

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO ESPECTOFOTOMÉTRICA DO FOTOSSENSIBILIZADOR PROTOPORFIRINA IX E SEUS DERIVADOS

Michelly de Sá Matsuoka (PIC/UEM), Marcos Luciano Bruschi (Coorientador),
Jéssica Bassi da Silva (Orientador). E-mail: jbsilva5@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia/ Análise e Controle de Medicamentos.

Palavras-chave: validação; espectrofotometria UV-Vis; protoporfirina IX.

RESUMO

Em busca de tratamentos oncológicos e não oncológicos eficazes e com menos efeitos adversos, o campo da terapia fotodinâmica (TFD) vem se expandindo. Conseqüentemente, também o estudo dos fotossensibilizadores (FS). Dentre os FS a protoporfirina IX (Pp IX) é um derivado das porfirinas muito estudado devido seu efeito conhecido na clínica médica com a utilização do pró-fármaco ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) precursor da Pp IX com atividade antineoplásica. Em busca de utilizar a Pp IX diretamente na TFD, formulações farmacêuticas estão sendo desenvolvidas para preservar suas propriedades fotossensíveis. Assim, para a identificação e quantificação correta desse FS em formulações farmacêuticas, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de um método analítico. O presente trabalho desenvolveu e validou um método analítico utilizando espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) no comprimento de onda (λ) de 400 nm, atendendo aos parâmetros: exatidão, precisão repetibilidade, limite de quantificação, limite de detecção, linearidade e intervalo.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento que consiste na utilização de um corante fotoativo denominado de fotossensibilizador (FS). Este, em determinado comprimento de onda e na presença de oxigênio molecular, gera reações fotofísicas e fotoquímicas capazes de degradar seletivamente o tecido não sadio, além de destruir microrganismos. Devido essas propriedades, a TFD vem sendo cada vez mais estudada e aplicada no tratamento de doenças de natureza oncológica e infecciosa (LEITE *et al.*, 2023).

Nesse sentido, os FS podem ser classificados, de acordo com sua estrutura química, em derivados da porfirina, derivado da clorofila e outros corantes. Dentre os derivados da porfirina, encontra-se a protoporfirina IX (Pp IX), uma molécula lipofílica com tendência a formar agregados em ambiente fisiológico, o que diminui sua atividade fotossensível. Devido a este problema, atualmente utiliza-se na TFD seu precursor, o pró-fármaco ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), que depende, portanto, da biossíntese do grupo heme para produção do composto ativo (LEITE *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas que preservem o FS na sua forma monomérica e dispersa é essencial para sucesso terapêutico. Além disso, para a identificação e quantificação de princípios ativos, como FS, em formulações farmacêuticas, deve-se ter um método analítico desenvolvido e validado.

Particularmente, no caso de substâncias corantes, pode-se utilizar a espectrofotometria na região de ultravioleta-visível (UV-Vis) com finalidade quantitativa, correlacionando concentração do PS e absorvância (BORBA *et al.*, 2013).

O método analítico desenvolvido para identificação e quantificação de uma substância deve ser validado para garantir que o método é adequado e que os resultados obtidos por ele são verídicos (AL FIQRI *et al.*, 2021). A validação de um método analítico é realizada conforme os parâmetros estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada nº166, de 24 de julho de 2017 (RDC 166/2017) e recomendações da *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005).

Os parâmetros estabelecidos na RDC 166/2017 para validação de métodos analíticos desenvolvidos para identificação e quantificação são: (1) linearidade para avaliar a capacidade de obter respostas diretamente proporcionais a concentração de analito; (2) seletividade para demonstrar a capacidade de identificar ou quantificar o analito na presença de outros compostos; (3) precisão de repetibilidade para avaliar a proximidade dos resultados em condições iguais de operador, instrumento e corrida; (4) precisão intermediária, para avaliar as condições de proximidade dos resultados em condições diferentes de operador e corrida; (5) exatidão, para avaliar o grau de concordância dos resultados obtidos com os resultados teóricos; (6) limite de detecção, para demonstrar o menor valor que o método é capaz de detectar; (7) limite de quantificação, para demonstrar o menor valor que o método é capaz de quantificar e (8) faixa de trabalho estabelecida a partir da linearidade, precisão e exatidão e aplicação do método (BRASIL, 2017).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram preparadas soluções mães independentes, com concentração 100 µg/mL, pesando 0,001 g de Pp IX em balança analítica, que foi transferida para balões volumétricos de 10 mL com álcool 77% (V/V). O solvente álcool 77% (V/V) foi preparado com antecedência de, pelo menos 24 h, a partir do álcool absoluto e água destilada. O mesmo diluente das soluções mães foi utilizado para preparar as soluções diluídas com concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 µg/mL. Após a preparação, as soluções diluídas foram lidas no espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 no comprimento de onda de (λ) 400 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação dos parâmetros a serem considerados segundo RDC 166/2017, foi realizada a análise estatística, utilizando o software Microsoft Office Excel. Assim, os valores de absorvância (Abs) foram obtidos de leituras das soluções com concentração de 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 µg/mL, em comprimento de onda (λ) de 400 nm, determinado a partir de dados reportados na literatura e da varredura.

Todas as análises estatísticas foram realizadas em triplicata, considerando coeficiente de variação (CV) aceitável inferior a 5%. A partir de cinco concentrações (0,25 a 7 µg/mL) das soluções-mãe diluídas foi realizada a regressão linear e análise de dados da regressão, obtendo-se os valores para os parâmetros da linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

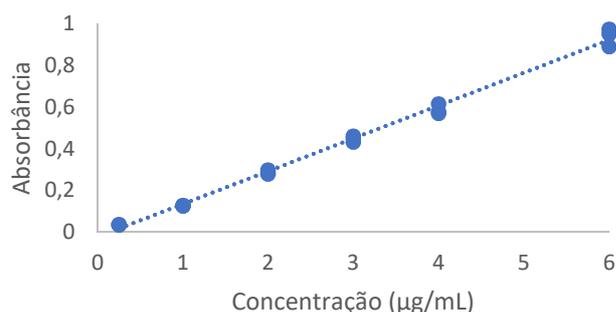


Figura 1 - Curva de análise de Pp IX obtida por espectrofotometria em 400 nm (n = 3).

Para linearidade (figura 1) obteve-se, pela análise de regressão, a equação da reta $y = 0,1573x - 0,023$, coeficiente de correlação (R) de 0,9970 e coeficiente de determinação (R^2) de 0,9950. Este resultado indica que existe uma correlação linear nos intervalos de concentração avaliados. A partir dos dados da regressão, obtiveram-se os resultados da análise de resíduo (Figura 2) e falta de ajuste do método. Ambas as análises foram realizadas pelo teste exato de Fischer, apresentando um nível de confiança de 95%. Para análise do resíduo, o valor de F é calculado pela razão da média quadrática da regressão (MQreg) pela média quadrática do resíduo (MQres) e, posteriormente comparado com o valor do $F_{crítico}$. O valor obtido para o $F_{calculado}$ foi de 2930,428, sendo $F_{crítico}$ 4,494. Assim, como o $F_{calculado}$ foi maior que o F tabelado, considera-se a regressão altamente significativa. Já para a análise da falta de ajuste da curva, o valor de $F_{calculado}$ pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQfaj) pela média quadrática do erro puro (MQep). Quando comparado com o valor de $F_{crítico}$ de 3,259; o $F_{calculado}$ de 1,809 foi menor, podendo confirmar que o método demonstrou ser ajustado.

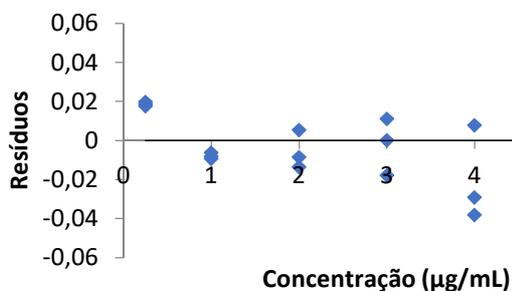


Figura 2 - Gráfico de distribuição do quadrado do resíduo da regressão das concentrações de Pp IX em µg/mL em função da absorvância em 400 nm.

A partir da linearidade foi estabelecida a faixa de trabalho de 0,25, 1, 2, 3, 4 e 6 µg/mL. A sensibilidade do método foi caracterizada por um LD de 0,2023 µg/mL e o LQ de 0,6129 µg/mL.

Para os parâmetros da precisão de repetibilidade as leituras foram realizadas em um único dia, por um único analista, conforme determina a RDC 166/2017, com coeficiente de variação menor que 5%, para concentração baixa (0,25 µg/mL), média (2 µg/mL) e alta de (6 µg/mL).

Para a exatidão, também se utilizou também três concentrações: baixa (1 µg/mL), média (4 µg/mL) e alta de (6 µg/mL), com CV inferior a 5% entre as replicatas. A exatidão foi calculada pela diferença entre o valor da concentração média encontrada e o valor verdadeiro das soluções de Pp IX. Assim, houve uma

recuperação média de $97,22 \pm 0,469\%$, nas concentrações analisadas, estando dentro dos limites estabelecidos 95-105% (ICHA, 2005; RDC 166/2017). Portanto, foi considerado exato.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido utilizando como solvente álcool 77% (V/V) em espectrofotômetro UV-Vis, comprimento de onda (λ) de 400 nm, estão de acordo com o determinado pela resolução e pelas recomendações ICH. Contudo, os parâmetros de seletividade, robustez e precisão inter analista ainda precisam ser estudados para conclusão da validação do método desenvolvido.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq, Finep, ao Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá (LATOX-UEM), que cedeu a protoporfirina IX para estudo, e ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármaco (LABSLiF) que permitiu o desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

AL FIQRI, M. *et al.* Validation of spectrophotometric method for quantification of cefazoline in simulated tear fluid and porcine ocular tissue from thermosensitive-mucoadhesive in situ ocular gel preparation. **Chemical Data Collections**, v. 36, p. 100793, dec. 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405830021001476?casa_token=sT8CISrKPQoAAAAA:ccB8Mak97N9jxtxI0Zbj2EFS2ABu_-ZFU1r_WoZ0IY9xMH35I0LsVQ5wW_Hj81f0sIEb3I7EdF8. Acesso em: 25 ago. 2023.

BORBA, P. A. A. *et al.* Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Química Nova**, v. 36, n.4, p. 582-586, maio. 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/7KzNXNtSfPsRwtL8PbWjvmr/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 25 ago. 2023.

BRASIL. Resolução nº166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a avaliação de métodos analíticos e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Brasília, n.141, 25 jul.2017.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: **Text on validation of analytical procedures Q2(R1)**, 2005.

LEITE, P. A. D. S. M.; MIGUEL, N. C. D. O.; PIERRE, M. B. R. Microemulsions Improve Topical Protoporphyrin IX (PpIX) Delivery for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, p. e21920, maio. 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/3NRq865JP9Hb8rMJVkJTyG5v/?lang=en>. Acesso em: 27 ago. 2023.