

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO ALCLPC

Antonio Lucas Lima Da Silva¹

Alice Vitória Frota Reis²

Karina Alexandre Barros Nogueira³

Raquel Petrilli Eloy⁴

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) tem se mostrado como uma proposta alternativa e promissora para o tratamento do carcinoma celular escamoso (SCC), dentre eles o de pele devido à eficácia, baixa toxicidade, dispensando o uso de cirurgia e radioterapia, além de conferir cicatrização adequada. É feita a administração de um fármaco fotossensibilizante (FS) que é uma molécula não tóxica ao paciente que possua a lesão, como por exemplo, um tumor, para posterior iluminação com luz visível em comprimento de onda adequado gerando, na presença de oxigênio presente no meio, a produção de espécies citotóxicas que induzem a morte celular e destruição do tecido tumoral. Dentre os fármacos fotossensibilizantes, a cloroalúminio ftalocianina (ALCLPC) tem aplicação promissora devido ao baixo custo, ao alto rendimento quântico de produção de oxigênio singleto, alta fluorescência que propicia capacidade teranóstica, boa absorção na região do vermelho, além de possibilidade de aplicação tanto *in vitro* como *in vivo*. A administração tópica destes sistemas pode melhorar a eficácia clínica e reduzir seus efeitos colaterais, principalmente as reações de fotossensibilidade, porém são necessários métodos físicos capazes de aumentar a penetração cutânea destes fármacos. Contudo, sua veiculação como fármaco livre é prejudicada pela agregação e baixa solubilidade aquosa. Neste projeto, portanto, o objetivo é validar um método analítico para quantificação de ALCLPC. Mais especificamente, devido à pandemia do COVID-19 foram realizadas atividades de pesquisa bibliográfica, preparo de protocolos e preparo da curva analítica contendo ALCLPC.

Palavras-chave: Lipossomas; Método analítico; ALCLPC.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Discente, lucas.lima@aluno.unilab.edu.br¹

Universidade Federal do Ceará (UFC), Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE), Discente, avfr_frota@hotmail.com²

Universidade Federal do Ceará (UFC), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PGEQ), Discente, karinanog@yahoo.com.br³

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Docente, petrilliraquel@unilab.edu.br⁴

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês photodynamic therapy) tem progredido nas últimas décadas como uma nova modalidade de tratamento clínico de várias patologias cutâneas. A PDT consiste na administração de um fármaco fotossensibilizante (FS) não tóxico, seja pela via sistêmica, local ou tópica, a um paciente que possua uma lesão, por exemplo, um tumor, seguido da iluminação com luz visível em comprimento de onda adequado. A presença de oxigênio concomitante a exposição à luz visível de comprimento de onda adequado, leva a geração de espécies citotóxicas e consequentemente a morte celular e destruição tecidual, por processos de apoptose ou necrose (Petrilli et al., 2013; Praca, Medina, Petrilli, & Bentley, 2012).

Sabe-se que os tecidos biológicos são capazes de absorver eficientemente a luz do espectro na região do vermelho (acima de 630 nm), sendo assim a maioria dos FS tem uma banda de alta absorção nesta região. Quanto mais longo for o comprimento de onda de ativação do FS, maior a penetração da luz no tecido e melhor o efeito terapêutico até o limite superior de 800 nm, quando passamos para a faixa de absorção do infra-vermelho. Por exemplo, a profundidade atingida na qual a radiação é reduzida a cerca de 40% é conhecida como profundidade de penetração efetiva da luz. A profundidade de penetração efetiva da luz para tecidos moles em $\lambda=630$ nm é de 1-2 mm e aumenta duas vezes em $\lambda=700-850$ nm. O efeito terapêutico da PDT, por sua vez, atinge de 3-5 vezes a profundidade de penetração efetiva da luz. Desta forma, o uso de FS que absorvem em comprimentos de onda mais longos na região do vermelho é interessante para o aumento da eficácia do tratamento com PDT em tumores sólidos (Nyman & Hynninen, 2004).

Os FS de segunda-geração, tais como as porfirinas, ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas, são capazes de absorver luz em comprimentos de onda mais longos e apresentam banda de alta absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético, de forma a contornar problemas gerados com a administração de FS de primeira-geração (Nyman & Hynninen, 2004). A cloro-alumínio ftalocianina (AlClPc) é um macrociclo tetrapirrólico com um átomo de alumínio central, que possui além das características favoráveis ao processo de fotossensibilização, tais como alto rendimento quântico de oxigênio singleto, elevada fluorescência com capacidade teranóstica e baixo custo, possui também alta absorção em comprimentos de onda maiores que 650 nm (absorção máxima= 672 nm em etanol). Moléculas como a AlClPc, no entanto, são altamente hidrofóbicas, o que impede a administração destas diretamente devido à tendência a agregação em meio aquoso que reduz a eficácia fotodinâmica (JAYME et al., 2016).

O objetivo central deste trabalho se apresenta como a validação de um método analítico para quantificação de AlClPc.

METODOLOGIA

Primeiramente, foi desenvolvido um protocolo para preparo de curva padrão da AlClPc, a partir da solução estoque preparada com a diluição da AlClPc em DMSO. O método foi determinado utilizando concentrações distintas na faixa de 0,2 a 2 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata, logo após as diluições calculadas previamente realizou-se a leitura no espectrofotômetro. As amostras foram avaliadas em modo fotométrico, utilizando-se espectrofotômetro em comprimento de onda de 674 nm. Foram avaliados a linearidade, precisão, exatidão, limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) conforme recomendações da RDC 166/2017 da ANVISA.

A partir da solução estoque, foi pipetado uma alíquota de 1000 μL utilizando micropipeta de 100 a 1000 microlitros e foi transferida para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com DMSO. A solução foi homogeneizada no agitador de tubos por 1 minuto e transferida para tubo falcon de 15 mL. Obteve-se

então uma solução intermediária na concentração de 100 microgramas/mL. Então, foram pipetados os volumes necessários para a obtenção das concentrações de AIClPc utilizada na curva em triplicata, utilizando DMSO como solvente e balão volumétrico de 5 mL, seguindo os seguintes pontos: 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 microgramas/mL, em triplicata.

O limite de detecção foi calculado com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco, fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. O limite de quantificação é a menor quantidade ou concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão. O limite de quantificação foi calculado com base na obtenção de três curvas analíticas do fármaco, fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Para se obter a precisão da curva, foram lidas as concentrações definidas em triplicata, se obtendo desvio padrão da concentração real. Essas leituras foram realizadas tanto no mesmo dia como em dias diferentes, empregando diferentes analistas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas curvas analíticas foram preparadas para as leituras em dois dias distintos contendo seis concentrações fixas (0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 microgramas/mL). O método se mostrou consistente com a lei de Lambert-Beer, a curva inter ensaio obtida apresentou linearidade com o ajuste $R^2 = 0,9991$, demonstrando linearidade adequada e a equação da reta: $y = 0,311x + 0,00089$ na faixa de concentração estudada. Os limites dos parâmetros de detecção e quantificação obtidos por espectrofotometria foram 0,10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 0,31 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. O método empregado pelo aluno mostrou-se de acordo à literatura Siqueira Moura (2010).

CONCLUSÕES

Diante os dados coletados, pode-se verificar que o método de quantificação por espectrofotometria é considerado exato e preciso com valores adequados para quantificar a AIClPc em DMSO. O método usando espectrofotômetro obteve resultados positivos para o trabalho realizado pelo aluno, apesar dos dados de encapsulação não serem adequados. Ademais, com esse trabalho o aluno conseguiu participar de eventos de pesquisas, na formulação de resumos que foram publicados, em apresentações de seminários realizadas pelo próprio aluno e conseguiu com as atividades laboratoriais e compreender algumas técnicas laboratoriais fundamentais para pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de microbiologia da UNILAB por permitir a utilização de equipamentos. Este trabalho faz parte do projeto PROPPG 04/2020 PIBIC UNILAB/CNPq, Título: PVS1137 Desenvolvimento e avaliação de lipossomas para o tratamento tópico de carcinoma celular escamoso utilizando terapia fotodinâmica do qual o aluno Antônio Lucas foi bolsista.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n°166, de 24 de julho de 2017-

“Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências”. Disponível em <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>

HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat*, v. 4, n. 3, p. 283–293, 2005.

JAYME, Cristiano Ceron; CALORI, Italo Rodrigo; TEDESCO, Antonio Claudio. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, [s. l.], v. 153, p. 178–183, 2016.

NYMAN, E. S.; HYNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 73, n. 1–2, p. 1–28, 2004.

MIMIKOS, C.; SHAFIRSTEIN, G.; ARSHAD, H. Current state and future of photodynamic therapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, v. 2, n. 2, p. 126–129, 2016.

PETRILLI, R.; PRACA, F.; CAROLLO, A. R.; MEDINA, W.; OLIVEIRA, K. T.; FANTINI, M.; NEVES, M. da G.; CAVALEIRO, J.; SERRA, O.; IAMAMOTO, Y.; BENTLEY, M. V. Nanoparticles of Lyotropic Liquid Crystals: A Novel Strategy for the Topical Delivery of a Chlorin Derivative for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. *Current Nanoscience*, v. 9, n. 4, p. 434–441, 2013.

PRACA, F. S. ; MEDINA, W. S. G.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M. V. L. . Liquid Crystal Nanodispersions Enable the Cutaneous Delivery of Photosensitizer for Topical PDT:

Fluorescence Microscopy Study of Skin Penetration. *Current Nanoscience*, v. 8, n. November 2015, p. 535–540, 2012.