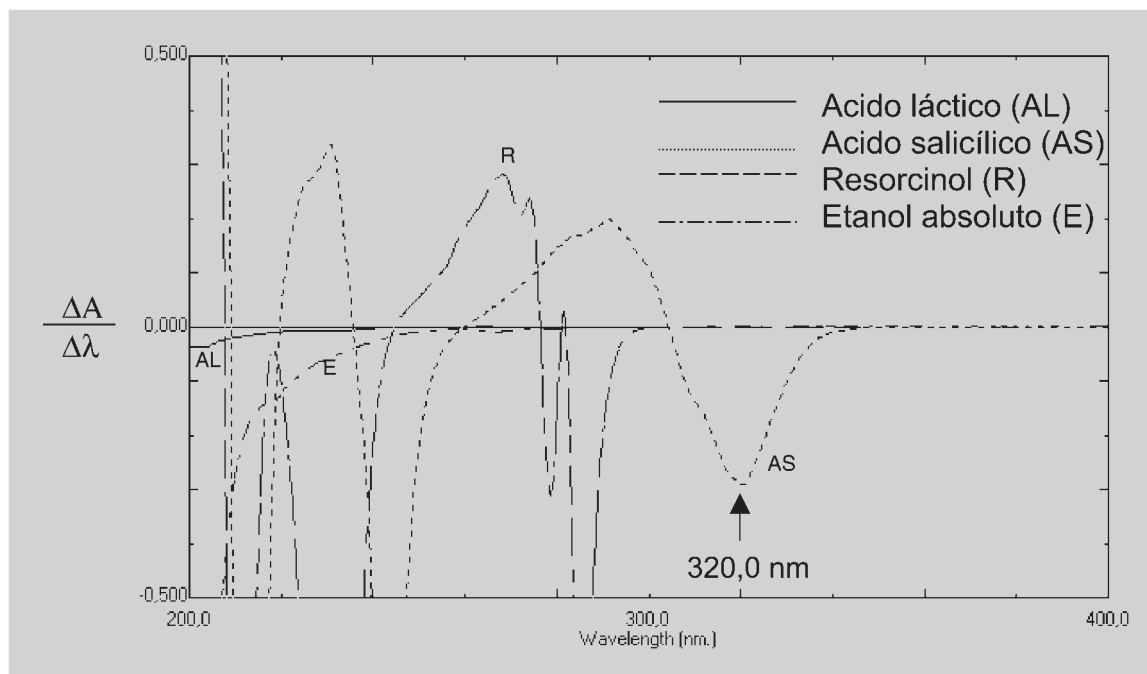


FIGURA 2 - Espectros no UV na primeira derivada do ácido salicílico (18,0 µg/mL), resorcinol (28,0 µg/mL) e ácido láctico (18,0 µg/mL) em etanol absoluto.

TABELA I - Resultados estatísticos obtidos na validação do método para a determinação do ácido salicílico e do resorcinol em SJ.

Parâmetro estatístico	Acido salicílico ^a	Resorcinol ^b
Faixa de concentração (µg/mL)	12,0–24,0	22,0–34,0
Equação da reta	$Y = 0,0165x - 0,00595$	$Y = 0,0071x - 0,00346$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9999
Limite de detecção (µg/mL)	0,19	0,27
Limite de quantificação (µg/mL)	0,65	0,91

^a Determinações na primeira derivada; ^b Determinações na segunda derivada

TABELA II - Resultados obtidos na determinação quantitativa do ácido salicílico e do resorcinol na SJ.

Solução de Jessner	Acido salicílico ^a		Resorcinol ^a	
	(g/100mL)	DPR ^b %	(g/100mL)	DPR ^b %
Amostra A	14,57	0,67	14,75	0,84
Amostra B	14,31	0,70	14,48	0,81

^a Média de dez determinações; ^bDPR = Desvio padrão relativo.

quenas quantidades de resorcinol presentes na SJ (Tabela I) e não foi observada interferência das outras substâncias que constituem a SJ.

No caso do ácido láctico, a espectrofotometria no UV não foi capaz de quantificá-lo na SJ devido às características estruturais. Seria, portanto, necessária a utilização de outro tipo de detecção ou a realização de reação de

complexação. De qualquer forma, observou-se que não houve interferência na determinação das outras substâncias em questão (Figuras 2 e 3).

Em relação à quantificação do ácido salicílico e do resorcinol em gel, observou-se que na derivada de primeira ordem existem um mínimo e um máximo a 317,2 nm e 257,6 nm, que correspondem unicamente àquelas substân-

cias. O gel base não apresentou resposta instrumental nestes comprimentos de onda empregados nas determinações analíticas (Figura 4).

Para o ácido salicílico e resorcinol em gel, os dados

da linearidade pelo método dos mínimos quadrados apresentaram bom coeficiente de correlação (Tabela IV). Os valores experimentais obtidos na quantificação indicam repetibilidade satisfatória (Tabela V). Uma boa exatidão

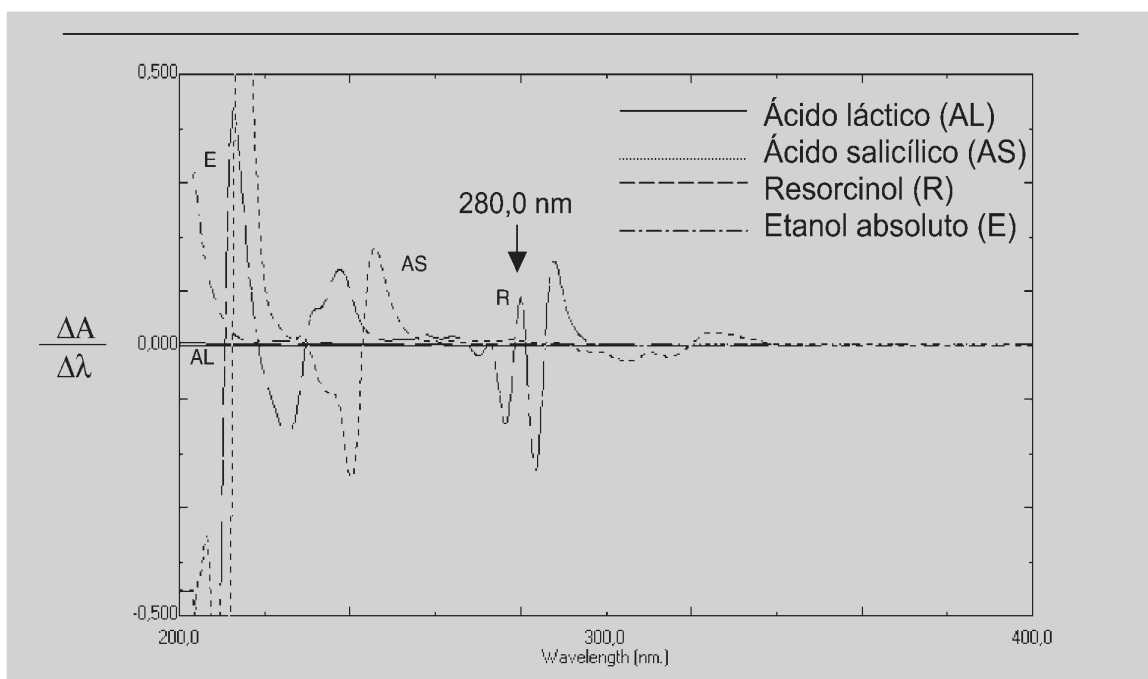


FIGURA 3 - Espectros no UV na segunda derivada do ácido salicílico (18,0 $\mu\text{g/mL}$), resorcinol (28,0 $\mu\text{g/mL}$) e ácido láctico (18,0 $\mu\text{g/mL}$) em etanol absoluto.

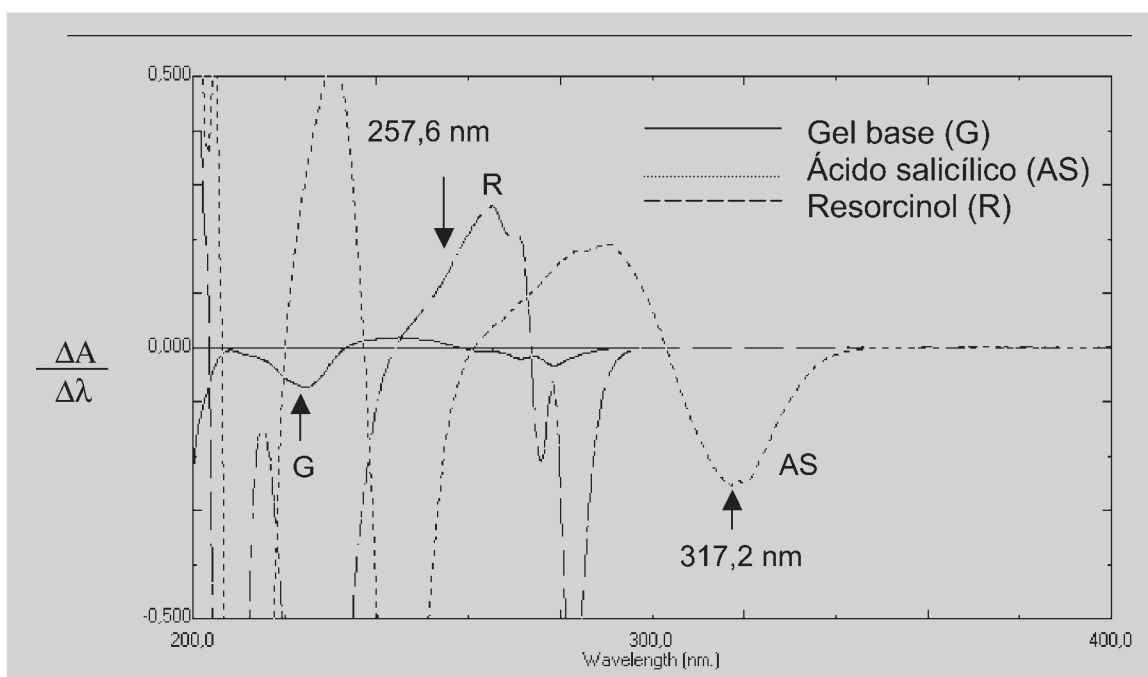


FIGURA 4 - Espectro no UV da primeira derivada do ácido salicílico 20,0 $\mu\text{g/mL}$ (AS); resorcinol 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (R) e gel base (placebo) (G) em H_2SO_4 0,1 N.

TABELA III - Recuperação das soluções padrão de ácido salicílico e de resorcinol adicionada às amostras de SJ e analisadas pelo método proposto

Amostra	Ácido salicílico			Resorcinol		
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação ^a (%) ^a	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação ^a (%) ^a
	Adicionada	Recuperada		Adicionada	Recuperada	
A	2,0	2,06	103,0 \pm 0,3	1,0	1,01	101,0 \pm 0,2
	3,0	2,98	99,3 \pm 0,2	2,0	1,98	99,0 \pm 0,1
	5,0	4,99	99,8 \pm 0,3	3,0	3,04	101,3 \pm 0,2
B	2,0	2,01	100,5 \pm 0,2	1,0	0,99	99,0 \pm 0,3
	3,0	3,03	101,0 \pm 0,2	2,0	2,01	100,5 \pm 0,4
	5,0	4,97	99,4 \pm 0,4	3,0	3,02	100,7 \pm 0,3

^a Média de três determinações**TABELA IV** - Resultados estatísticos obtidos na validação do método para a determinação do ácido salicílico e do resorcinol em géis

Parâmetro estatístico	Ácido salicílico ^a	Resorcinol ^b
Faixa de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	8,0–32,0	18,0–42,0
Equação da reta	$Y = 0,0128x - 0,00169$	$Y = 0,0062x - 0,00743$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9998
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,51	0,13
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	1,71	0,42

TABELA V - Resultados obtidos na determinação quantitativa do ácido salicílico e do resorcinol em géis

Amostra do gel	Ácido salicílico ^a		Resorcinol ^a	
	(g/100g)	DPR ^b %	(g/100g)	DPR ^b %
Amostra C	20,36	0,26		
Amostra D	19,91	0,30		
Amostra E			30,76	0,34
Amostra F			30,39	0,35

^a Média de dez determinações DPR^b = Desvio padrão relativo.**TABELA VI** - Recuperação das soluções padrão de ácido salicílico e de resorcinol adicionadas às amostras de géis e analisadas pelo método proposto

Amostra	Ácido salicílico			Amostra	Resorcinol		
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação ^a (%) ^a		Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação ^a (%) ^a
	Adicionada	Recuperada			Adicionada	Recuperada	
C	4,0	3,93	98,2 \pm 0,1	E	4,0	3,99	99,8 \pm 0,2
	5,0	4,90	98,0 \pm 0,3		5,0	5,00	100,0 \pm 0,3
	10,0	10,08	100,8 \pm 0,3		10,0	10,00	100,0 \pm 0,3
D	4,0	3,98	99,5 \pm 0,2	F	4,0	3,93	98,2 \pm 0,2
	5,0	4,97	99,4 \pm 0,2		5,0	5,04	100,8 \pm 0,2
	10,0	9,99	99,9 \pm 0,3		10,0	10,04	100,4 \pm 0,2

^a Média de três determinações

do método foi comprovada nos testes de recuperação (Tabela VI). O método demonstrou ser sensível a pequenas quantidades dos princípios ativos, como indicam os resultados dos limites de detecção e de quantificação (Tabela IV). Não foi observada interferência do placebo dos géis.

CONCLUSÕES

Os métodos propostos podem ser empregados para a determinação quantitativa do ácido salicílico e do resorcinol em SJ, bem como do ácido salicílico e do resorcinol em géis. Os métodos mostraram-se rápidos, simples, precisos, exatos e sensíveis. Uma vantagem é que estes métodos são de baixo custo e pouco impacto ambiental. Os métodos propostos e validados podem ser utilizados na análise de rotina para o controle de qualidade deste tipo de preparações farmacêuticas.

ABSTRACT

Validation of analytical methods for the determination of active substances in pharmaceutical preparations used in chemical peelings

Chemical peeling is obtained with exfoliating formulations and is used in the treatment of actinic keratosis, wrinkles, dyschromies, acne vulgaris and rosacea acne. In this research we selected the Jessner Solution (JS), a pharmaceutical preparation composed of resorcinol (RS) (14%), salicylic acid (SA) (14%) and lactic acid (LA) (14%) in alcoholic solution and two gel samples composed of RS (30%) and SA (20%), respectively. First and second derivative UV spectrophotometric methods were developed and validated for determination of SA and RS, respectively in JS alcoholic solution, ethanol was used as background. A first derivative UV spectrophotometric method was developed for determination of these active substances in gel samples using 0.1N sulfuric acid as background. For SA in the JS, the correlation coefficient (r) was 0.9999, the precision expressed by the relative standard deviation (RSD) of 0.68% and the accuracy expressed by the average percent recovery of 100.5%. For RS in the JS, the r was 0.9999, the RSD of 0.83% and average recovery of 100.3%. In the gel of SA r was 0.9999, the mean RSD was 0.28% and average recovery of 99.3%. In the gel of RS the r was 0.9998, mean RSD was 0.34% and average recovery of 99.9%.

Uniterms: Chemical peelings. Salicylic acid. Resorcinol. Derivative spectrophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, 2000. v.1.
- BATISTUZZO, J.A.O.; ITAYA, M.; ETO, Y. *Formulário médico-farmacêutico*. São Paulo: Tecnopress, 2000. p.147-229.
- BRODY, H.J. "Peeling" químico e "resurfacing". 2.ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2000. p.5, 45-51, 120-121.
- GOMEZ, R.M.; OLSINA, R. A.; MARTINEZ, L.D.; SILVA, M.F. Simultaneous determination of chloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms. *Talanta*, Amsterdam, v.61, n.2, p.233-238, 2003.
- GOU, X.J.; ZHOU, M. Determination of resorcinol and salicylic acid in piyaning tincture by high-performance liquid chromatography. *Sepeu*, Beijing, v.16, n.6, p.532-533, 1998.
- ICH Q2b. Text on validation of analytical procedure: methodology. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 04 maio 2001.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, New York, v. 19, n 5, p. 737-757, 1996.
- KATSAMBAS, A.D.; STRATIGOS, A.J. Dermatologic therapy in the new millennium. *Clin. Dermatol.*, Tokyo, v.19, p.65-67, 2001.
- MONHEIT, G.D. Chemical peeling vs. laser resurfacing. *Dermatol. Surg.*, New York, v.27, p.213-214, 2001.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm. Technol.*, São Paulo, v.2, n. 3, p.12-20, 1998.

Recebido para publicação em 17 de maio de 2004.

Aceito para publicação em 04 de abril de 2005.