

PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO ÁCIDO URSÓLICO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Erika Crispim RESENDE, Eliana Martins LIMA

Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos – FarmaTec – Faculdade de Farmácia – UFG; eliana.ufg@gmail.com, crispimerika@gmail.com

Palavras-chave: CLAE, Validação, ácido ursólico, lipossomas.

INTRODUÇÃO

Compostos triterpênicos que estão largamente distribuídos no reino vegetal têm recebido grande atenção nos últimos anos (OVESNÁ *et al.*, 2004). O ácido ursólico (AU) é um composto triterpenóide pentacíclico que ocorre em grande variedade de alimentos (AGGARWAL e SHICHODIA, 2006). Vários estudos publicados têm explorado os efeitos farmacológicos do AU em modelos humanos, animais e células. Muitos pesquisadores relataram que o AU inibe a proliferação de várias linhagens de células cancerígenas humanas, incluindo mama, leucemia, próstata, fígado, cólon, pulmão, endométrio gástrico, pele e melanona em células cancerígenas B16 em rato (LIU, 1995; ES-SAADY *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1992; LI *et al.*, 2002; HSU *et al.*, 2004; OVESNÁ e SLAMENOVA, 2006; KASSI *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi preparação lipossomas contendo AU e validar, através da especificidade, seletividade, limites de Quantificação e Detecção (LQ, LD), linearidade, precisão e robustez do método analítico para a determinação de AU encapsulado em lipossomas.

METODOLOGIA

Substâncias de referência e reagentes: Metanol HPLC (J.T.Baker[®]). Fosfatidilcolina de soja (Avanti Polar Lipids[®]); Tris (hidroximetilaminometano) (Synth[®]); clorofórmio PA (Synth[®]). A água foi purificada pelo uso prévio do sistema Millipore[®] e Ácido ursólico 90% (Sigma[®]).

Sistema Cromatográfico: Um sistema de HPLC Varian[®] equipado com bomba quaternária (ProStar-240), injetor automático (ProStar-410) e detector de arranjo de diodos (DAD) (ProStar-335) foi utilizado. Software Galaxie[®] versão 1.9 foi usado para aquisição de dados. O método cromatográfico foi realizado utilizando uma coluna Pursuit Varian[®] RP-18, (10mm × 2.0mm id, 5 µm) mantida a 35±1°C. Detector de arranjo de diodo foi mantido em 210nm e 20µL de volume de injeção. A fase móvel composta de metanol-água acidificada, (90:10, v/v) pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico 10%. Vazão de fluxo isocrático de 1,0mL/min. As soluções de calibração do padrão foram preparadas em oito níveis diferentes: 10 a 300µg/mL.

Validação do método: O método foi validado de acordo com os códigos oficiais (ICH: “International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use”- 1996, USP XXX, FDA e ANVISA RE n° 899), avaliando-se os seguintes parâmetros: E especificidade e Seletividade, Linearidade, Precisão, Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e robustez.

Preparação e caracterização dos lipossomas: Os lipossomas foram preparados através de hidratação do filme lipídico utilizando-se fosfatidilcolina de soja e diferentes concentrações do ativo. A hidratação ocorreu em um período de 40 minutos em banho ultrassônico (Unique[®], USC1400) tendo feito agitação em vórtex (Phoenyx AP56) neste intervalo para facilitar o desprendimento do filme. A diminuição do tamanho foi realizada através de duas técnicas: a extrusão (Extrusor Lipex[®]) e a sonicação (Processador ultrassônico Misonix[®] XL2020). A determinação do tamanho das vesículas e o índice de polidispersão foram realizados empregando-se a técnica de espalhamento de luz em equipamento ZetaSizer (Malvern Instruments[®], UK). Uma alíquota da amostra foi diluída para realização das leituras de potencial zeta no equipamento (Zeta Plus- Zeta Potential Analyzer-Brookhaven[®]). O pH de cada formulação foi determinado em amostra sem diluição prévia utilizando pHmetro digital (PG1800 –Gehaka[®]).

Perfil de formação dos lipossomas, separação do fármaco livre e eficiência de encapsulação: O perfil de formação dos lipossomas foi avaliado através da leitura do diâmetro das vesículas em relação ao tempo de sonicação e à quantidade de extrusões. A separação do fármaco livre foi realizada por centrifugação da amostra

(centrífuga Sigma[®], 3-18 K) 5000rpm por 15 minutos. A determinação da eficiência de encapsulação foi feita através de rompimento de lipossomas com a adição de metanol. A quantidade de fármaco presente nesta fração foi determinada através de HPLC utilizando-se o método validado conforme descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método analítico: Os cromatogramas apresentaram tempo de retenção de 3,5 minutos para AU. A fosfatidilcolina presente nos lipossomas bem como os diluentes utilizados para solubilização do ativo apresentaram tempo de retenção diferente do AU o que demonstra seletividade e especificidade do método cromatográfico. As curvas de calibração para o ensaio foram construídas plotando-se as áreas dos picos versus a concentração mostrando linearidade na faixa de 10 a 300µg/mL. As equações obtidas foram: $Y=23,415x+36,852$ ($r=0,999$); $Y=23,401x+62,056$ ($r=0,998$); $Y=23,095x+88,073$ ($r=0,999$). Os coeficientes de correlação apresentaram valores acima de 0,99, indicando correlação altamente significativa entre as concentrações e áreas de picos.

Os resultados da área para a precisão intermediária de dois dias de análise mostrou DPR abaixo de 5% para o intervalo de concentração apresentados. O DPR da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias) variou entre 0,54 a 2,27%.

Limites de detecção e quantificação (LD e LQ) foram calculados a partir da inclinação e desvio padrão da resposta do intercepto da média de três curvas de calibração, determinada por um modelo de regressão linear, conforme definido pelo ICH. O LD foi 0,97µg/mL e o LQ foi de 3,23µg/mL.

Os testes de robustez foram realizados variando-se valores de pH de fase móvel (pH 2,7-3,3); temperatura da coluna (30 a 40°C) e taxa de fluxo da fase móvel (0,25 a 0,35mL/min). Foi provado que as pequenas variações de alguns parâmetros experimentais não apresentaram efeitos sobre o comportamento cromatográfico dos ativos avaliados neste trabalho.

Preparação e caracterização dos lipossomas: O método de extrusão foi considerado mais demorado para a realização quando comparado com o método de sonicação. Através de ambos os métodos, lipossomas resultantes apresentaram tamanhos médios menores que 200nm e Pdl menor que 0,4 (considerando-se a

última extrusão e tempo final de sonicação) Os potenciais zeta de todas as formulações foram negativos variando de: -11,57 a - 49,17. Isto significa que quanto mais alto o valor em módulo menor será a possibilidade de agregação das partículas o que garante maior estabilidade das formulações. Os lipossomas hidratados com água apresentaram pH ácido (pH entre 4,96 e 5,86) devido à característica do próprio ativo, além de menor estabilidade quando comparado com as formulações hidratadas com tampão tris (pH 7,4).

Perfil de formação dos lipossomas, separação do fármaco livre e eficiência de encapsulação: Os lipossomas preparados por extrusão atingiram tamanho menor que 200nm após terem sido feitas 3 extrusões (Tabela 1), sendo as duas primeiras em membrana de policarbonato com porosidade de 600nm e a última extrusão com membrana de 200nm. Já em relação à sonicação, 15 minutos foram suficientes para obtenção de lipossomas com tamanho médio próximo à 200nm. Verificou-se que mesmo aumentando a concentração de fármaco nas formulações, os valores máximos de encapsulação ficaram entre 30 a 46ug por mL de formulação.

Tabela 1: Relação do diâmetro médio das partículas e Pdl após extrusões das formulações.

Formulações	Diâmetro médio das partículas (nm)			Pdl médio das partículas		
	1ª extrusão	2ª extrusão	3ª extrusão	1ª extrusão	2ª extrusão	3ª extrusão
F1	323,55	209,10	193,00	0,5635	0,4285	0,3575
F2	202,35	211,75	111,00	0,4500	0,4525	0,2020
F3	344,40	229,45	122,05	0,4725	0,3740	0,1715
F4	403,60	134,05	112,00	0,5295	0,2445	0,2125
F5	381,55	136,40	117,20	0,4900	0,2855	0,2595
F6	157,70	122,50	105,35	0,4165	0,3065	0,1985
F7	400,95	131,20	122,40	0,5140	0,3010	0,3010
F8	345,30	117,35	110,95	0,6740	0,2650	0,2415

CONCLUSÕES

Os métodos de HPLC para a determinação de AU mostrou ser específico, preciso e exato. Usando este método analítico simples foi possível realizar a análise quantitativa do AU encapsulado em lipossomas dentro de um tempo de análise inferior a 8 minutos. Os lipossomas contendo ácido ursólico apresentaram-se como vesículas de pequeno diâmetro e baixa polidispersibilidade podendo ter aplicações futuras em estudos de atividade farmacológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, *Biochem. Pharmacol.*, v.14, p. 1397–1421, 2006.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Publica o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DOU de 02/06/2003.

ES-SAADY, D.; SIMON, A.; OLLIER, M.; MAURIZIS, J. C.; CHULIA, A. J.; DELAGE, C. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. *Cancer Lett.*, v.10, p. 193–197, 1996.

European Pharmacopoeia 5.0, vol. 2, 5th edition, Council of Europe, Stranbourg, 2005.

FDA, "Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation; Availability," *Federal Register (Notices)* 65(169), 52776–52777, 2000.

HSU, Y. L.; KUO, P. L.; LIN, C. C. Proliferative inhibition, cellcycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci.*, v. 75, p. 2303–2316, 2004.

ICH - International Conference on Harmonization, "Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures," *Federal Register* 60(40), 11260–11262, 1995.

ICH - International Conference on Harmonization, "Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology; Availability," *Federal Register* 62(96), 27463–27467, 1997.

ISO/IEC, International Standart Organization; General Requeriments for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

KASSI, E.; PAPOUTSI, Z.; PRATSINIS, H.; ALIGIANNIS, N.; MANOUSSAKIS, M.; MOUTSATSOU, P. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, v. 133, p. 493–500, 2007.

LI, G. X. Pharmaceutical and Clinic Study of Traditional Chinese Medicine. Tianjin Technology Translate Press, Tianjin, China, 1992.

LI, J.; GUO, W. J.; YANG, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J. Gastroenterol.*, v. 8, p.93–495, 2002.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.*, v. 49 p. 57-68, 1995.

OVESNÁ, Z.; SLAMENOVA, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat. Res*, p. 131–137, 2006.

OVESNÁ, Z.; VACHÁLKOVÁ, A.; HORVATHOVÁ, K.; TOTHOVÁ, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds, Minireview, *Neoplasma*, v. 51, p. 327–334, 2004.

US-FDA, United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Bionalytical Method Validation, 2001.

USP, United States Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 30, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 2007.