

ANÁLISE DE TRANSPORTADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO CONTENDO VITAMINA E ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS¹

ANALYSIS OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIER CONTAINING VITAMIN E BY SPECTROPHOTOMETRY UV/VIS

**Carla Maria Uggeri Negretto², Sabrina Ziegler³, Cristiane Machado Cezar³,
Renata Platcheck Raffin⁴ e Patrícia Gomes^{4,5}**

RESUMO

A vitamina E vem sendo exaustivamente estudada devido às suas propriedades antioxidantes e ação antienvhecimento. O uso de transportadores lipídicos nanoestruturados tem sido pesquisado a fim de reduzir a sensibilidade da vitamina E frente à luz, calor e oxigênio. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método por espectrofotometria UV/VIS para determinação de vitamina E em transportador lipídico nanoestruturado (NVITE). A validação do método foi realizada através de estudos de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, robustez, precisão e exatidão usando etanol para determinação a 285nm. O método apresentou linearidade ($r= 0,9999$) e precisão (DPR= 1,66%, reprodutibilidade interna e DPR= 1,55%, repetibilidade). A exatidão foi de 99,46%. A robustez indicou que o grau do solvente não interfere na análise, porém o uso do filtro de membrana foi fator necessário para realização do método. Desta forma, pode-se concluir que o método desenvolvido e validado foi específico, linear, preciso, exato e robusto para a determinação de NVITE.

Palavras-chave: antienvhecimento, nanoestruturas, validação, α -tocoferol.

ABSTRACT

Vitamin E has been extensively studied due to its antioxidants and anti-aging actives. The usage of nanostructured lipid carriers has been studied in order to reduce the sensitivity of vitamin E against light, heat and oxygen. The aim of this study is to develop and validate a method with spectrophotometry UV/VIS to determine vitamin E in nanostructured lipid carrier (NVITE). The method validation was performed through studies of specificity, linearity, limit of detection and quantification, robustness, precision and accuracy using ethanol for determination at 285 nm. The method showed linearity ($r= 0.9999$) and precision (RSD= 1.66%, internal reproducibility and RSD= 1.55%, repeatability). Accuracy was of 99.46%. Robustness indicated that the level of solvent did not interfere with the analysis, but using the membrane filter was a factor required for carrying out the method. Thus it can be concluded that the developed and validated method was specific, linear, precise, accurate and robust for the determination of NVITE.

Keywords: anti-aging, nanostructures, validation, α -tocopherol.

¹ Trabalho resultante da Dissertação de Mestrado - Centro Universitário Franciscano.

² Aluna do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. Professora do Curso Superior de Tecnologia em Estética e Cosmética - ULBRA.

³ Acadêmicas do Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano.

⁴ Docentes do Programa de Pós-graduação em Nanociências e do Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: patriciagomes0@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O termo “vitamina E” (VITE) é utilizado para designar oito compostos diferentes, nomeados β -, α -, γ - e δ - (beta, alfa, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis. O α - tocoferol é um dos muitos antioxidantes lipossolúveis naturais amplamente utilizados na suplementação de vitaminas, alimentação, indústria cosmética e farmacêutica, além de ser considerado o mais potente (Figura 1) (KHAYATA et al., 2012).

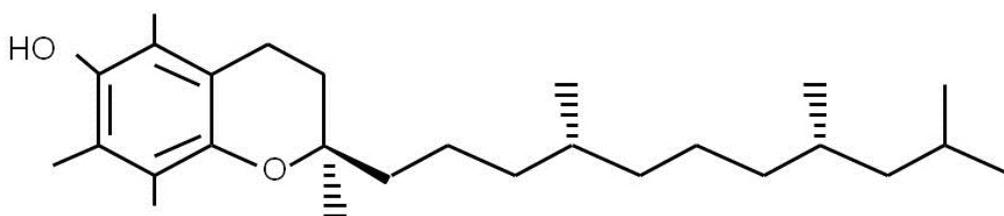


Figura 1 - Estrutura química da vitamina E (α -tocoferol).

A VITE tem-se destacado em formulações usadas nos cuidados com a pele, pois, além de ser um potente neutralizador dos radicais livres (RL), apresenta grande capacidade umectante aliando-se assim no combate ao envelhecimento cutâneo (LEONARDI; GASPARI; CAMPOS, 2002).

Grande parte dos antioxidantes, incluindo a VITE, são insolúveis ou com baixa solubilidade em água. Isto tem feito de seu uso um problema nas formulações de alimentos e em formas farmacêuticas clássicas (KHAYATA et al., 2012).

Segundo Khayata et al. (2012), a incorporação da VITE a uma nanoestrutura representa um promissor sistema de liberação controlada. Dentre suas vantagens estão: baixo conteúdo polimérico, alta capacidade de carga para fármacos lipofílicos e capacidade de confinar o fármaco dentro de uma cavidade central, evitando o efeito de rebentamento. O fármaco não está em contato direto com os tecidos e, portanto, a irritação no local da administração será reduzida, podendo também ser melhor protegido contra a degradação durante o armazenamento e ambos após a administração.

Esta propriedade é de alto interesse para o encapsulamento da VITE por sua elevada sensibilidade à luz, calor e oxigênio. Diferentes sistemas de entrega de α -tocoferol têm sido estudados como potenciais meios de superar estes problemas, dentre eles estão os transportadores lipídicos nanoestruturados (SABERI; FANG; McCLEMENT, 2013).

Segundo Vitorino et al. (2011), o transportador lipídico nanoestruturado confere uma maior organização a sua estrutura e evita a expulsão do fármaco após o armazenamento. Seu tamanho reduzido, junto com elevada área de superfície, permite estabelecer um maior contato com a camada córnea, gerando um efeito oclusivo e, conseqüentemente, aumentando a biodisponibilidade do fármaco na pele.

Na literatura científica, diversos métodos analíticos para a determinação e quantificação de VITE são estudados como a eletroforese capilar (CARO, 2002; ALMEIDA, 2008), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (RIOS; PENTEADO, 2003; KHAYATA et al., 2012) e a espectrofotometria ultravioleta/visível (UV/VIS) (ALMEIDA, 2008; BORBA et al., 2013). A espectrofotometria UV/VIS é uma das técnicas analíticas mais reconhecidas por vantagens relacionadas ao seu uso, sendo utilizada principalmente no controle de qualidade na indústria farmacêutica, que exige rapidez e confiabilidade nos resultados. Possui custo relativamente baixo, fácil utilização e resultados de interpretação simples (ROCHA; TEIXEIRA, 2004; ALVES et al., 2010).

Nesse contexto, acredita-se que o desenvolvimento de um método fácil, rápido e acessível, que promova qualidade aos resultados apresentados seja uma etapa fundamental no desenvolvimento do produto (ROCHA; TEIXEIRA, 2004; ALVES et al., 2010; BORBA et al., 2013).

Após o desenvolvimento de um método analítico, torna-se imprescindível sua validação a fim de provar tecnicamente que este é adequado ao tipo de análise pretendida (ANVISA, 2003). Assim sendo, a literatura consultada não apresenta metodologia para a quantificação de VITE nanoestruturada por espectrofotometria UV/VIS. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar esta metodologia analítica que se apresenta como alternativa eficiente na determinação e quantificação de fármacos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises, foram utilizados transportador lipídico nanoestruturado contendo vitamina E (NVITE) (Inventiva, Brasil), substância química de referência (SQR) de VITE (Sigma-Aldrich, Alemanha), etanol grau cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Merck, Alemanha), etanol grau para análise (PA) (Nuclear, Brasil), filtro de membrana de poro 0,45µm Xtra RC-45/25 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemanha), balança analítica FA-2104N (Bioprecisa, Brasil), espectrofotômetro duplo feixe UV-VIS 1650 PC (Shimadzu, Japão) empregando células de quartzo de caminho óptico de 1cm, Ultrassom Ultra Cleaner USC5000 de potência 270 watts RMS e frequência de 40 kHz (Unique, Brasil).

SQR E AMOSTRAS

Primeiramente, foram preparadas soluções mãe de NVITE, nanoestruturas lipídicas sem ativo (NB) e SQR de VITE a uma concentração de 400 µg/mL, cada uma. A partir destas soluções, foram realizadas diluições para atingir as concentrações necessárias. Após o preparo, todas as soluções foram filtradas para leitura das amostras.

CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Para caracterização da suspensão de NVITE, foram realizadas análises de tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) através de espalhamento de luz dinâmico e o potencial zeta por mobilidade eletroforética, os quais foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Reino Unido). A amostra foi diluída 500 vezes para a determinação do tamanho de partícula, PDI e potencial zeta; os diluentes utilizados foram água Milli-Q® (Millipore, França) para tamanho de partícula e PDI, já para determinação do potencial zeta, o diluente utilizado foi o cloreto de sódio na concentração de 10 mmol/L.

Desenvolvimento do método analítico

Em um primeiro momento, optou-se por avaliar a solubilidade da VITE com três solventes: etanol, metanol e acetonitrila (grau CLAE), objetivando assim definir o melhor solvente a ser utilizado para o desenvolvimento método analítico. Para isso, levou-se em consideração o poder de solubilização do fármaco, custo, toxicidade e a sensibilidade do fármaco quando associado a tal solvente frente ao comprimento de onda utilizado. Diante disso, realizou-se uma varredura na faixa de 200 a 400 nm nos diferentes sistemas de solventes propostos, para a identificação do comprimento de onda que apresentasse o valor de absorvância mais adequado para o método.

Posteriormente, foram realizadas técnicas para extração da VITE das NVITE utilizando agitação manual e ultrassom variando o tempo de extração (15 e 30min). Além disso, também foi observada a estabilidade das amostras no solvente escolhido, avaliando-se o aspecto visual e a absorvância das mesmas, preparadas na presença ou não de filtro de membrana de poro 0,45µm.

Ao determinar as condições necessárias para análise, partiu-se para a validação do método analítico.

Validação do método por espectrofotometria UV/VIS

Os ensaios para validação seguiram a Resolução - RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), sendo avaliados os parâmetros analíticos de especificidade, linearidade, precisão, robustez e exatidão.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de análises comparativas entre as amostras de SQR VITE, NVITE e NB, por meio da técnica de espectrofotometria UV/VIS realizada em todas as amostras durante o período de desenvolvimento do mesmo.

Em um primeiro momento, avaliou-se o espectro obtido da leitura de NVITE, zerando o aparelho com etanol que é o solvente utilizado no preparo das amostras. Nesse momento, pode-se observar a interferência das NB na análise.

Linearidade, limite de detecção e quantificação

A linearidade do método foi avaliada a partir da análise de uma curva padrão nas concentrações de 80, 100, 120, 140 e 160 µg/mL da SQR VITE. Os resultados foram tratados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), regressão linear e correlação de Pearson utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad, EUA).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média das três curvas padrão (ANVISA, 2003).

Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo mesmo analista, repetindo o procedimento necessário para as análises em um período curto de tempo (repetibilidade) e por precisão intermediária (reprodutibilidade interna), realizada por meio de outro analista em dias diferentes, porém com os mesmos equipamentos. O ensaio constou de três concentrações: 80, 120 e 160 µg/mL (baixa, média e alta) e os resultados foram analisados através do desvio padrão relativo (DPR).

Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir de ensaios de recuperação de três concentrações conhecidas da amostra: 120, 140 e 160 µg/mL. O resultado foi expresso percentualmente pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente a 50, 75 e 100% de SQR VITE adicionada nas amostras.

Robustez

Para determinar se o método desenvolvido é robusto, optou-se por utilizar um delineamento experimental 2^3 , no qual foi possível variar grau do solvente utilizado, presença ou ausência de filtro de membrana de poro 0,45 µm e uso de diferentes comprimentos de onda para a análise, conforme descrito na tabela 1. Estes resultados foram tratados estatisticamente pela ANOVA seguida do teste de Tukey com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad, EUA).

Tabela 1 - Variações atribuídas às amostras para determinação da robustez.

Amostras	Grau do solvente (Etanol)	Comprimento de onda (nm)	Filtro ^a
A1	CLAE	283	P
A2	CLAE	287	P
A3	CLAE	283	A
A4	CLAE	287	A
A5	PA	283	P
A6	PA	287	P
A7	PA	283	A
A8	PA	287	A

^a P = presente e A = ausente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Como resultados da caracterização, as NVITE apresentaram um tamanho de partícula de $169,20\text{nm} \pm 1,01$, PDI $0,11 \pm 0,01$ e potencial zeta $-25,50\text{mV} \pm 3,84$, já as NB exibiram tamanho de $189,78\text{nm} \pm 1,16$, PDI $0,12 \pm 0,02$ e potencial zeta de $-17,41\text{mV} \pm 0,31$; estes resultados demonstraram que as amostras apresentaram boa homogeneidade (TRIERWEILER, 2009) e também diâmetro médio das partículas em escala adequada para que se obtenha o efeito da vetorização desejado (GRAMA; ANKOLA; RAVI KUMAR, 2011). O potencial zeta, distante de 0 mV indica que as partículas presentes na suspensão apresentam repulsão suficiente para mantê-las estável (TRIERWEILER, 2009), demonstrando que as NVITE e as NB apresentam características que as capacitam para uso no desenvolvimento e validação do método.

Desenvolvimento do método analítico

Ao analisarmos a figura 2, podemos observar que o metanol tem poder de solubilização menor da VITE quando comparado a solubilidade dos demais solventes testados (acetonitrila e etanol). Desta forma, estes foram considerados os melhores solventes para a VITE, porém quando considerados custo e toxicidade optou-se por utilizar o etanol, pois este apresenta menor toxicidade e custo quando comparado aos demais solventes utilizados (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

As diferentes técnicas para extração da VITE dos transportadores lipídicos utilizando agitação manual e ultrassom demonstraram que a técnica mais adequada foi a agitação manual, pois quanto maior o estresse da NVITE, menor a absorvância e consecutivamente, menor o teor de VITE

determinado. Além disso, esta foi uma técnica simples e rápida para ser empregada na determinação de VITE em transportador lipídico nanoestruturado.

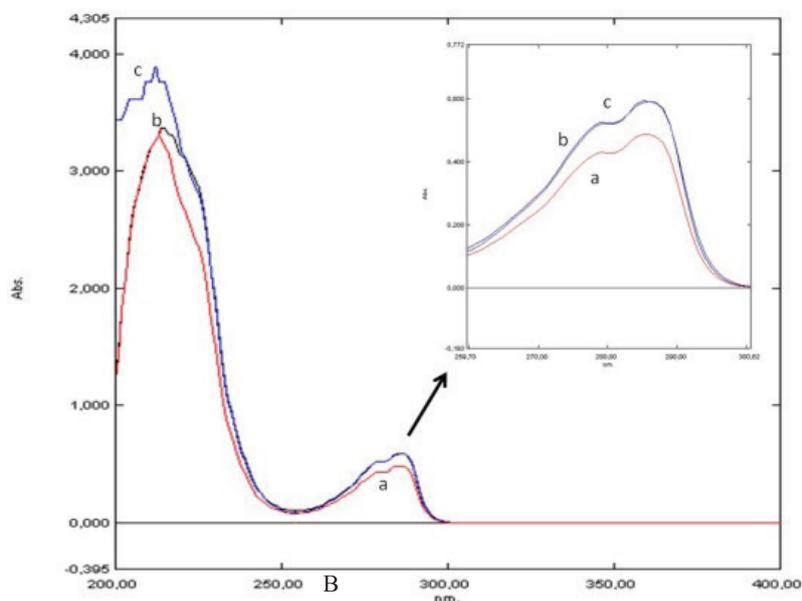


Figura 2 - Sobreposição dos espectros de VITE na concentração de 120 μ g/mL diluída em metanol (a), etanol (b) e acetonitrila (c).

VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

Especificidade

Quando traçados e sobrepostos os espectros de NVITE, SQR VITE e das NB zerando o equipamento com o solvente, observou-se uma interferência das NB na determinação de VITE nas nanoestruturas (Figura 3A), pois embora todas as amostras estejam na mesma concentração, aparentemente, as NVITE demonstram ter maior concentração. Nesse sentido, a especificidade do método foi determinada a partir de seu desenvolvimento para determinação de VITE nas nanoestruturas sem a interferência das NB, sendo considerados os seguintes parâmetros como ideais na análise pretendida: concentração de trabalho de 120 μ g/mL, comprimento de onda de 285nm, emprego de filtro de membrana poro 0,45 μ m e zerar o equipamento com as NB. Dessa forma, quando traçados os espectros das NVITE com tais parâmetros, não visualizamos a interferência das NB na análise (Figura 3B), demonstrando que neste momento determina-se apenas a VITE presente nas nanoestruturas.

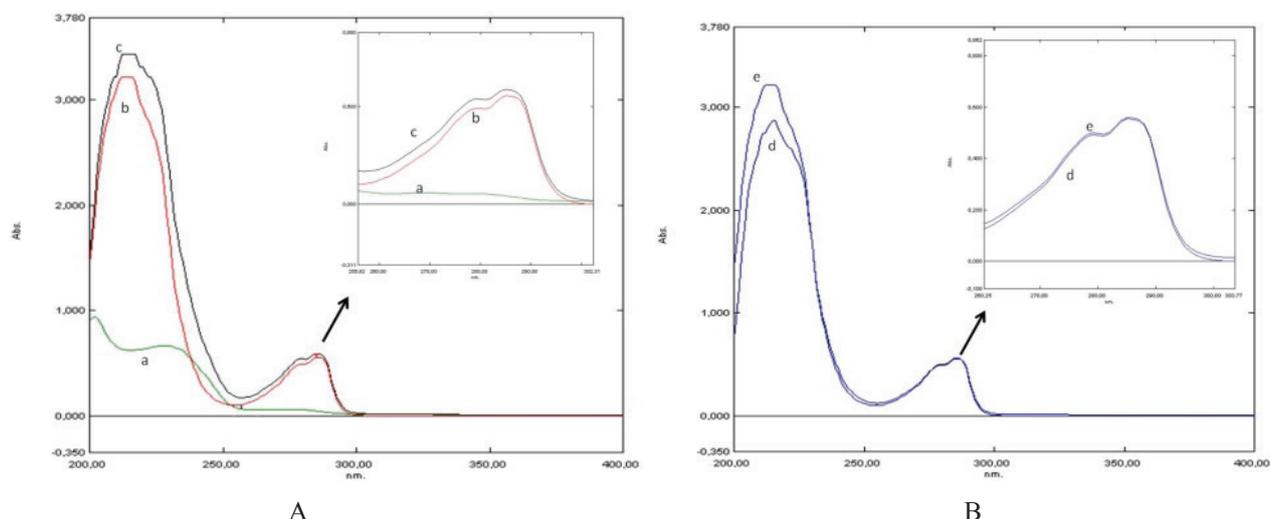


Figura 3 A-B - Interferência das NB (A): NB (a), SQR VITE (b), NVITE (c) e ponto de anulação da interferência das NB (B): SQR VITE (d), NVITE (e). Todas as soluções em etanol na concentração de 120 μ g/mL.

Linearidade

A análise dos resultados da linearidade por ANOVA demonstrou $P < 0,0001$, demonstrando ser significativa a diferença de leitura entre as concentrações analisadas. A partir da curva padrão encontrada ($y = 0,004970x - 0,02020$), calculou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson, obtendo-se assim o valor de 0,9999, estando este resultado de acordo com a legislação vigente (ANVISA, 2003), a qual exige um coeficiente mínimo de 0,99. Com base nesses dados, calcularam o LD e LQ e os resultados encontrados foram 16,55 μ g/mL e 49,68 μ g/mL, respectivamente.

Precisão

Os resultados dos ensaios de precisão revelam que o método apresenta boa repetibilidade e reprodutibilidade interna conforme dados da tabela 2, estando estes resultados em consonância com a ANVISA (2003), a qual exige um DPR máximo de 5%.

Tabela 2 - Valores de DPR da reprodutibilidade interna e repetibilidade.

Concentração (μ g/ml)	1º dia ^a Teor (%)	2º dia ^a Teor (%)	3º dia ^b Teor (%)
80	103,46	99,73	100,53
120	98,44	98,61	99,31
160	102,30	98,78	99,72
Média	101,40	99,04	99,85
DPR	2,62	0,60	0,62
Reprodutibilidade interna			
Média (%)		100,10	
DPR		1,20	

^aAnalista 1; ^bAnalista 2

Exatidão

Como resultados do ensaio de exatidão, foi obtido um percentual médio de recuperação de 99,46%, apresentando um DPR de 1,15%, estando esta análise em consonância com a International Conference on Harmonization (ICH, 2005) a qual orienta que o teor de fármaco recuperado deve ficar entre 98 e 102%.

Robustez

A análise de robustez do método por ANOVA e o pós-teste de *Tukey* demonstram que a variação do solvente entre grau CLAE e PA, e o comprimento de onda não interferem na análise do mesmo. Em contrapartida, o uso do filtro de membrana auxiliou e reter um número maior de interferentes à leitura (TRIERWEILER, 2009), visto que amostras que foram submetidas a ele apresentaram teor superior quando comparadas às filtradas. Desta forma, o uso do filtro foi considerado condição necessária para análise.

CONCLUSÕES

Por meio do desenvolvimento e validação do método analítico, conclui-se que o melhor solvente para as análises foi o etanol e que o grau CLAE ou PA não influencia nas mesmas. O uso do filtro de membrana aliado à técnica de zerar o espectrofotômetro com as nanoestruturas sem o ativo foi fator determinante para a realização de uma análise sem os interferentes da formulação. Desta forma, o método demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto. Além disso, a instrumentação foi considerada bastante acessível, sendo a técnica rápida e de fácil execução.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA; **Resolução nº 899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, de 29/05/2003, publicada em 2/6/2003.

ALMEIDA, M. M. **Determinação e quantificação das vitaminas C e E associadas em produtos cosméticos**. Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado, Brasil, 2008.

ALVES, L. D. S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria UV/VIS. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

BORBA, P. A. M. 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, 2013.

CARO, A. S. B. **Determinação e padronização da vitamina E e seus isômeros: comparação entre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método espectrofotométrico por redução de íons cúpricos**. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado, Campinas-SP, Brasil, 2002. 148 p.

GRAMA, C. N.; ANKOLA, D. D.; RAVI KUMAR, M. N. V. Poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for peroral delivery of bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, p. 238-245, 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH; **Q2R1- Validation of Analytical procedure: Text and Methodology**, 2005.

KHAYATA, N. et al. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 419-427, 2012.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 563-569, set./out.2002.

OGA, S; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. Porto Alegre: Artmed, 3 ed. 2008.

RIOS, M. D. G.; PENTEADO, M. V. C. Determinação de a-Tocoferol em alho irradiado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 10-12, 2003.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em Espectrofotometria UV/VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; McCLEMENT, D, J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 95-02, 2013.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: Como produzi-las em escala industrial**. Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, Brasil, 2009.

VITORINO, C. Nanopartículas lipídicas no transporte de fármacos para administração transdérmica. **Newsletter University of Coimbra (UC.PT)**, 2011.