



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ESPIRONOLACTONA EM SISTEMAS NANOPARTICULADOS E EM
ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA**

Estudante: Larissa Alves Ferreira

Matrícula: 14/0148507

Orientador: Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Me. Ricardo Ferreira Nunes

Brasília, 2019

LARISSA ALVES FERREIRA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ESPIRONOLACTONA EM SISTEMAS NANOPARTICULADOS E EM
ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de Farmácia
da Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília como requisito
parcial à obtenção do grau de
Farmacêutica

Orientador: Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Co-orientador: Me. Ricardo Ferreira Nunes

Brasília, 2019

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. METODOLOGIA	4
2.1 QUÍMICOS E REAGENTES	4
2.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	4
2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	5
2.3.1 SELETIVIDADE	5
2.3.2 LINEARIDADE	5
2.3.3 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	6
2.3.4 PRECISÃO	6
2.3.5 EXATIDÃO	6
2.3.6 ROBUSTEZ	7
2.4 APLICABILIDADE DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	8
3.1 VALIDAÇÃO	8
3.1.1 SELETIVIDADE	9
3.1.2 LINEARIDADE	11
3.1.3 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO... ..	12
3.1.4 PRECISÃO	12
3.1.5 EXATIDÃO	13
3.1.6 ROBUSTEZ	14
3.2 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA	17
4. CONCLUSÕES	18
REFERÊNCIAS	18

RESUMO

A espironolactona é um fármaco cujo mecanismo de ação se baseia no antagonismo da aldosterona, a qual atua na regulação do equilíbrio eletrolítico nos túbulos renais e, portanto, é utilizada como diurético poupador de potássio. Além disso, a espironolactona também apresenta efeitos hormonais, sendo um fármaco promissor no tratamento da acne. Porém, por possuir importantes efeitos adversos sistêmicos, seu uso tópico deve ser estimulado. Na literatura, poucos estudos foram realizados em relação ao desenvolvimento de um método analítico com o intuito de quantificar este fármaco em formulações contendo nanopartículas nenhum método até onde se sabe foi encontrado para sua análise em estudos de permeação cutânea utilizados no desenvolvimento de medicamentos de uso tópico. Portanto, este trabalho teve como objetivo adaptar e validar um método cromatográfico simples, rápido e sensível para a quantificação de espironolactona em sistemas nanoparticulados e em estudos de permeação cutânea. A análise cromatográfica da espironolactona foi realizada utilizando uma coluna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) em forno mantido a 30°C, com eluição isocrática a uma vazão igual a 1 mL/min, utilizando um fase móvel composta por metanol e água ultrapura (60:40 v/v). A detecção foi realizada em 238 nm. O tempo de retenção para a espironolactona foi de aproximadamente 6,4 minutos. O método apresentou-se linear em uma faixa de concentração de 0,5 a 30,0 µg/mL, com coeficiente de correlação linear (r) superior a 0,999. Além disso foi preciso, com um coeficiente de variação geral abaixo de 5% e exato com taxas de recuperação das camadas de pele superiores a 85%. O método foi considerado seletivo frente à diversos excipientes utilizado no preparo de nanopartículas, como Policaprolactona e Eudragit® (E100 e L100). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,2415 e 0,7320 µg/mL, respectivamente, e o método foi considerado robusto após pequenas modificações. Portanto, o método validado para a quantificação da espironolactona pode ser importante ferramenta em estudos de permeação cutânea utilizados no desenvolvimento de novas formulações nanoparticuladas para tratamento tópico da acne.

Palavras-chave: Espironolactona. Cromatografia a líquida de alta eficiência. Validação analítica.

ABSTRACT

Spironolactone is a drug whose mechanism of action is based on the antagonism of aldosterone, which acts on the regulation of electrolyte balance in the renal tubules and, therefore, is used as a potassium-sparing diuretic. In addition, spironolactone also has hormonal effects, being a promising drug in the treatment of acne. However, due to its important systemic adverse effects, its topical use should be encouraged. Though, few studies have been carried out about the development of an analytical method with the aim of quantifying this drug in nanoparticulate formulations and none at this point was found to its determination in skin permeation studies. In this way, this work aimed to adapt and validate a chromatographic simple and sensitive method of quantifying spironolactone in nanoparticle systems and in skin permeation studies. The chromatographic analysis of spironolactone was performed using a C₁₈ column (150mm x 4.6mm, 5 μm) maintained at 30°C, with isocratic elution at a flow rate of 1 mL/min, of a mobile phase composed of methanol and ultrapure water (60:40 v/v). Detection was performed at 238 nm. The retention time for spironolactone was approximately 6.4 minutes. The method is presented in a linear concentration range from 0.5 to 30.0 μg/mL, with linear correlation coefficient (r) above 0.999. In addition, the method was precise with a coefficient of variation below 5% and accurate with recovery rates of the layers of skin above 85%. The method was considered selective in front of various excipients used in the preparation of nanoparticles, such as Polycaprolactone and Eudragit® (E100 and L100). The limits of detection and quantification were 0.2415 and 0.7320 μg/mL, respectively, and the method was considered robust after minor modifications. Therefore, the validated method for the quantification of spironolactone may be an important tool in cutaneous permeation studies used in development of novel nanoparticulate formulations for the treatment of acne.

Keywords: *Spironolactone. High performance liquid chromatography. Analytical validation.*

1. INTRODUÇÃO

A espironolactona (17-hidroxi-7-mercaptop-3-oxo-17-pregn-4-ene-21-ácido carboxílico lactona-7-acetato - Figura 1) é um fármaco utilizado como diurético poupador de potássio que atua pelo antagonismo da aldosterona nos túbulos renais distais (DAVIES e WILSON, 1975). É utilizada principalmente no tratamento de hipertensão e edema refratário em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica ou cirrose hepática (PITT, et al. 2014). Além disso, ela também é utilizada para o tratamento sistêmico da acne e hirsutismo, devido aos seus efeitos hormonais (LAYTON, et al. 2017).

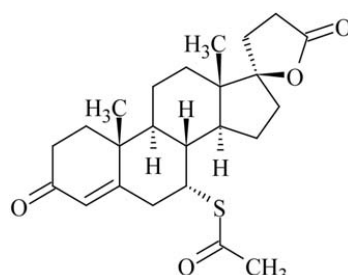


Figura 1: Estrutura química da espironolactona. Peso Molecular: 416.576

Da. LogP: 2.78. Solubilidade em água: 22 mg/L (25°C).

A espironolactona atua sobre efeitos antiandrogênicos em razão de sua habilidade em bloquear receptores di-hidrotestosterona (DHT) (CORVOL, et al. 1975; NIRDÉ, et al. 2001). Sabe-se que os hormônios androgênicos estimulam a produção de sebo e este aumento na produção está relacionado com o aumento da acne (FAURE, 2002). Estudos clínicos mostraram que a espironolactona oral (50-300 mg/dia) é capaz de reduzir as taxas de secreção de sebo, resultando em uma melhora do quadro da acne (GOODFELLOW, et al. 1984; MUHLEMANN, et al. 1986). Entretanto, existem alguns efeitos adversos devido à ação sistêmica da espironolactona, como ginecomastia em homens e distúrbios menstruais em mulheres (CHARNY, et al. 2017). A eficácia da utilização da espironolactona por via tópica é demonstrada em diversos estudos (AFZALI, et al. 2012; YAMAMOTO e ITO, 1996), os quais foram observado uma melhora significativa da acne. O tratamento tópico possui algumas vantagens, como: ação local, melhor adesão e diminuição dos efeitos adversos (AFZALI, et al. 2012; YAMAMOTO, et al. 1996).

A validação de um método analítico é de extrema importância para determinar, de forma qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa, um fármaco em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2017). Alguns estudos na literatura utilizam a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação da espironolactona, principalmente em formas farmacêuticas sólidas, associada ou não com outros fármacos (Tabela 1). No entanto, poucos estudos foram realizados em relação ao desenvolvimento de um método analítico com o intuito de determinar a espironolactona em formulações nanoparticuladas e nenhum deles o fazia em estudos de permeação cutânea, utilizados no desenvolvimento de formulações tópicas.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo principal a adaptação e validação de um método analítico, utilizando CLAE, que seja seletivo, preciso e exato para a quantificação de espironolactona tanto em formulações nanoparticuladas quanto em estudos de permeação cutânea comumente realizados na etapa de desenvolvimento de novos medicamentos de uso tópico.

Tabela 1. Métodos descritos na literatura para quantificação de espironolactona e seu respectivo método de detecção e aplicabilidade

REFERÊNCIA	ANALITOS	TÉCNICA DE SEPARAÇÃO E DETECÇÃO	APLICAÇÃO
(SANDALL et al. 2006)	Espironolactona	HPLC-UV (238nm)	Ensaio para quantificação em amostras de plasma pediátrico
(LAXMAN et al. 2010)	Torasemida Espironolactona	HPLC-UV (210; 268nm)	Ensaio para quantificação em comprimidos
(DESHPANDE et al. 2012)	Torasemida Espironolactona	HPLC-UV (240 nm)	Ensaio para quantificação em comprimidos
(RAM, DAVE, AND JOSHI 2012)	Furosemida Espironolactona	HPLC-UV (254nm)	Ensaio para quantificação em comprimidos
(WALASH et al. 2013)	Metolazona Espironolactona	HPLC-UV (238nm)	Ensaio para quantificação em matérias-primas, comprimidos combinados e urina humana
(SAYYED et al. 2015)	Hidroclorotiazida Espironolactona	HPLC-UV (238nm)	Ensaio para quantificação em comprimidos
(ANDERSON et al. 2017)	Atenolol Furosemida Losartana Espironolactona	HPLC-UV (225 nm)	Ensaio para quantificação em cápsulas
(HAMDAN AND MOHAMMED 2017)	Espironolactona	Espectrofotometria UV (251,5nm)	Ensaio para quantificação em comprimidos por derivatização de hidrazina

2. MATERIAL E MÉTODOS

O método analítico proposto foi otimizado e validado conforme as diretrizes do *Internacional Conference of Harmonisation (ICH)*, *Food and Drug Administration (FDA)* e pela *Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA)*, considerando os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (FDA, 2015; ICH, 2006; BRASIL, 2017).

2.1 QUÍMICOS E REAGENTES

A espironolactona ($\geq 99,9\%$), policaprolactona (PCL), álcool polivinílico (PVA) e o Tween[®] 80 (TW80) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os polímeros Eudragit[®] L100 (EL100) e Eudragit[®] E100 (EE100) foram gentilmente doados pela empresa Evonik (Essen, Alemanha). O metanol utilizado foi adquirido da Tedia Brasil (Rio de Janeiro, Brasil). A técnica de *tape stripping* diferencial foi realizada utilizando a fita Scotch n° 845 Book Tape (3M, St. Paul, MN, EUA) e cola de cianoacrilato (Henkel Loctite, Dublin, Irlanda). A pele removida das orelhas de suínos foi obtida de um abatedouro local (NippoBras, Formosa, Brasil). A água ultrapura usada em todos experimentos foi obtida por um sistema Milli-Q (Millipore, Illkirch Graffenstaden, França).

2.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de CLAE (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um forno (modelo CTO-10AS), um detector espectrofotométrico DAD (modelo SPD-M20A) e um injetor automático de amostras (modelo 9SIL-20AD). A aquisição de dados, análises e relatórios foram realizados usando o software *Shimadzu LC Solution*. Para a fase estacionária, utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm; Shim pack, Shimadzu). A fase móvel foi composta por metanol e água ultrapura na proporção de 60:40 (v/v) aplicada a um sistema de eluição isocrático com uma vazão igual a 1,0 mL/min. O forno que envolvia a coluna foi mantido a 30°C durante todas as análises. A espironolactona foi detectada por

absorbância no UV a 238 nm. O volume de injeção de cada amostra foi de 20 µL.

2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

2.3.1 SELETIVIDADE

Para a avaliação da seletividade, o padrão de espironolactona em concentração de 15,0 µg/mL foi avaliado frente a alguns contaminantes, preparados conforme descrito abaixo. Este teste foi realizado em sextuplicata para cada amostra e os resultados da áreas do pico foram analisados seguindo a análise ANOVA unidirecional com um nível de significância de 0,05.

- Contaminantes de pele: As amostras contaminantes de estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR), foram obtidas pela técnica de *differential tape-stripping* (TEICHMANN, et al. 2005), utilizando fragmentos de 1,0 cm² de pele de orelha de suínos. O EC foi removido com o auxílio de 10 fitas adesivas aderidas e retiradas sucessivamente à superfície da pele. Após a remoção do EC, foi aplicado sobre a pele 1 gota de cola de cianocrilato para remoção dos FP. Esse processo foi repetido 2 vezes. A PR foi picotada. Posteriormente, cada camada de pele foi colocada em frascos de vidro e fechados individualmente. Na sequência, adicionou-se 5 mL de metanol e essa mistura permaneceu sob agitação (300 rpm) durante 12 h. O solvente foi então filtrado através de um filtro hidrofílico de membrana de 0,22 µm para a obtenção das soluções contaminantes.
- Contaminantes com excipientes de sistemas nanoparticulados: Foram produzidas duas soluções, sendo uma solução contendo os seguintes polímeros: PCL, EL100 e EE100, na concentração final de 250 µg/mL em metanol. Outra solução foi preparada com os seguintes tensoativos: PVA e TW80, também na concentração de 250 µg/mL. Estes polímeros e excipientes foram escolhidos por apresentarem características adequadas para serem utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas para encapsulação de fármacos lipofílicos (GUHAGARKAR, et al. 2009; LUPPI, et al. 2004) como é o caso da espironolactona.

2.3.2 LINEARIDADE

Uma solução estoque foi preparada na concentração de 100 µg/mL em metanol. A partir dessa solução, foram realizadas as seguintes diluições: 0,5; 1,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 µg/mL.

A análise em CLAE foi realizada em triplicada sob as condições cromatográficas supracitadas. O metanol foi utilizado como branco. As curvas analíticas foram obtidas plotando-se área fornecida pelo equipamento em relação à concentração do fármaco na respectiva amostra. A análise estatística dos dados foi realizada pelo método de regressão linear, obtendo-se uma reta no formato $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) o coeficiente linear. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), e que segundo o limite mínimo aceitável, esse valor deve ser superior à 0,999 (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017).

2.3.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) representa a concentração mínima de espironolactona que pode ser quantificada com precisão e exatidão, enquanto que o limite de detecção (LD) é a concentração mínima que pode ser qualitativamente identificada (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017). Esses parâmetros foram calculados com base na curva de calibração preparada de acordo com o item anterior, segundo as equações abaixo:

$$LD = 3.3 \sigma / S \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LQ = 10 \sigma / S \quad \text{(Equação 2),}$$

onde σ é o desvio padrão médio e S é a inclinação da curva de calibração.

2.3.4 PRECISÃO

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada com três concentrações de espironolactona (1,0; 15,0 e 30,0 µg/mL), que contempla o intervalo do método analítico. Já a precisão intermediária foi avaliada em dois dias diferentes e por dois analistas. Os resultados de precisão são expressos como coeficiente de variação (CV), calculado de acordo com a equação 3:

$$CV = (\text{desvio padrão da concentração média} / \text{média}) \times 100$$

$$\text{(Equação 3)}$$

2.3.5 EXATIDÃO

Para esse parâmetro, foram obtidas peles de orelha de suínos com área de 1,5 cm². Em seguida, foi realizada a técnica de *diferencial tape striping* para a remoção do EC, FP e PR (TEICHMANN, et al. 2005). Essas camadas de pele foram acondicionadas, separadamente, em frascos de vidro. A esses materiais foram adicionados diferentes volumes de solução padrão de espironolactona a 100 µg/mL em metanol, de modo que após secagem do solvente e ressuspensão em 5 mL de solvente extrator correspondesse a concentrações iguais a 1,0; 15,0 e 30,0 µg/mL.

Assim, após a evaporação total do metanol, foram adicionados 5 mL metanol para extração do fármaco. Para isso, os frascos foram colocados sob agitação magnética (300 rpm) por 12 h. Após esse período, as amostras foram filtradas em membrana com porosidade de 0,22 µm e quantificados por CLAE. Este ensaio foi realizado em triplicada para cada concentração avaliada. A recuperação (R%) foi determinada calculando a razão entre a quantidade extraída das amostras e a quantidade de espironolactona adicionada, seguindo a equação 4.

$$R(\%) = (\text{concentração mensurada}/\text{concentração adicionada}) \times 100$$

(Equação 4)

2.3.6 ROBUSTEZ

Para determinar a robustez do método utilizou-se metodologia adaptada de Serna-Jiménez e colaboradores (2011). Assim, o tempo de retenção e a área do pico da concentração padrão da espironolactona (15,0 µg/mL) foram avaliados alterando a taxa de fluxo da fase móvel ($\pm 0,2$ mL/min), a temperatura do forno ($\pm 2^\circ\text{C}$) e o comprimento de onda (± 2 nm) do detector, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros que serão avaliados no ensaio de robustez.

Condição alterada (-2)	Condição normal (0)	Condição alterada (+2)
Fase móvel (mL/min)		
0,8	1,0	1,2
Temperatura do forno (°C)		
28,0	30,0	32,0
Comprimento de onda (nm)		
236	238	240

2.4 APLICABILIDADE DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A permeação de espironolactona através da pele suína foi determinada *in vitro* usando células de difusão vertical do tipo Franz modificada. Os recortes de pele foram montados entre os compartimentos doador e receptor das células. O compartimento doador foi preenchido com 1 mL de solução hidroalcoólica (50%) de espironolactona à 500 µg/mL. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão acrescido de 0,5% SDS e mantido a 32 °C ± 2°C sob agitação por 12 horas. Após esse período, a pele então foi removida das células de difusão, e o excesso de formulação foi removido com um papel absorvente e água. As camadas da pele foram separadas (EC, FP e PR) e a espironolactona foi extraída, segundo método descrito no item 2.3.5. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro hidrofílico com porosidade de 0,22 µm e quantificadas por CLAE. Os resultados foram plotados em gráfico com a quantidade de espironolactona extraído de cada camada da pele em µg/cm².

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 VALIDAÇÃO

A validação assegura por meio de estudos experimentais que o método analítico seja confiável e que cumpra às exigências das aplicações analíticas. O método será considerado validado, portanto, desde que sejam avaliados alguns mínimos parâmetros estabelecidos, como: seletividade,

linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017).

Como pode ser observado na Figura 2, o pico do padrão de espironolactona solubilizado metanol eluiu em 6,4 minutos. O pico apresentou características de fator de cauda (0,8 - 1,2), pratos teóricos (< 2000) e resolução (< 2,0) dentro dos parâmetros estabelecidos por agências reguladoras (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017).

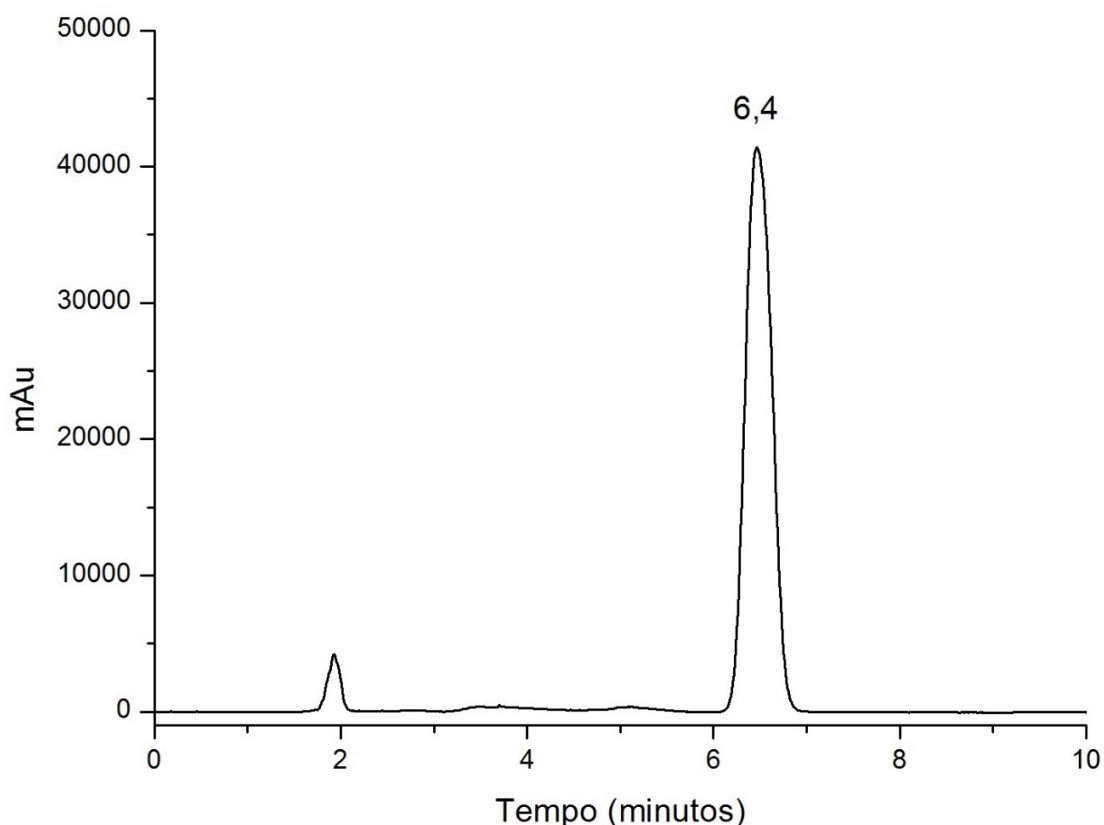


Figura 2: Cromatograma referente à injeção de uma solução padrão de espironolactona em metanol. Detecção: 238 nm. Tempo de retenção da espironolactona: 6.4 minutos.

3.1.1 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade do método de quantificar o analito de interesse, neste caso, a espironolactona, na presença de contaminantes de relevância para os experimentos a que o método servirá (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017). As amostras padrão de espironolactona foram contaminadas com diferentes interferentes, como EC, FP e PR, além de alguns

constituintes básicos utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas, como PCL, EE100, EL100, PVA e TW80. Essas amostras contaminadas foram comparadas com amostras não contaminadas (padrão).

A análise não mostrou diferenças significativas entre as áreas de pico da solução padrão isolada e em combinação com os interferentes (Figura 3). Portanto, o método analítico quantificou a espironolactona com exatidão (100,0%) e mantendo um CV abaixo de 5% , conforme as recomendações (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017).

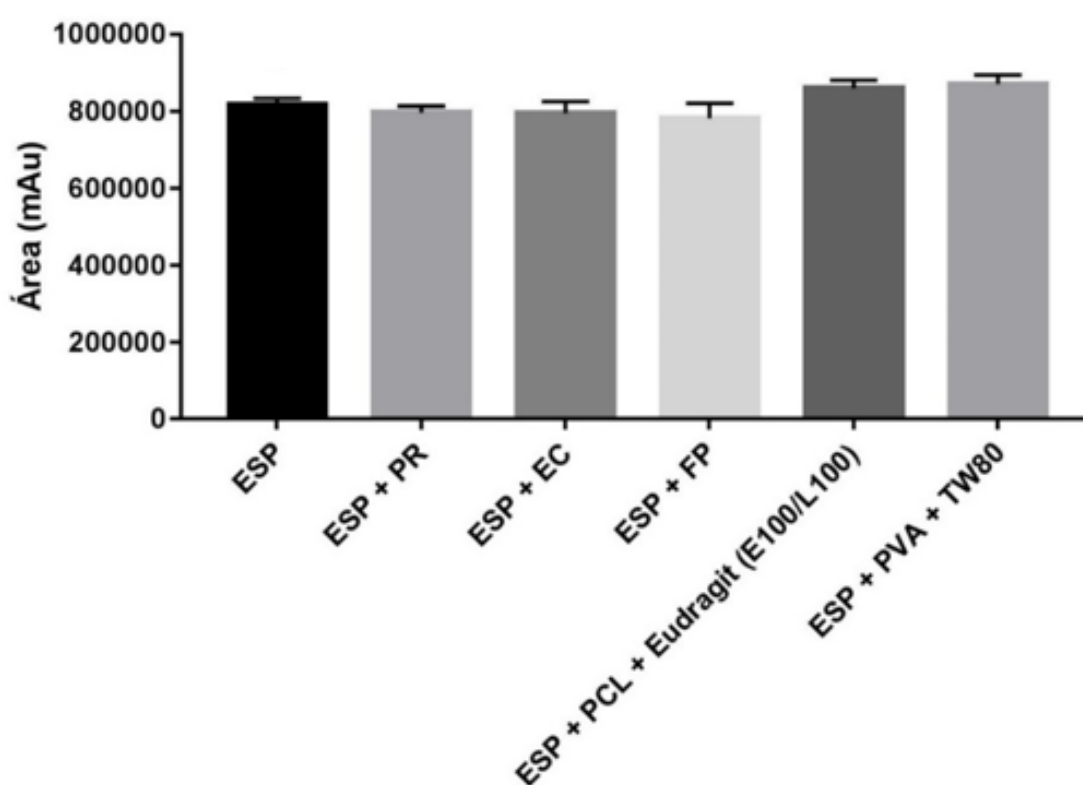


Figura 3: Área de pico da espironolactona e soluções com diferentes interferentes.

O tempo de retenção é o tempo decorrido do instante em que a amostra foi introduzida no equipamento até o instante do máximo do pico. Pode ser usado também para a demonstração de que o resultado não é afetado na presença de interferentes (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017). Não houve alterações significativas, o método se mostrou capaz de quantificar o fármaco

com precisão e exatidão adequada. O tempo de retenção foi mantido em 6,4 minutos, com oscilações menores que 0,06 minutos. Os resultados estão mostrados na Figura 4.

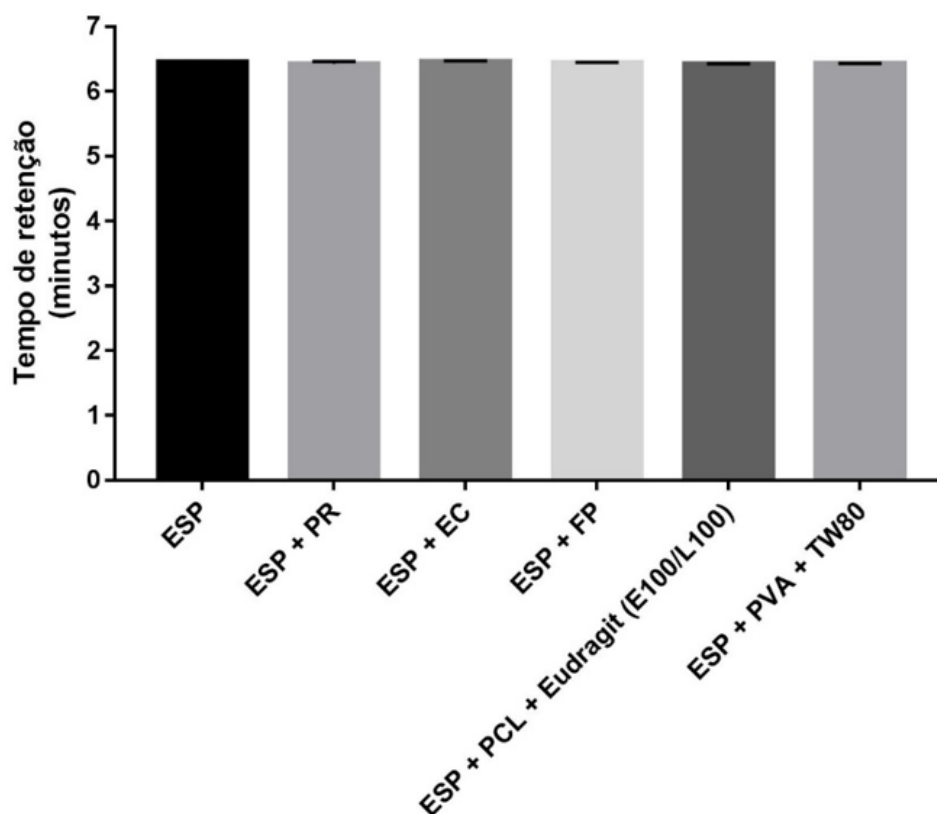


Figura 4: Tempo de retenção da espironolactona e soluções com diferentes interferentes.

3.1.2 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017). A regressão da curva linear obteve a seguinte equação: $y = 51920 x - 2082,9$, em que y é a área do pico e x é a concentração de espironolactona em $\mu\text{g/mL}$. O método apresentou proporcionalidade entre a área e concentração (Figura 5), em uma ampla faixa de concentrações (1,0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$), o que é desejável para a aplicação do estudo. O coeficiente de correlação foi de 0,9999 e atende aos requisitos vigentes para validação. A

média do coeficiente de variação (CV%) dos fatores de resposta foi de 3,6%, estando dentro do limite aceitável de 5% (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017).

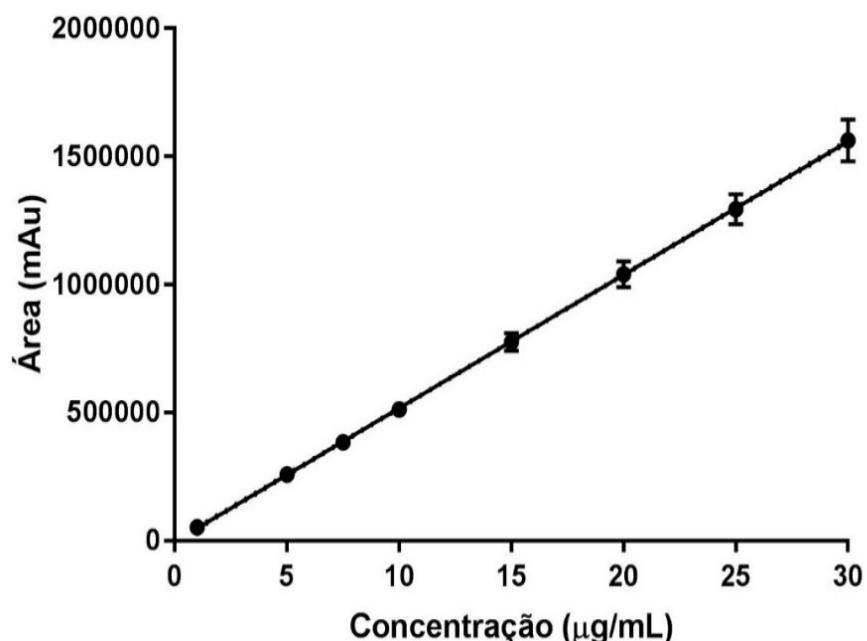


Figura 5: Curva analítica da espirolactona com faixa de concentração entre 1,0 a 30,0 µg/mL. Equação da reta: $y = 51920 x - 2082,9$. Coeficiente de correlação: 0,9999.

3.1.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O LD e LQ foram de 0,2415 e 0,732 µg/mL, respectivamente. Esses valores se apresentam baixos e são suficientes para analisar com segurança a presença ou concentração da espirolactona em formulações nanoestruturadas tópicas, também sendo úteis em estudos de liberação, considerando que nas horas iniciais se tem uma baixa concentração do fármaco a ser quantificado.

3.1.4 PRECISÃO

A precisão foi expressa por meio da repetitividade e da precisão intermediária (ICH, 2006; FDA, 2015; BRASIL, 2017). Ao analisar os resultados (Tabela 5), o teste de repetibilidade obteve resultados satisfatórios,

demonstrando que o método é capaz de se ajustar e quantificar mesmo com uma variação entre diferentes concentrações da amostra.

Tabela 5: Repetibilidade do método analítico.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1,00	1,01	3,59	101,11
15,00	15,74	0,87	104,97
30,00	30,55	0,51	101,83

A precisão pode ser expressa como coeficiente de variação, não se admitindo valores superiores a 5% (FDA, 2015; ICH, 2006; BRASIL, 2017). Os valores de CV para a precisão intermediária (Tabela 6) apresentaram respostas adequadas mesmo com a variação do analista e o dia da análise. Todos resultados obtiveram um CV abaixo de 5% mantendo o critério de aceitação (FDA, 2015; ICH, 2006; BRASIL, 2017).

Tabela 6: Precisão intermediária do método analítico.

Concentração teórica (µg/mL)	Condição		Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	CV geral (%)
1,0	Analista 1	Dia 1	0,97	1,03	3,30
	Analista 2	Dia 1	1,02	1,60	
	Analista 1	Dia 2	0,96	1,45	
	Analista 2	Dia 2	1,03	1,59	
15,0	Analista 1	Dia 1	15,51	0,70	1,40
	Analista 2	Dia 1	15,02	0,85	
	Analista 1	Dia 2	15,62	0,56	
	Analista 2	Dia 2	15,42	0,59	
30,0	Analista 1	Dia 1	30,80	0,44	1,00
	Analista 2	Dia 1	30,98	1,36	
	Analista 1	Dia 2	30,65	0,32	
	Analista 2	Dia 2	31,04	0,38	

3.1.5 EXATIDÃO

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida da espironolactona adicionada às amostras com interferentes. No caso de métodos bioanalíticos, as agências regulatórias estabelecem um limite para a recuperação, o qual não deve exceder $\pm 15\%$ (FDA, 2015; ICH, 2006; BRASIL, 2017). A Tabela 7 mostra os valores da recuperação da espironolactona nas amostras de EC, FP e PR. Pode-se observar que todas as amostras obtiveram valores de recuperação dentro dos limites estabelecidos pelas diretrizes, entre 85% e 115%, indicando que o fármaco é extraído adequadamente da pele e tendo uma boa adequação para estudos de permeação cutânea.

Tabela 7. Recuperação da espironolactona em três níveis de concentração e para as três camadas da pele utilizada para demonstrar a exatidão do método analítico.

Amostra	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração analisada ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Recuperação (%)
Estrato córneo	1,00	0,95	1,93	95,44
	15,0	15,48	2,53	103,20
	30,0	28,83	1,87	96,12
Folículos pilosos	1,00	0,95	8,14	95,97
	15,00	16,16	4,84	107,74
	30,00	29,86	1,32	99,55
Pele remanescente	1,00	1,04	8,50	104,92
	15,00	14,98	5,12	99,91
	30,00	29,27	0,91	97,59

3.1.6 ROBUSTEZ

A robustez refere-se à confiabilidade de um método analítico em condições normais de trabalho e sua capacidade de permanecer inalterado por modificações intencionais dos parâmetros do método analítico (FDA, 2015; ICH, 2006; BRASIL, 2017). Para determinar a robustez, a área de uma concentração padrão e o tempo de retenção da espironolactona foram avaliados alterando o comprimento de onda de detecção, a composição da fase móvel, a vazão de eluição da fase móvel e a temperatura do forno (SERNA-JIMÉNEZ, et al. 2012).

Nota-se que o tempo de retenção mudou em relação a composição da fase móvel, em que o aumento no volume de água (58:42 v/v) resultou em um maior tempo de retenção do fármaco, enquanto um aumento na concentração de metanol (62:38 v/v) resultou em um menor tempo de retenção dele, o que se deve ao fato da espironolactona, sendo uma substância lipofílica, ser mais solúvel em metanol do que em água (USP, 2019).

Alterações na vazão da fase móvel de 0,8 mL/min e 1,2 mL/min resultaram em mudanças no tempo de retenção e na área de pico e, conseqüentemente, no teor de espironolactona avaliado, conforme mostrado na Tabela 8. Assim, observa-se que modificações neste parâmetro pode resultar em impactos significativos no teor do fármaco analisado.

Não se verificou diferenças estatisticamente significativas da concentração, área ou tempo de retenção quando a variação foi realizada modificando o comprimento de onda e temperatura do forno. Todos os resultados obtidos nesses experimentos apresentaram um CV abaixo de 5%.

Esses ensaios apontam, portanto, que na aplicação do método, para quantificação da espironolactona deve-se atentar para parâmetros como a composição da fase móvel e sua vazão no equipamento, que são cruciais na correta quantificação do fármaco. Todavia, pode-se afirmar que o método se apresentou robusto frente a variações no comprimento de onda de detecção e temperatura do forno.

Tabela 8. Resultados dos parâmetros modificados para análise de robustez do método analítico.

Parâmetro	Variação	Concentração (µg/mL)	CV (%) da concentração	Área	CV (%) da área	Tempo de retenção (min)	CV (%) do tempo de retenção	Teor (%)
Comprimento de onda (nm)	236	12,70	0,391	646712	0,383	7,288	0,089	97,02
	238	13,09	0,422	666196	0,413	7,288	0,089	100,0
	240	13,09	0,219	666461	0,214	7,288	0,078	100,0
Composição da fase móvel (MeOH: H₂O v/v)	58:42	12,82	0,096	653121	0,094	8,661	0,119	97,93
	60:40	13,09	0,422	666196	0,413	7,288	0,089	100,0
	62:38	13,06	0,158	664911	0,155	6,599	0,107	99,77
Fluxo (mL/min)	0,8	16,16	0,099	819623	0,101	8,917	0,216	123,45
	1,0	13,09	0,413	666196	0,422	7,288	0,089	100,0
	1,2	10,83	0,322	553587	0,330	6,172	0,007	82,73
Temperatura do forno (°C)	28,0	13,03	0,073	663454	0,072	7,558	0,134	99,54
	30,0	13,09	0,422	666196	0,413	7,288	0,089	100,0
	32,0	13,05	0,272	664420	0,267	7,078	0,006	99,69

3.2 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

O estudo de permeação cutânea foi realizado *in vitro* tratando-se a pele por 12 h com uma solução do fármaco a 500 µg/mL. Após esse período, a pele foi limpa, as camadas da pele foram separadas (EC, FP e PR) e a quantidade de espironolactona penetrada em cada uma delas foi extraída e então quantificada segundo o método desenvolvido e validado.

O método desenvolvido foi capaz de quantificar a espironolactona em todas as camadas da pele, diferenciando as quantidades penetradas em cada uma delas (Figura 6). Pelos estudos, espironolactona teve um maior acúmulo no estrato córneo, visto que a solução do fármaco não possui boas propriedades de penetração cutânea (LUPPI, 2004). Além disso, fármacos com alto valor de logP (2,78) são mais lipofílicos, como no caso, a espironolactona (USP, 2019), tendem a apresentar uma maior penetração na pele através do EC e atingir a pele viável (ALVES, 2015). Os resultados, portanto, foram coerentes, o que mostra a utilidade do método proposto e validado no presente trabalho.

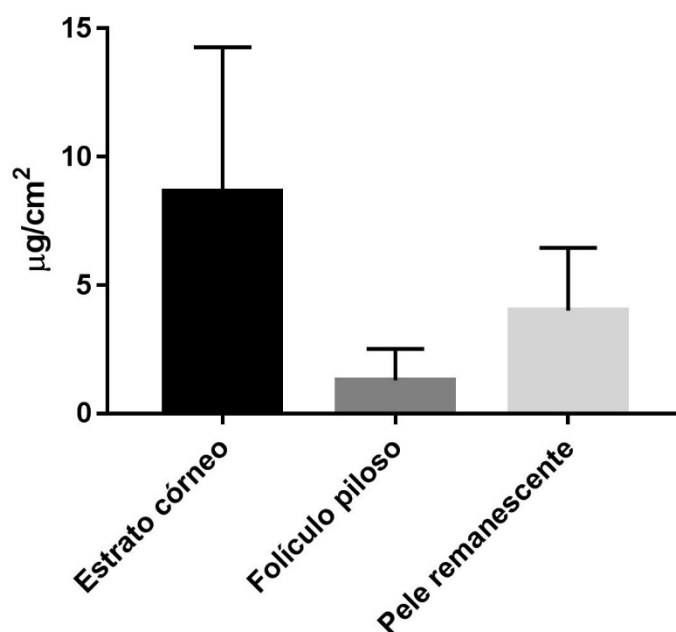


Figura 6: Estudo de permeação cutânea da espironolactona

4. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou, de acordo com os resultados obtidos, que foi possível realizar a validação de um método cromatográfico simples, rápido e adequado para a quantificação de espironolactona viável em formulações farmacêuticas nanoparticuladas e em estudos de permeação cutânea, e deverá ser útil no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento tópico da acne. Os resultados da validação do método cromatográfico podem ser considerados úteis, uma vez que a linearidade, especificidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez do método permitem a determinação quantitativa de espironolactona contida em amostras com interferentes cutâneos e na presença de excipientes utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas.

REFERÊNCIAS

AFZALI, Bahare Malek et al. Comparison of the efficacy of 5% topical spironolactone gel and placebo in the treatment of mild and moderate acne vulgaris: A randomized controlled trial. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 23, n. 1, p. 21–25, 2012.

ALVES, N.C. Penetração de Ativos na Pele: Revisão Bibliográfica. *Amazônia Science & Health*, v. 3, n. 4, p. 36–43, 10 dez. 2015.

ANDERSON, J.F.F. et al. Development and validation of an isocratic HPLC method for simultaneous determination of quaternary mixtures of antihypertensive drugs in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*, v. 29, n. 1, p. 95–110, 2017.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

CHARNY, J. W.; CHOI, J. K.; JAMES, W. D. Spironolactone for the treatment of acne in women, a retrospective study of 110 patients. *International Journal of Women's Dermatology*, v. 3, n. 2, p. 111–115, 2017.

CORVOL, Pierre et al. Antiandrogenic effect of spiro lactones: mechanism of action. *Endocrinology*, v. 97, n. 1, p. 52–58, 1975.

DAVIES, D.L.; WILSON, G.M. Diuretics. *Drugs*, v. 9, n. 3, p. 178–226, 1975.

DESHPANDE, P. B. et al. A simple and sensitive RP-HPLC method for simultaneous estimation of torsemide and spironolactone in combined tablet dosage form. *Acta Chromatographica*, v. 24, n. 1, p. 15–22, 2012.

FAURE, Michel. [Acne and hormones]. *La Revue du praticien*, v. 52, n. 8, p. 850–3, 15 abr. 2002.

FDA. 2015. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry.

Goodfellow, A. et al. Oral spironolactone improves acne vulgaris and reduces sebum excretion. *British Journal of Dermatology*, v. 111, n. 2, p. 209–214, 1984.

GUHAGARKAR, Swati A.; MALSHE, Vinod C.; DEVARAJAN, Padma V. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, n. 3, p. 935, 24 set. 2009.

HAMDAN, Hozyfa A; MOHAMMED, Ahmed E. Development and Validation of Ultra Violet Spectrophotometric Assay Method of Spironolactone by Hydrazine Derivatization. v. 7, n. 2271, p. 136–139, 2017.

ICH, 2005. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [S.l: s.n.], 2006.

LAXMAN, R et al. Development and Validation of Rp-Hplc and Ultraviolet Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Spironolactone and Torsemide in Pharmaceutical Dosage Form. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, v. 1, n. 2, p. 459–467, 2010.

LAYTON, Alison M. et al. Oral Spironolactone for Acne Vulgaris in Adult Females: A Hybrid Systematic Review. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 18, n. 2, p. 169–191, 2017.

LUPPI, B. et al. Polymeric nanoparticles composed of fatty acids and polyvinylalcohol for topical application of sunscreens. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, n. 3, p. 407–411, mar. 2004.

MUHLEMANN, M. F. et al. Oral spironolactone: an effective treatment for acne vulgaris in women. *British Journal of Dermatology*, v. 115, n. 2, p. 227–232, 1986.

NIRDÉ, P et al. Antimineralocorticoid 11beta-substituted spiro lactones exhibit androgen receptor agonistic activity: a structure function study. *Molecular pharmacology*, v. 59, n. 5, p. 1307–13, maio 2001.

PEREIRA, Maira N. et al. Development and validation of a simple chromatographic method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and rifampicin in skin permeation studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 159, p. 331–340, 2018.

PITT, Bertram et al. Spironolactone for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 15, p. 1383–1392, 10 abr. 2014.

RAM, Vijay R.; DAVE, Pragnesh N.; JOSHI, Hitendra S. Development and validation of a stability-indicating HPLC assay method for simultaneous determination of spironolactone and furosemide in tablet formulation. *Journal of Chromatographic Science*, v. 50, n. 8, p. 721–726, 2012.

SANDALL, J. M. et al. Development and validation of an HPLC method for the determination of spironolactone and its metabolites in paediatric plasma samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 839, n. 1–2, p. 36–44, 2006.

SAYYED, Z M et al. Development and Validation of UV- Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Spironolactone and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Formulation. *J Pharm Sci Bioscientific Res.*, v. 5, n. 2271, p. 590–593, 2015.

SERNA-JIMÉNEZ, C. E. et al. HPLC-UV analytical method for determination of pizotifen after in vitro transdermal diffusion studies. *Biomedical Chromatography*, v. 26, n. 6, p. 769–774, 2012.

TEICHMANN, A. et al. Differential Stripping: Determination of the Amount of Topically Applied Substances Penetrated into the Hair Follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005.

USP. USP Monographs: Spironolactone.

WALASH, M. I. et al. Simultaneous determination of metolazone and spironolactone in raw materials, combined tablets and human urine by high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, v. 5, n. 20, p. 5644–5656, 2013.

YAMAMOTO, Ayako; ITO, Masaaki. Topical spironolactone reduces sebum secretion rates in young adults. *Journal of Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 243–246, 1996.