



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA – UEPB
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS – CCBSA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
CANDIDATO A FÁRMACO ANTITUMORAL 2-[(1*H*-INDOL-3-IL-METILIDENO)-
AMINO]-5,6,7,8-TETRAHIDRO-4*H*-CICLOHEPTA[*b*]TIOFENO-3-CARBONITRILA**

ALISSON FELIPE FELICIO DA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça

**JOÃO PESSOA
2014**

ALISSON FELIPE FELICIO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
CANDIDATO A FÁRMACO ANTITUMORAL 2-[(1*H*-INDOL-3-IL-METILIDENO)-
AMINO]-5,6,7,8-TETRAHIDRO-4*H*-CICLOHEPTA[b]TIOFENO-3-CARBONITRILA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Afonso
de Moura Mendonça**

**JOÃO PESSOA
2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586d Silva, Alisson Felipe Felicio da

Desenvolvimento de nanocápsulas biodegradáveis contendo candidato a fármaco antitumoral 2-[(1h-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4h-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila [manuscrito] : / Alisson Felipe Felicio da Silva. - 2014.
67 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça, Departamento de Biologia".

1. Nanocápsulas. 2. Solubilidade. 3. Validação. I. Título.

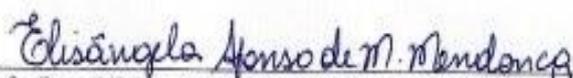
21. ed. CDD 546.524

ALISSON FELIPE FELÍCIO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
CANDIDATO A FÁRMACO ANTITUMORAL 2-[(1H-INDOL-3-IL-METILIDENO)-
AMINO]-5,6,7,8-TETRAHIDRO-4H-CICLOHEPTA[b]TIOFENO-3-CARBONITRILA

Aprovado em: 23/10/2014

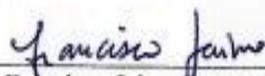
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha mãe (Rosângela), a minha avó materna, Alice,
a minha namorada Dayane e aos demais familiares
pela dedicação, incentivo, companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Mendonça pela dedicação, apoio, conhecimento, contribuição no decorrer desses anos de graduação.

A equipe do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas – LSVM. Em especial a técnica Michelle Pedrosa, pelo apoio.

À todos os professores deste curso, pela dedicação e ensinamentos necessários para minha formação acadêmica e pessoal. Em especial, aos professores Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Ricardo Moura, Elquio Eleamen e Rodrigo Santos, por todo incentivo e conhecimento.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Em especial a professora Nereide Stela Santos Magalhães.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT da Universidade Federal de Pernambuco. Em especial a professora Maira Galdino Rocha.

Ao CNPq, PRPGP/UEPB e PIBIC/UEPB pelo apoio financeiro.

A todos os amigos de classe pelas trocas de experiências e alegrias durante todo o curso. Em especial, Jéssica Senna, Jessyca Oliveira, Daniela Dantas, Nathalia Oliveira, Thuanny Alencar, Lays Almeida, Allysson Kleber, Rodrigo Otávio, Wanna Marcolino, Luís Heleno e Isadora Luna por estarem sempre nos momentos de alívio e tensão.

Ao meu irmão caçula, Alan Delon, por ter acreditado em meu potencial, por todas as palavras de conforto e por toda amizade.

Aos meus familiares, Rosângela, Fátima, Janete, Rosélia, Socorro, Nilson, Domingues, Raissa, Shenian e Sheila, pelo apoio, cuidado, carinho no decorrer de toda minha graduação. Por todas as palavras de conforto e incentivo que sempre foram muito edificantes para minha vida. Por acreditarem no meu potencial, por todo amor e dedicação.

A Dayane Costa, por ter seguido comigo nessa etapa para a conclusão do curso, por todos os momentos de incentivo, amor e companheirismo.

**“Não vim até aqui pra desistir agora
Entendo você se você quiser ir embora
Não vai ser a primeira vez
Nas últimas 24 horas...”
Engenheiros do Hawaii**

RESUMO

O desenvolvimento de sistemas nanoparticulados permite a liberação controlada e dirigida de fármacos em concentração adequada para o alvo biológico. Entre as vantagens destes sistemas estão a redução da dosagem, seletividade, reduzidos efeitos colaterais e a liberação controlada. Cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido, principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, carreadores nanométricos, capazes de modular a liberação com alto grau de reprodutibilidade, surgiram como alternativas eficazes. Neste sentido, inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas na terapia de câncer, sendo a maioria destas para melhorar a entrega do medicamento no local do tumor, como é o caso dos sistemas nanoparticulados. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanocápsulas biodegradáveis contendo candidato a fármaco antitumoral 2-[(1*H*-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB44-LSVM). Os nanosistemas foram preparados pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, posteriormente foi feita a avaliação da estabilidade de encapsulação. Foi realizada uma validação do método analítico de acordo com as diretrizes da RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA. Os resultados mostraram que a melhor formulação com 5 mg do candidato a fármaco antitumoral, se apresenta com melhores parâmetros como a eficiência de encapsulação de 99.25 ± 0.05 % e o potencial zeta de -27.2 mV. Com relação a validação a faixa de linearidade foi de 0,1 a $6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, a equação de regressão: $y = 0.0832x + 0.0384$ e $r = 0,9999$, a repetibilidade (coeficiente de variação) do método com valores entre 0 e 3,93% e a precisão intermediária indicou que não há diferença entre as médias foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). A exatidão revelou média percentual de recuperação entre 99,96 e 104,88%. O método foi robusto nos diferentes solventes. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,0281 e $0,09639 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Neste estudo a associação de nanopartículas com o candidato a fármaco apresentou ótimos resultados em relação a sua estabilidade, logo consideramos que as nanopartículas conferem maior proteção e como também melhoram a forma de solubilização do mesmo. O método de validação proposto é exato, preciso e reprodutível sendo capaz de quantificar o SB44-LSVM em matéria-prima

Palavras-Chave: Nanocápsulas, solubilidade, validação

ABSTRACT

The development of nanoparticulate systems allows the controlled release of drugs, and direct in proper concentration for the biological target. Among the advantages of these systems, we have for example, reduction of the dosage, selectivity, reduced side effects and controlled release. Approximately 40% of pharmacologically active molecules discovered are rejected, mainly due to reduce solubility and bioavailability. To circumvent such problems, nanosized carriers, capable of modulating the release with a high degree of reproducibility, have emerged as effective alternatives. In this regard, several strategies have been developed and used in cancer therapy, most of these to improve drug delivery to the tumor site, as is the case of nanoparticulate systems. This study aimed at was development of biodegradable nanocapsules containing the antitumor drug candidate 2 - [(1*H*-Indol-3-yl-methylidene) amino] -5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-ciclohepta[*b*] thiophene-3-carbonitrile (SB44-LSVM) .The nanosystems were prepared by interfacial deposition of preformed polymers method further assess the stability of encapsulation was performed. A validation of the analytical method according to the guidelines of the RE N° 899 of May 29, 2003 ANVISA was performed. The results showed that the best formulation with 5 mg of the antitumor drug candidate, presents with best parameters such as encapsulation efficiency of $99.25 \pm 0.05\%$, and the zeta potential of -27.2 mV. With respect to validating the range of linearity was 0.1 to 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the regression equation: $y = 0.0832x + 0.0384$ $r = 0.9999$, the repeatability (coefficient of variation) of the method amounts between 0 and 3.93% and the intermediate precision indicated no difference between the averages was statistically significant ($P < 0.05$). The accuracy revealed an average percentage recovery between 99.96 and 104.88%. The method was robust in different solvents. The limits of detection and quantification were 0.0281 and 0.09639 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. In this study the association of nanoparticles with the candidate drug showed excellent results regarding its stability, so consider that nanoparticles provide greater protection and also as a way to improve the solubility of the same. The proposed validation method is accurate, precise and reproducible being able to quantify the SB44-LSVM in raw material

Keywords: Nanocapsules, solubility, validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação de nanocápsulas e nanoesferas.....	19
Figura 2.	Modelo ilustrativo do mecanismo de montagem para produção de nanocápsulas poliméricas.....	34
Figura 3.	Diluições a partir de uma solução estoque.....	37

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Polimerização do monômero cíclico ϵ - caprolactone (a) e (b) estrutura química da poli(ϵ - caprolactona).....	20
Esquema 2	Estrutura do tiofeno.....	23
Esquema 3	Composto benzo[<i>b</i>]tiofeno 2-substituídos.....	23
Esquema 4	Estrutura do candidato à fármaco 2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila (SB44-LSVM).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Solubilidade das substâncias.....	25
Tabela 2	Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos.....	28
Tabela 3	Estudo de pré-formulação com Pluronic e com Tween 80.....	41
Tabela 4	Características físico-químicas das nanocápsulas.....	42
Tabela 5	Avaliação da estabilidade de nanocápsula polimérica com 5mg do (SB44-LSVM).....	45
Tabela 6	Solubilidade do SB44-LSVM em meio aquoso.....	46
Tabela 7	Dados utilizados na construção da curva de calibração do SB44-LSVM.....	48
Tabela 8	Resultados da Análise de Variância-ANOVA um critério ($p < 0,05$).....	49
Tabela 9	Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	50
Tabela 10	Resultados obtidos para os ensaios de repetibilidade, precisão intermediária ($n = 3$) e Teste t Student.....	52
Tabela 11	Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.....	52
Tabela 12	Resultados do ensaio para verificação da robustez do método.....	53
Tabela 13	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para cada método desenvolvido.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Espectro de varredura do SB44-LSVM observado o comprimento de onda de 395nm correspondendo à absorção máxima do fármaco.....	47
Gráfico 2	Curva de calibração do SB44-LSVM (média, n=6). λ : 395 nm. Equação da reta: $y = 0.0832x + 0.0384$ ($r = 0,9999$).....	48
Gráfico 3	Espectros de absorção do SB44-LSVM em concentrações de (0,1;0,2; 0,4; 1; 2; 4 e 6 $\mu\text{g/mL}$) em álcool metílico.....	50
Gráfico 4	Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM em pbmcs.....	54
Gráfico 5	Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM na linhagem JURKAT.....	55
Gráfico 6	Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM na linhagem T47D.....	56
Gráfico 7	Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM na linhagem HEPG2.....	56

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CV%	Coeficiente de variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE%	Eficiência de encapsulação
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HBV	Infecções crônicas de hepatite B
HCL	Ácido clorídrico
HCV	Vírus da hepatite C
HEP	Carcinoma de laringe humano
HEPG2	Hepatocarcinoma
HPV	Vírus do papiloma humano
HT29	Carcinoma de cólon humano
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer
IC	Inclinação da curva de calibração
IC₅₀	Concentração Inibitória Cinquenta por cento
JURKAT	Leucemia de células T
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2- <i>H</i> -brometo de tetrazolio
mV	Milivolt
NCI H-292	Câncer de pulmão
NCs	Nanocápsulas
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCL	Polí- ϵ - caprolactona
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido polilático
PLGA	Poli ácido láctico-co-ácido glicólico
Ppt	Precipitação
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
RHC	Registros Hospitalares de Câncer
R²	Coeficiente de correlação
SB44-LSVM	2-[(1 <i>H</i> -Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
T47D	Câncer de mama metastático
UV/VIS	Ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume
λ	Comprimento de onda
(ζ)	Potencial zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Nanotecnologia.....	18
2.2 Nanopartículas poliméricas	19
2.3 Câncer.....	21
2.4 Composto derivado do tiofeno	23
2.5 Solubilidade.....	24
2.6 Validação de procedimentos analíticos	26
2.6.1 Parâmetros de desempenho.....	26
2.6.1.1 Especificidade e seletividade.....	27
2.6.1.2 Linearidade da curva de calibração.....	27
2.6.1.3 Intervalo.....	28
2.6.1.4 Limite de detecção.....	29
2.6.1.5 Limite de quantificação.. ..	29
2.6.1.6 Precisão.....	30
2.6.1.7 Exatidão.....	30
2.6.1.8 Robustez... ..	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.1.1 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Parte experimental	33
4.1.1 Preparação das nanopartículas.....	33
4.1.2 Medidas de estabilidade química.....	34
4.1.3 Estabilidade dos sistemas	34
4.1.4 Tamanho e distribuição da partícula.....	35
4.1.5 Medidas de tamanho e polidispersão.....	35
4.1.6 Teor e eficiência de encapsulação do fármaco	35
4.1.7 Potencial Zeta	36
4.1.8 Determinação da solubilidade do SB44-LSVM em meio aquoso.....	36
4.1.9 Validação de metodologia analítica.....	36
4.1.10 Análise de citotoxicidade	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1 Estudo de pré-formulação e caracterização físico-química das nanocápsulas contendo o SB44-LSVM.....	41
5.2 Avaliação da estabilidade em função do tempo	44
5.3 Determinação da solubilidade do SB44-LSVM em meio aquoso.....	46
5.4 Validação do método analítico	46
5.4.1 Determinação do comprimento de onda de detecção	47
5.4.2 Linearidade	47
5.4.3 Especificidade.....	49
5.4.4 Precisão.....	50
5.4.5 Exatidão	52
5.4.6 Robustez	53
5.4.7 Limite de detecção e quantificação	53
5.5 Atividade antitumoral	54
5.5.1 Testes em células mononucleadas do sangue periférico (PBMCS) de voluntários sadios	54
5.5.2 Testes na linhagem JURKAT (leucemia de células T).....	55
5.5.3 Testes na linhagem T47D (câncer de mama metastático)	55
5.5.4 Testes na linhagem HEPG2 (hepatocarcinoma).....	56
6 CONCLUSÕES	57
7 PERSPECTIVAS	58
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a nanociência e a nanotecnologia tem sido transferida de laboratórios de pesquisa para o uso do consumidor, motivados pela capacidade de resposta às necessidades da sociedade para uma melhor qualidade de vida e proteção do meio ambiente. O grande interesse no estudo destes nanomateriais se deve ao fato de apresentarem propriedades físico-químicas distintas dos materiais base já conhecidos, o que permite inúmeras novas possibilidades de aplicações, entre as quais tem sido amplamente introduzida em aplicações biomédicas, incluindo detecção biológica, diagnóstico por imagem e distribuição de medicamentos, em particular no domínio do tratamento do câncer (BARKALINA et al., 2014).

Um dos grandes objetivos da nanomedicina é o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e dirigida de fármacos em concentração adequada no tecido alvo. Razão pela qual, há grande interesse em sistemas nanoparticulados eficazes em escala nanométrica. Entre as vantagens destes sistemas estão à redução da dosagem, seletividade em relação ao alvo biológico (tecido ou células), reduzidos efeitos colaterais, liberação controlada evitando os picos de dosagem, típicos de medicamentos convencionais (CERIZE, 2012). Além disso, cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido, principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, carreadores micrométricos e nanométricos, capazes de modular a liberação com alto grau de reprodutibilidade, surgiram como alternativas eficazes (VILLANOVA et al., 2010). Esses nanossistemas de liberação controlada de fármacos são utilizados nas terapias para tratamentos oncológicos.

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A carga do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Nesses, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão, cólon e reto; entre as mulheres foram o de mama, cólon e reto e pulmão. Nos países em desenvolvimento,

os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; as mulheres foram o de mama, colo do útero e pulmão.

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). (INCA, 2014).

Neste sentido, buscam-se novos fármacos e nanosistemas de liberação controlada que sejam menos tóxicos, mais eficazes e específicos para o tratamento desta doença. Estes, além de trazer vários benefícios terapêuticos, podem também superar casos de resistência a múltiplas drogas pelas células cancerosas (JABIR et al., 2012).

Alguns fármacos utilizados na terapêutica possuem em sua estrutura o anel tiofeno. Entre as diversas atividades farmacológicas dos tiofenicos estão as ações anti-hipertensiva, anti-inflamatória e analgésica, antimicrobiana, anti-helmíntica, antidepressiva, antipsicótica, e antitumoral. Souza e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antitumoral do composto 2-[(1*H*-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB44), através da análise de citotoxicidade pelo método do MTT, constataram que o SB44 exibiu maior potencial de inibição do crescimento das linhagens tumorais humanas (100% para HT29 e NCI H-292; 97,5% para HEP) e que o composto tem fraca solubilidade em água. Este fato direciona o desenvolvimento de nanosistemas, como as nanocápsulas associadas ao SB44, para aumentar a biodisponibilidade, solubilidade e validação do método analítico do candidato a fármaco.

Quanto a questões sanitárias e regulatórias relativas à nanomedicamentos, todos os métodos para a determinação quantitativa de fármacos devem ser validados para garantir a segurança e confiabilidade dos resultados obtidos. Dessa forma, a validação é definida como o ato documentado que atesta que determinado procedimento, processo, material, atividade ou sistema, estejam realmente conduzindo aos resultados esperados. Para tanto, deve apresentar: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e limite detecção e quantificação, conforme aplicação analítica do método em questão (ICH, 2010; BRASIL, 2012). E, apesar de intensa atividade científica e desenvolvimento destes novos medicamentos e carreadores

nanométricos, poucos foram aprovados até o momento pelas principais agências reguladoras como o FDA (Food and Drug Administration) dos EUA e pela EMEA (European Medicines Agency), entre outras. (JABIR et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi à obtenção de sistemas nanoparticulados poliméricos biodegradáveis de um candidato a fármaco antitumoral, a validação do método analítico, bem como a avaliação da atividade antitumoral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que se dedica ao desenvolvimento ou manipulação de dispositivos e sistemas com dimensão nanométrica. A aplicação da nanotecnologia nas mais variadas áreas, especialmente na área da saúde, está em crescente evolução (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012) e explora a peculiaridade das propriedades físico-químicas presentes nos materiais de tamanho submicrométrico.

Em se tratando das áreas da medicina e farmácia é possível elencar algumas das diversas aplicações: veiculação de fármacos, vacinas, terapia gênica, proteínas, biossensores para uso diagnóstico, cosméticos, implantes e próteses (CARRARO, 2013).

O interesse em todas essas aplicações se deve aos benefícios inerentes, como por exemplo, a rapidez e sensibilidade em usos na medicina diagnóstica, o direcionamento sítio-específico no caso de veiculação de vacinas na medicina preventiva, a vetorização e a liberação prologada no caso dos fármacos.

Diante dessa emergência das nanotecnologias, a veiculação de fármacos vem despertando grande interesse nas pesquisas científicas e em indústrias farmacêuticas (PARVEEN ; MISRA; SAHOO, 2012), em face da possibilidade de aprimoramento do desempenho de medicamentos existentes no mercado, ou do desenvolvimento de novas formulações.

Os dispositivos nanométricos que servem como carreadores de fármacos podem ser sintetizados a partir de diferentes matérias-primas, bem como podem apresentar conformações estruturais variadas. Dentre muitos é possível destacar: lipossomas, nanoemulsões, nanotubos, dendrímeros, micelas, e nanopartículas com as mais variadas composições: poliméricas, magnéticas, cerâmicas, lipídica-sólidas, metálicas, entre outros (CARRARO, 2013).

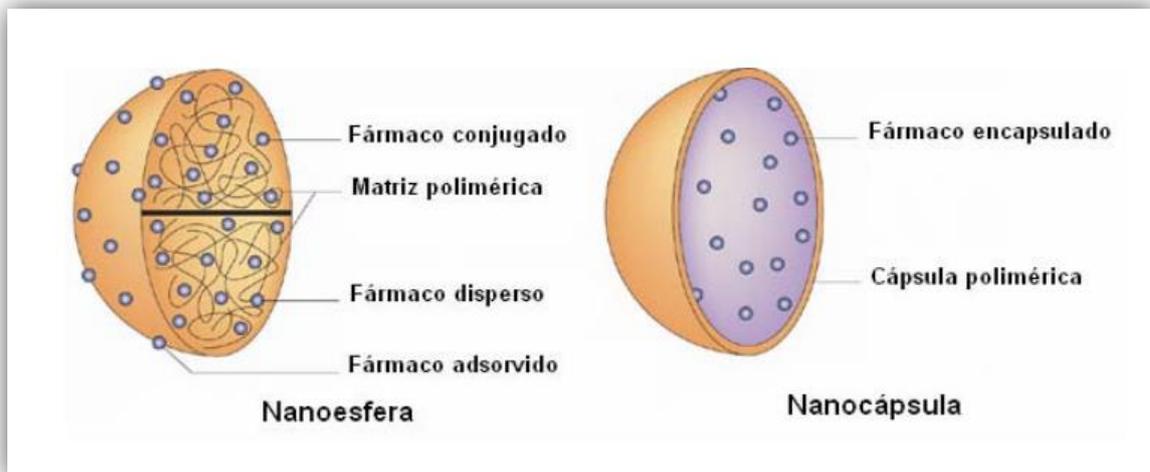
Frente a uma aplicação farmacêutica, a seleção do sistema nanométrico a ser utilizado no transporte de fármacos está relacionada à ação desejada e a compatibilidade físico-química com o fármaco em questão. A seguir, focaremos o estudo na classe das nanopartículas poliméricas, um dos dispositivos nanométricos mais explorados.

2.2 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas coloidais, de tamanho nanométrico, compostas essencialmente por polímeros naturais ou sintéticos. De acordo com o método por qual são sintetizadas, as NPs adquirem distinta estrutura interna (**Figura 1**) e podem ser diferenciadas em:

- a) Nanocápsulas: são constituídas por um núcleo líquido, do tipo reservatório, podendo ser oleoso ou aquoso, envolto por uma parede polimérica. A molécula a ser transportada pode estar enclausurada no núcleo ou adsorvida à parede polimérica (RAO; GECKELER, 2011).
- b) Nanoesferas: correspondem a matriz sólida composta por polímero, onde a substância carregada encontra-se molecularmente dispersa na matriz ou adsorvida nela (RAO ; GECKELER, 2011).

Figura 1. Representação de nanocápsulas e nanoesferas (Adaptado de FERREIRA, 2012).



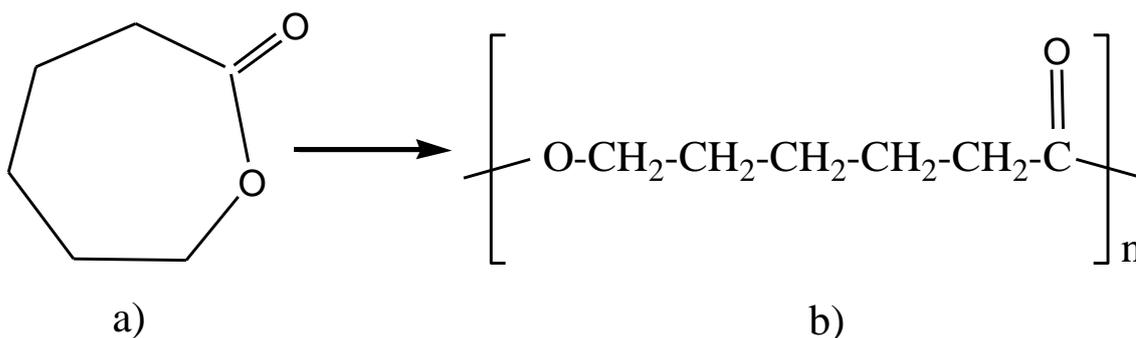
As principais características das NPs têm estimulado sua ampla investigação conferindo a estas estruturas elevada potencialidade para a veiculação de fármacos, e dizem respeito ao reduzido diâmetro e direcionamento sítio-específico.

No que diz respeito ao diâmetro médio da partícula, esta é uma das propriedades finais que pode ser modulada a partir do método de obtenção considerando-se os parâmetros experimentais envolvidos: temperatura da reação, velocidade de evaporação do solvente, volume das fases, concentração do surfactante e velocidade de homogeneização, em se tratando de métodos de emulsificação (RAO; GECKELER, 2011).

A maioria dos polímeros utilizados na preparação de nanopartículas é biodegradável e biocompatível ou, no mínimo, estes polímeros são totalmente eliminados do organismo num relativo curto período de tempo para que não ocorra o acúmulo do mesmo caso haja repetição de administração. Além disso, não podem ser ou ter produtos de degradação que sejam tóxicos ou imunogênicos. Respeitando estas condições, alguns dos principais polímeros empregados para este fim são: PCL (poli- ϵ - caprolactona), PLGA (poli ácido láctico-co-ácido glicólico), PLA (ácido polilático), quitosana e eudragit®. Todos estes polímeros são sintéticos, exceto a quitosana, que tem origem natural (KUMARI et al., 2010).

O PLA, o PLGA e o PCL são poliésteres alifáticos, suscetíveis à degradação em meio biológico e são muito utilizados para revestimento de medicamentos implantáveis. Dentre estes polímeros, o PLGA é o que possui menor tempo de degradação (VILLANOVA et al., 2010). O Poli(ϵ - caprolactona), é um poliéster alifático semicristalino, obtido por um anel de abertura de polimerização através de ϵ -caprolactona como monômero (**Esquema 1**). O PCL tem temperatura de transição vítrea e fusão aproximadamente (-60°C e 60°C), respectivamente. Em temperatura ambiente, PCL é solúvel em solventes aromáticos e solventes clorados (diclorometano e clorofórmio), parcialmente solúveis em solventes polares, tal como a acetona, acetonitrilo e dimetilformamida, mas insolúvel em água e álcool. (POHLMANN et al., 2013).

Esquema 1. Polimerização do monômero cíclico ϵ - caprolactona (a) e (b) estrutura química da poli(ϵ - caprolactona).



O PCL é bastante utilizado na preparação de sistemas de liberação controlada. Possui baixa degradação, sendo ideal para sistemas de liberação em longo prazo. Sua elevada permeabilidade e a ausência de toxicidade permitem que este polímero sintético seja adequado à nanotecnologia farmacêutica (POHLMANN et al., 2013).

2.3 Câncer

O Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica marcante do câncer é o crescimento desordenado de células normais que crescem além de seus limites habituais, e que pode, em seguida, invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Este processo é referido como metástase. As metástases são a principal causa de morte por câncer (WHO, 2014). A complexidade genética e fenotípica esclarece sua diversidade clínica e resistência terapêutica. Apesar dos avanços impressionantes na biologia do câncer, esta continua sendo, de alguns anos para cá, a principal causa de mortes no mundo (JABIR et al., 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), através de sua agência de investigação do câncer, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC), mantém uma classificação dos agentes que causam câncer, como:

- Carcinógenos físicos, tais como a radiação ultravioleta e ionizante;
- Produtos químicos cancerígenos, como amianto, a aflatoxina (um contaminante de alimentos) e o arsênico (um contaminante de água potável);
- Carcinogêneos biológicos, tais como infecções de certos vírus, bactérias ou parasitas.

O envelhecimento é um fator fundamental para o desenvolvimento de câncer. A incidência de câncer aumenta drasticamente com a idade, provavelmente devido a uma acumulação de riscos para cânceres específicos. A acumulação global de risco é combinada com a tendência para os mecanismos de reparação celular a serem menos eficazes quando uma pessoa envelhece (WHO, 2014)

O consumo de álcool e alimentação inadequada são os principais fatores de risco de câncer em todo o mundo. Infecções crônicas de hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e alguns tipos de vírus do papiloma humano (HPV) estão levando fatores de risco para o câncer em países de baixa e média renda. O câncer do colo do útero, que é causado pelo HPV, é uma das principais causas de morte por câncer entre as mulheres nos países de baixa renda (WHO, 2014).

Em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

É com base nas informações de 23 Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), alimentados por uma rede de 282 Registros Hospitalares de Câncer (RHC), que se consolida o sistema de morbidade por câncer – com informações oportunas e de qualidade (padronizadas, atualizadas e representativas da população brasileira). A esse sistema, agrega-se o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) para a elaboração da estimativa de 19 tipos de câncer, apresentada para o território nacional, estados e capitais, por gênero (INCA, 2014).

De outro lado, atividade fundamental é o monitoramento continuado dos programas de prevenção e controle implementados para combater o câncer e seus fatores de risco. Esse monitoramento incorpora a supervisão e a avaliação dos programas como atividades necessárias para o conhecimento do andamento e do impacto no perfil de morbimortalidade da população, bem como a manutenção de um sistema de informações oportuno e de qualidade, que subsidie análises epidemiológicas como produto dos sistemas de vigilância (INCA, 2014).

Tendo em vista que o câncer é o líder causador de mortes em todo mundo e que segundo dados da OMS, esta patologia foi causa de 8,2 milhões de mortes no mundo, em 2012, buscam-se novos fármacos que sejam menos tóxicos, mais eficazes e específicos para o tratamento desta doença. Os tipos de câncer que causam maior número de mortes por ano são os próstata, pulmão, cólon, reto e de mama (WHO, 2014).

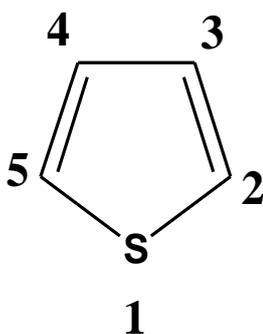
Portanto o desenvolvimento de novas formas terapêuticas eficazes com efeitos colaterais mínimos dos quimioterápicos e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes são os objetivos de estudo da comunidade científica na área de cancerologia. Neste contexto, os

sistemas nanoparticulados poliméricos podem contribuir para a terapêutica do câncer, já que esta patologia ainda apresenta limitações quanto ao seu tratamento, como por exemplo, os efeitos colaterais e as repetidas administrações.

2.4 Composto derivado do tiofeno

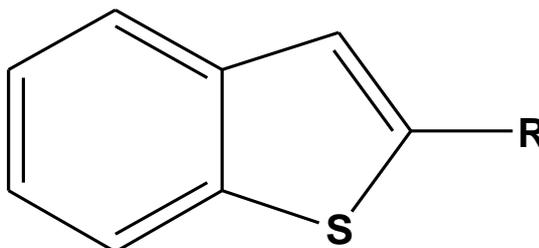
O tiofeno (**Esquema 2**) consiste em um anel heterocíclico aromático pentagonal, onde um carbono metilênico é substituído por um átomo de enxofre (ZHONGHAI, 2005).

Esquema 2. Estrutura do tiofeno



Segundo Fakhr et al. (2008), os compostos derivados do tiofeno, em especial os benzo[*b*]tiofeno 2-substituídos (**Esquema 3**) possuem grande variedade de propriedades farmacêuticas.

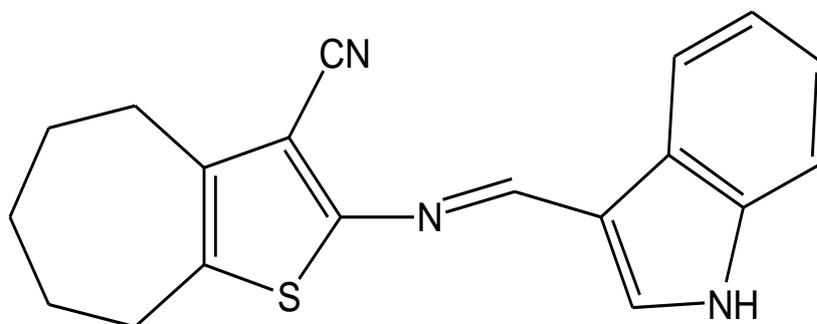
Esquema 3. Composto benzo[*b*]tiofeno 2-substituídos



Dentro das propriedades farmacêuticas, os tiofenos são relatados para exercer atividades antituberculares, anti-inflamatórios, antimicrobiano e ansiolítico. Um levantamento da literatura também revela que substituídos 2-amino tiofenos são inibidores potentes e seletivos da elastase de leucócitos humanos e adenosina A1 receptores de potenciais alostéricos, antifúngico e antitumoral. (SOUZA et al., 2012).

Souza e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antitumoral do composto 2-[(1*H*-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**Esquema 4**), através da análise de citotoxicidade pelo método do MTT, constataram que o SB44 exibia maior potencial de inibição do crescimento das linhagens tumorais humanas (100% para HT29 e NCI H-292; 97,5% para HEP) e que o composto tem fraca solubilidade em água. Este fato direciona o desenvolvimento de nanosistemas, como as nanocápsulas associadas ao SB44, para aumentar a biodisponibilidade, solubilidade do candidato a fármaco.

Esquema 4. Estrutura do candidato à fármaco 2-[(1*H*-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB44-LSVM) (Souza et al.,2012).



2.5 Solubilidade

O efeito terapêutico de um fármaco depende da sua biodisponibilidade e da solubilidade das suas moléculas. A solubilidade é um dos parâmetros mais importantes para alcançar a concentração desejada do fármaco na circulação sistêmica, para se obter uma resposta farmacológica. Atualmente, 40% dos novos fármacos possuem baixa solubilidade e permeabilidade na água (SAVJANI et al., 2012).

A solubilidade de um soluto é a quantidade máxima de soluto que se pode dissolver numa determinada quantidade de solvente ou de solução a uma determinada temperatura. Por outras palavras, a solubilidade pode também ser definida como a capacidade de uma substância formar uma solução com outra substância. A substância a ser dissolvida é chamada de soluto, e o líquido em que o soluto se dissolve é chamado de solvente, que conjuntamente formam uma solução (SAVJANI et al.,2012).

A baixa solubilidade de um fármaco é muitas vezes intimamente relacionada ao tamanho de partícula; quando o tamanho da partícula se torna menor, a razão área de superfície e volume aumenta. Uma maior área de superfície permite uma maior interação com o solvente que faz com que ocorra um aumento na solubilidade (SAVJANI et al.,2012).

A solubilidade de um fármaco é um parâmetro chave nos estudos de pré-formulação. Baseado em suas solubilidade , as substâncias podem ser classificadas em 7 níveis (**Tabela 1**)

Tabela 1 . Solubilidade das substâncias (adaptado de BRASIL, 2012).

Definição	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama da substância
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100
Pouco solúvel	De 100 a 1.000
Muito pouco solúvel	De 1.000 a 10.000
Praticamente insolúvel	Mais de 10.000

Na literatura tem-se destacado que os fármacos considerados de baixa solubilidade apresentam biodisponibilidade incompleta, em função da velocidade de dissolução ser mais lenta que o trânsito intestinal (DEZANI, 2010).

2.6 Validação de procedimentos analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade de determinações químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Os dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (US-FDA, 2001; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003 e ICH, 2010).

2.6.1 Parâmetros de desempenho

O objetivo do procedimento analítico deve ser claramente entendido uma vez que irá governar as características de validação que precisam ser avaliadas. Os parâmetros de desempenho do método, necessários avaliar, são:

- Especificidade e seletividade;
- Linearidade;
- Intervalo ;
- Limites detecção(sensibilidade);
- Limites de quantificação;
- Precisão;
- Exatidão;
- Robustez;

As características de validação são consideradas como as mais importantes para a validação de diferentes tipos de procedimentos analíticos. Esta lista deve ser considerada típica para os procedimentos de análise citados.

Além disso, a revalidação pode ser necessária nas seguintes circunstâncias: quando se verificam alterações na síntese do composto que constitui a amostra; aquando alterações na composição do produto acabado; e na presença de mudanças no procedimento analítico. O grau de revalidação necessário depende da natureza das alterações (FIGUEIREDO, 2012).

2.6.1.1 Especificidade e seletividade

A especificidade é considerada como a capacidade do método analítico em detectar o(s) analíto(s) de interesse na presença de outros componentes da matriz. (BRASIL, 2003).

A seletividade é a capacidade que o método possui de quantificar exclusivamente um composto específico independente da matriz da amostra e das suas impurezas. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analíto, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analíto, contendo estruturas semelhantes (BRASIL,2003).

A especificidade e a seletividade estão relacionadas com o evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico para um único analíto e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analítos com capacidade de distinção entre eles (FIGUEIREDO, 2012).

2.6.1.2 Linearidade da curva de calibração

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analíto na amostra, dentro

de um intervalo especificado. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003).

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa, e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) que vai ser utilizada o cálculo da concentração do analíto a ser determinado na amostra real.

O coeficiente de correlação (r) é um indicador da interdependência entre o sinal medido e as concentrações dos respectivos padrões. Contudo, o coeficiente de determinação (r^2) é que deve ser utilizado para traduzir a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais (BRASIL, 2003).

2.6.1.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico . Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (**Tabela 2**). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão , precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Tabela 2. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% de concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas serem controladas.
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130 % da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a

	dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e + 20% sobre o maior valor.
--	--

2.6.1.4 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor detectável. No caso de métodos instrumentais (Cromatografia Líquida de Alta eficiência, Cromatografia Gasosa, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha base (BRASIL, 2003). Pode ser determinado pela equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intervalo com o eixo do Y de , no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações de fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). Pode ser expresso pela equação:

$$LD = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intervalo com o eixo do Y de , no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações de fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10 :1(BRASIL, 2003)

2.6.1.6 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, sendo considerada a precisão intracorrida (repetibilidade) e a intercorridas (intermediária). A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. Já a precisão intermediária é concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003). Esse parâmetro pode ser expresso como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), devendo os valores ser inferiores a 5%.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

2.6.1.7 Exatidão

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo em relação ao valor verdadeiro. O parâmetro engloba a análise do fármaco, da forma farmacêutica e de impurezas, devendo ser realizada após determinação da linearidade e especificidade, com no mínimo 9 (nove) determinações, ou seja, triplicata de uma concentração baixa, média e alta do analito (BRASIL, 2003). A exatidão é expressa conforme a equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

2.6.1.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Preparar, caracterizar nanocápsulas biodegradáveis contendo candidato a fármaco antitumoral 2-[(1*H*-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB44-LSVM)

3.1.1 Objetivos Específicos

- Obter nanocápsulas contendo o derivado (SB44-LSVM);
- Realizar a caracterização físico-química dos nanosistemas desenvolvidos;
- Avaliar a estabilidade acelerada e em longo prazo dos nanosistemas;
- Validar método analítico por espectrofotometria UV para quantificação do princípio ativo;
- Realizar ensaio de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parte experimental

4.1.1 Preparação das nanopartículas

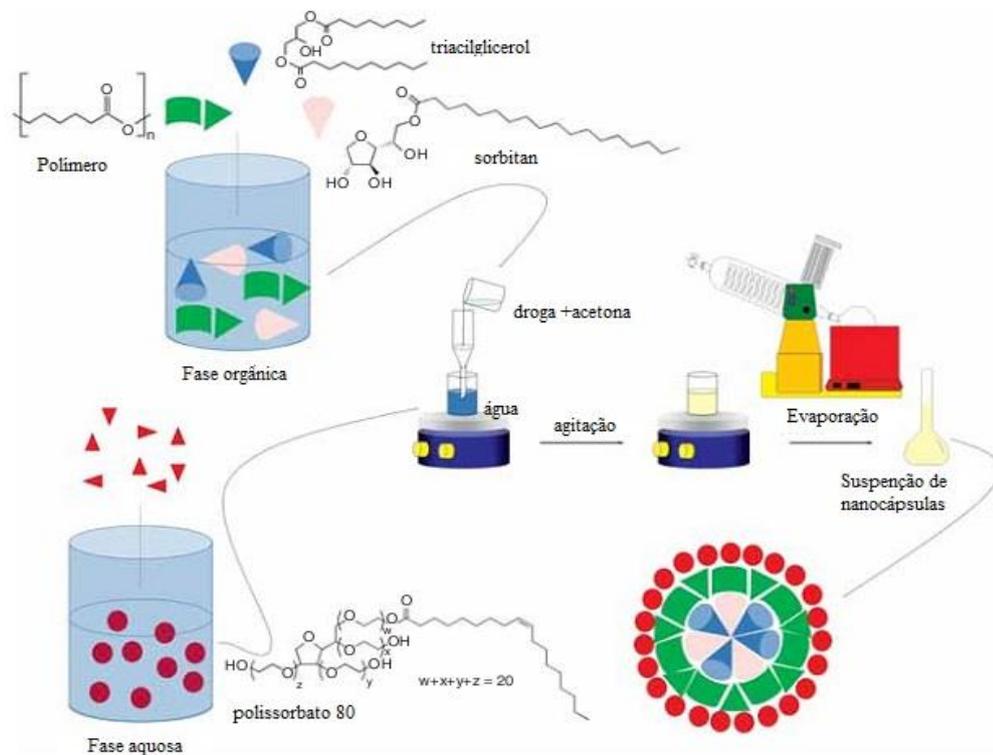
As nanopartículas utilizadas nesse trabalho de pesquisa foram preparadas segundo o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (FESSI et al., 1989). Para preparar as nanocápsulas poliméricas contendo o candidato a fármaco SB44-LSVM, têm-se uma mistura de uma fase orgânica e de uma fase aquosa.

A fase orgânica constituiu-se do polímero PCL, acetona (solvente orgânico), Span®80, fosfatidilcolina, miglyol® (triacilglicerol de cadeia longa). A fase aquosa foi composta pelo surfactante polissorbato (Tween® 80), Pluronic® F68 e água destilada. Após dissolução dos constituintes, verteu-se a fase orgânica na fase aquosa. A suspensão resultante foi mantida sob agitação durante determinado tempo, em seguida, os solventes foram evaporados em um rotaevaporador sob temperatura em torno de 40°C, em uma velocidade de 110 rpm e posteriormente as suspensões foram concentradas sob baixa pressão a fim de obter uma concentração de 10 mL.

Durante o desenvolvimento das formulações de nanocápsulas, foi estudada a influência da variação de alguns constituintes da formulação em seu diâmetro médio e o índice de polidispersão. Os parâmetros das formulações avaliados foram: variação nas concentrações do candidato a fármaco e nas proporções do polímero utilizado (PCL), variação do volume final de formulação. Todas as suspensões após suas formulações foram conservadas em temperatura de 4 °C.

As etapas do preparo das nanocápsulas estão ilustradas conforme a **(Figura 2)**. Inicialmente a solução orgânica é vertida na solução aquosa; posteriormente a suspensão obtida é mantida em agitação por alguns minutos; O solvente e o excesso de água são evaporados.

Figura 2. Modelo ilustrativo do mecanismo de montagem para produção de nanocápsulas poliméricas (Adaptado de POHLMANN et al., 2013)



4.1.2 Medidas de estabilidade química

A fim de verificar a estabilidade das formulações foi realizada a medida de pH das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo o fármaco após as preparações. A medida dos valores de pH das suspensões de nanocápsulas foi realizada utilizando-se um pHmêtro calibrado com soluções tampão padrão em pH 7,0 e 4,0.

4.1.3 Estabilidade dos sistemas

Os testes de estabilidade em longo prazo foram avaliados as condições das nanocápsulas logo após a fabricação e em intervalos de tempo regulares (0;7; 15;30; 45; 30; 60;90 e 180 dias).

4.1.4 Tamanho e distribuição da partícula

O tamanho médio e a distribuição das partículas foram determinados por espectroscopia de auto-correlação de fótons utilizando um analisador de partículas Zetanosizer® (Malvern), fixando o ângulo de dispersão em 90°C e as diluindo em água. Esses parâmetros foram analisados a 20°C (OLIVEIRA et al. , 2013)

4.1.5 Medidas de tamanho e polidispersão

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para determinação do tamanho médio das partículas (diâmetro hidrodinâmico) e polidispersão. As análises foram realizadas diluindo-se 1/10(v/v) as suspensões de nanocápsulas (com o candidato a fármaco) com água destilada (YEDOMON et al., 2013).

4.1.6 Teor e eficiência de encapsulação do fármaco

Determinou-se o teor do SB44-LSVM nas nanocápsulas utilizando-se o método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. As nanocápsulas preparadas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL inicialmente, com banho de ultrassom e posteriormente para balões volumétricos de 5 mL, com banho de ultrassom , o volume completado com água destilada. A absorbância foi realizada em um espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS™ 10S Bio) no comprimento de onda($\lambda_{\text{máx}} = 395 \text{ nm}$). Calculou-se o teor do SB44-LSVM pela equação da reta obtida pela construção de uma curva de calibração. As análises foram realizadas em triplicata e determinou-se a eficiência de encapsulação (EE%) do fármaco por meio da seguinte equação (FESSI et al.,2012):

$$E. E(\%) = \frac{\text{quantidade do fármaco encapsulado}}{\text{quantidade inicial do fármaco}} \times 100$$

4.1.7 Potencial Zeta

A carga de superfície eletrostática das partículas foi determinada a partir da mobilidade eletroforética através do analisador do potencial zeta no Zetanosizer® (Malvern) (OLIVEIRA et al ,2013).

4.1.8 Determinação da solubilidade do SB44-LSVM em meio aquoso

A solubilidade do SB44-LSVM em água foi realizada de acordo com BRASIL 2010. Para o estudo de solubilidade 1mg do SB44-LSVM foi pesado para 3 frascos com 5mL água destilada por 72h sob agitação. Após esse período foram coletadas alíquotas de 2000 µL de cada um dos frascos e colocadas em eppendorfs de 2 mL. Após as coletas, foram feitas as quantificações em espectrofotometria (Thermo Scientific GENESYS™ 10S Bio) ao λ :395nm.

4.1.9 Validação de metodologia analítica

4.1.9.1 Desenvolvimento de método analítico por espectrofotometria

O desenvolvimento do método analítico por espectrofotometria foi baseado em parâmetros como: linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação; preconizado pela ANVISA, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

4.1.9.2 Determinação do comprimento de onda

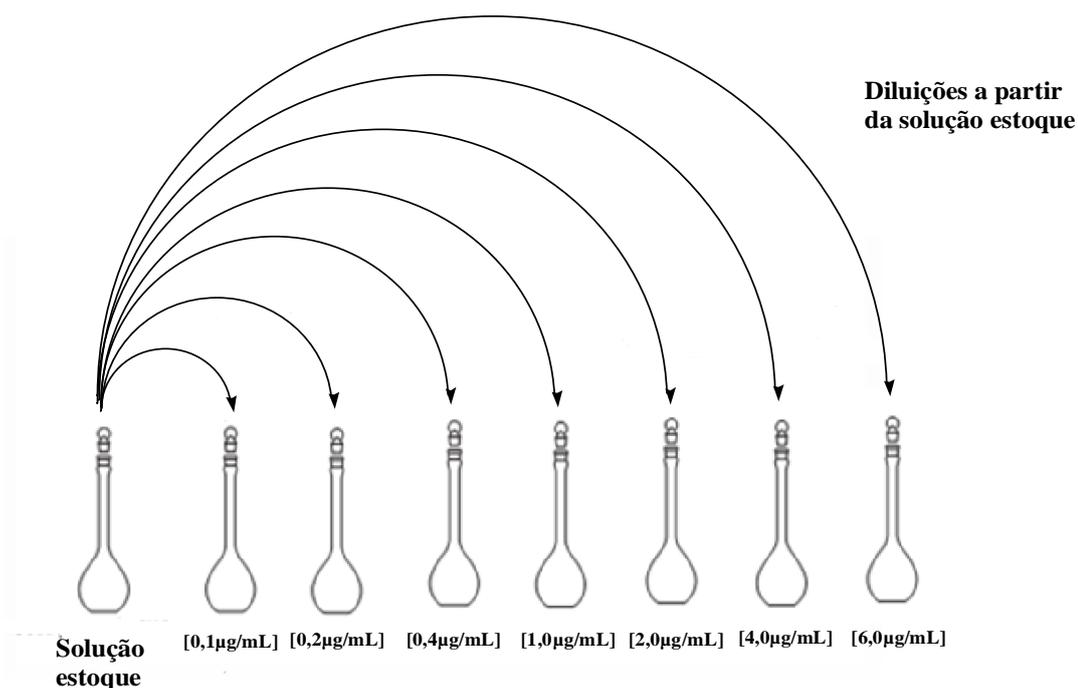
Com o intuito de se obter o melhor comprimento de onda de detecção para análise, foi realizada a varredura do candidato a fármaco diluído em álcool metílico, na concentração de $1,0\mu\text{g/mL}$ de SB44-LSVM, entre os comprimentos de onda de 100 a 900nm.

4.1.9.3 Linearidade

Para a construção das curvas analíticas de linearidade foram preparadas seis soluções estoque de SB44-LSVM em álcool metílico concentração de $0,1\text{mg/mL}$, a partir das quais, por meio de diluições seriadas em álcool metílico. A (**Figura 3**) mostra um esquema da sequência utilizando este modo de preparo. Foram obtidas 7 concentrações teóricas ($0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0$ e $6,0\mu\text{g/mL}$). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente no BioEstat® 5.0 para determinação do coeficiente de correlação através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os dados foram ainda submetidos à análise de variância (ANOVA).

A curva de calibração foi construída plotando-se os valores referentes às áreas dos picos no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações do analito no eixo das abscissas.

Figura 3. Diluições a partir de uma solução estoque (Adaptado de RIBANI et al.,2004).



4.1.9.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos espectros de absorção das amostras que contém o candidato a fármaco nas concentrações (0,1;0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL). E com amostra que não contém o candidato a fármaco, obtidos na região de 275-500 nm.

4.1.9.5 Precisão

O teste de precisão pode avaliar os critérios de repetibilidade e precisão intermediária .(BRASIL,2003) Neste estudo, a precisão foi avaliada quanto à precisão intracorrída (repetibilidade) e intercorridas (precisão intermediária) , sendo expressas como CV% .Em todos os ensaios foram investigados três níveis de concentração em triplicata, sendo uma baixa (0,4 µg.mL⁻¹), uma intermediária (1,0 µg.mL⁻¹) e uma alta (4,0 µg.mL⁻¹). O ensaio de repetibilidade foi realizado no mesmo dia e nas mesmas condições de análise, enquanto a precisão intercorridas foi realizada em intervalo de 24 h e com analistas diferentes.

4.1.9.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por intermédio de análises em três diferentes níveis de concentração (0,4 ;1;4 µg/ mL), em três repetições e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

4.1.9.7 Robustez

Neste parâmetro foram realizadas a análise de 3 repetições da solução do SB44-LSVM em dois diferentes fabricantes de álcool metílico, na concentração do ponto médio da curva (1 µg/ mL⁻¹). A fim de verificar a influência de pequenas variações ocasionadas pela marca do solvente de álcool metílico adquirido por diferentes fornecedores. Os fabricantes de álcool metílico utilizados foram Química Moderna e NEON (São Paulo).

4.1.9.8 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (a) e quantificação (b) foram determinados, matematicamente, a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. O cálculo para determinar os valores correspondentes ao LD e LQ, baseia-se no desvio padrão do residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva analítica, seguindo as relações:

$$LD = (D.P./I) \times 3 \text{ (a)}$$

$$LQ = (D.P./I) \times 10 \text{ (b)}$$

4.1.9.9 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de precisão intra, intercorridas e de reprodutibilidade foram submetidos ao teste *t* de Student para avaliar possíveis diferenças estatísticas. Os resultados obtidos no estudo de linearidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo software BioEstat® 5.0.

4.1.10 Análise de citotoxicidade

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antitumoral do derivado 2-[(1*H*-Indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-cicloepa[*b*]tiofeno-3-carbonitrila

(SB44-LSVM) foram realizados no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Para avaliar a viabilidade celular após tratamento com as nanocápsulas foi utilizado o método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). A cultura foi mantida a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. A atividade antiproliferativa de nanocápsulas carregadas com SB44-LSVM foi avaliada em células mononucleadas do sangue periférico e das linhagens (JURKAT, T47D, HEPG2). As células foram colocadas em placas a (1 x 10⁴ por poço) em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações de SB44-LSVM livre dissolvido em DMSO, e as amostras de nanocápsulas em água destilada. As células de controle foram incluídas e cultivadas em cada placa nas mesmas condições que as células tratadas. Após incubação (72 horas), 20 µl de solução de MTT (5 mg/ml) foi adicionado a cada poço e incubado durante 2 horas. Depois deste período, 100 µl do meio foi substituído por 130 µl de uma solução de dodecilsulfato de sódio em HCl 0,01 M para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi lida a 570 nm. A citotoxicidade foi expressa como a concentração inibição de 50% da proliferação celular (IC50), a qual é a percentagem de redução na viabilidade das células a partir da razão entre o número de células tratadas com diferentes NCs SB44-LSVM. As formulações de nanocápsulas e de células não tratadas (controle)

Acetona	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Fármaco	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Resultado	ppt	ppt	ppt	ppt	ppt	sppt							

*F: formulação; **ppt: precipitado; **sppt: sem precipitado

O estudo de pré-formulação foi utilizado para observar as interações intermoleculares entre o protótipo e os adjuvantes, sendo de grande utilidade nesse estudo à presença ou ausência de precipitação, possível indicador de estabilidade ou falta dela.

Observou-se que as melhores formulações foram as que continham o tensoativo Tween 80, a partir deste resultado foi conduzindo um estudo com a presença do protótipo nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,0 e 10mg do SB44-LSVM. Ao final da caracterização físico-química, avaliação do tamanho de partícula e distribuição granulométrica pode-se observar que a formulação com 5 mg do protótipo apresenta melhores parâmetros (**Tabela 4**).

Tabela 4. Características físico-químicas das nanocápsulas.

PARÂMETROS	FORMULAÇÕES				
	SB44-LSVM (mg)	2,5	5,0	7,0	10
Tamanho de partícula		151,8±15	117,6±3	137,2±3	127,6±4
PDI *		3±0,08	0,28±0,03	0,25±0,03	0,3±0,03
pH		6,36	6,31	6,48	5,74
Avaliação macroscópica e microscópica		Ausênciade ppt**, fluido e opalescente.	Ausênciappt**, fluido e opalescente.	Presença de ppt**, fluido e opalescente.	Presença de ppt**, fluido e opalescente.
Estabilidade		Estável	Estável	Instável	Instável
Taxa de encapsulação (%)		116±00,3	99.25±0,05	98.89±0,02	81,80±0,31
Potencial zeta		-	-27,2±0,56	-	-

*PDI: Índice de polidispersão; **ppt: precipitação

Os resultados da (**Tabela 4**), mostram que a taxa de encapsulação das NCs varia em função da quantidade de fármaco. A diminuição da taxa de encapsulação pode ser atribuída à formação de agregados insolúveis. Quando a concentração de um fármaco excede sua

solubilidade no óleo, utilizado como núcleo das nanocápsulas, pode ocorrer formação simultânea de nanocristais, os quais podem apresentar o mesmo raio hidrodinâmico das nanocápsulas formadas, gerando assim uma distribuição de tamanho estreita, que não se diferencia em relação à das nanocápsulas. Adicionalmente, ao longo do tempo, esses cristais podem sofrer um aumento de tamanho, precipitando (POHLMANN et al., 2014).

De acordo com a (**Tabela 4**), a eficiência de encapsulação variou entre 81,80 à 116 %. O SB44-LSVM com 5 mg, se mostrou que a taxa de associação obtida constitui um resultado significativo para o presente estudo, uma vez que a eficiência de encapsulação registrada foi $99,25 \pm 0,05$ %, demonstrando que a formulação desenvolvida é eficiente para associar o fármaco a estrutura polimérica. De acordo com Byun 2011, as nanopartículas com melhor eficiência de encapsulação, junto com outros parâmetros analisados são fatores determinantes para a escolha da melhor formulação.

Ademais, o método se mostrou eficiente na produção de partículas com diâmetro reduzido, pois, a formulação definida como ótima, atingiu o diâmetro de $117,6 \pm 3$ nm. Outros estudos encontraram nanocápsulas poliméricas com tamanhos próximos a 170nm o quais corroboram com os resultados encontrados (TORCHILIN et al., 2012; POHLMANN et al., 2014)

A relativa simplicidade de reprodução do método, as características do fármaco que foi encapsulado, a indicação para produção de nanocápsulas a partir de polímeros biodegradáveis, bem como, a possibilidade de controlar alguns parâmetros envolvidos na preparação (velocidade de homogeneização, regulação da temperatura, volume das fases aquosas ou orgânicas, etc), fizeram com que esse método fosse ideal para o presente trabalho.

A partir do valor de polidispersão determinado, é possível constatar a obtenção de um sistema monodisperso, com uma distribuição unimodal, uma vez que a literatura aponta que as formulações com valores abaixo de 0,3 apresentam esta característica (LIU et al., 2009). O índice de polidispersão também não apresentou uma variação significativa, demonstrando o caráter homogêneo das formulações obtidas (**Tabela 4**).

O Potencial zeta (ζ) é um indicador útil da carga superficial líquida da partícula e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões e emulsões coloidais. É definido como o potencial eletrocinético da fronteira hidrodinâmica do plano de cisalhamento de uma carga da partícula adjacente para uma superfície exposta em um líquido. Este

potencial reflete a carga efetiva nas partículas e se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Valores de potencial zeta superiores a + 30 mV ou inferiores a -30 mV conferem uma estabilidade a suspensão, uma vez que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força de repulsão supera a tendência natural à agregação das vesículas ou gotículas coloidais (WONGSAGONSUP et al., 2005).

O resultado apresentado na (**Tabela 4**) demonstra-se dentro de uma faixa de -27.2 (mV), segundo Fessi 2010 valores normalmente entre -25 e -30 mV, permitem prever uma ótima estabilidade coloidal, devido ao elevado consumo de energia. Visto que as nanopartículas contendo apenas o polímero PCL apresentam potencial zeta negativo devido à presença dos grupos carboxílicos terminais (MORA-HUERTAS E COLS., 2010). O valor do potencial zeta do SB44-LSVM está dentro da faixa de estabilidade para o parâmetro físico-químico e é considerada uma característica importante, este valor da carga não só permite a previsão da estabilidade na formulação, mas também pela interação das nanopartículas ao alvo biológico.

5.2 Avaliação da estabilidade em função do tempo

A avaliação da estabilidade de nanocarreadores é um estudo essencial, pois leva em consideração fatores a possível alteração proveniente de aditivos externos acrescentados à formulação e a interação química entre os fármacos veiculados com os componentes da formulação, que podem sofrer modificações com o tempo de estocagem cuja formulação venha a ser submetida (LEPELTIER et al., 2014)

Este estudo foi realizado avaliando o pH e os aspectos macroscópicos e microscópicos das nanocápsulas durante 6 meses (**Tabela 5**).

Tabela 5. Avaliação da estabilidade de nanocápsula polimérica com 5mg do (SB44-LSVM).

TEMPO (DIAS)	ASPECTOS MACROSCÓPICOS E MICROSCÓPICOS	pH
0	Ausência de ppt**. Fluido e opalescente	6,31
7	Ausência de ppt**. Fluido e opalescente	5,62
15	Ausência de ppt**. Fluido e opalescente	5,48
21	Ausência de ppt**. Fluido e opalescente	5,36
30	Presença de ppt**. Fluido e opalescente	5,35
60	Presença de ppt**. Fluido e opalescente	5,33
90	Presença de ppt**. Fluido e opalescente	5,31
180	Presença de ppt**. Fluido e opalescente	4,58

**ppt: precipitação

Observando os resultados obtidos na (**Tabela 5**), pode-se concluir que o nanossistema de veiculação desenvolvido apresenta uma estabilidade termodinâmica apropriada, permanecendo com aspectos macroscópicos e microscópicos dentro de mesma faixa por 1 mês no período avaliado. Outro dado interessante demonstrado na (**Tabela 5**) é o pH, que ao longo do tempo, a formulação de Poli(ϵ -caprolactona) reduz o valor de pH, que inicialmente é de 6,31 e chega à 4,58. Essas suspensões de nanocápsulas preparadas com PCL apresentaram redução dos valores de pH, este comportamento tem sido atribuído à degradação do polímero, devido à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, quanto à hidrólise, em função do tempo, promovida pela relaxamento das cadeias poliméricas.(SCHAFFAZICK et al., 2003;FESSI et al., 2010).

Desta forma, a formulação apresentou uma estabilidade apropriada e um alto grau de reprodutibilidade na sua produção. Portanto, o uso das nanopartículas poliméricas contendo o SB44-LSVM pode ser aprovado para continuidade dos estudos.

5.3 Determinação da solubilidade do SB44-LSVM em meio aquoso

Os fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a dissolução o fator limitante para a absorção dos mesmos. A solubilidade de um fármaco e seu comportamento em água é uma importante característica, porque a água é o principal constituinte de toda matéria viva (MELO, 2007).

Tabela 6. Solubilidade do SB44-LSVM em meio aquoso.

Meio	Solubilidade ($\mu\text{g/mL}$)
Água	2.4273

A solubilidade do SB44-LSVM em água, mostrada na (**Tabela 6**), está de acordo com resultados previamente obtidos em nosso laboratório.

De acordo com os termos descritivos de solubilidade na (**Tabela 6**) e seus significados da Farmacopeia Brasileira. A baixa solubilidade do SB44-LSVM indica que o candidato à fármaco é “Muito pouco solúvel” em água (BRASIL, 2012).

Dessa maneira, a problemática relacionada à baixa solubilidade do SB44-LSVM em água estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novos carreadores, como é o caso das nanocápsulas, que representam eficientes sistemas de liberação controlada, além de melhorarem a solubilidade do fármaco e a sua distribuição nos alvos biológicos (SAVJANI et al., 2012).

5.4 Validação do método analítico

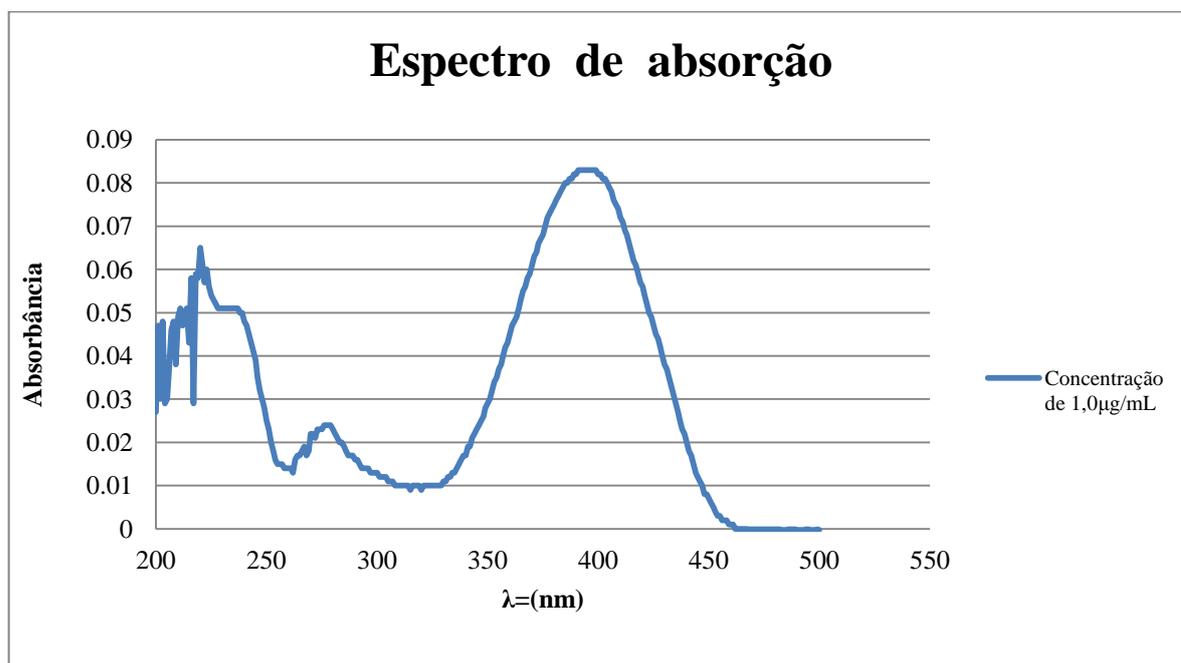
O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método

atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

5.4.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

Através da varredura espectrofotométrica na faixa de 200 a 550nm, utilizando uma solução de SB44-LSVM 1,0 μ g/mL, determinou-se o comprimento de onda $\lambda = 395$ nm, onde o candidato à fármaco apresentou pico de absorção máxima. Este valor de λ foi considerado adequado para detecção do fármaco, utilizando um espectrofotômetro com detector UV-VIS no desenvolvimento e validação do método analítico, conforme o (**Gráfico 1**).

Gráfico 1. Espectro de varredura do SB44-LSVM observado o comprimento de onda de 395nm correspondendo à absorção máxima do fármaco



5.4.2 Linearidade

A partir das absorbâncias obtidas nas 7 diferentes concentrações do fármaco, em triplicata mostrados na (**Tabela 7**) foi construído uma curva de calibração de concentração

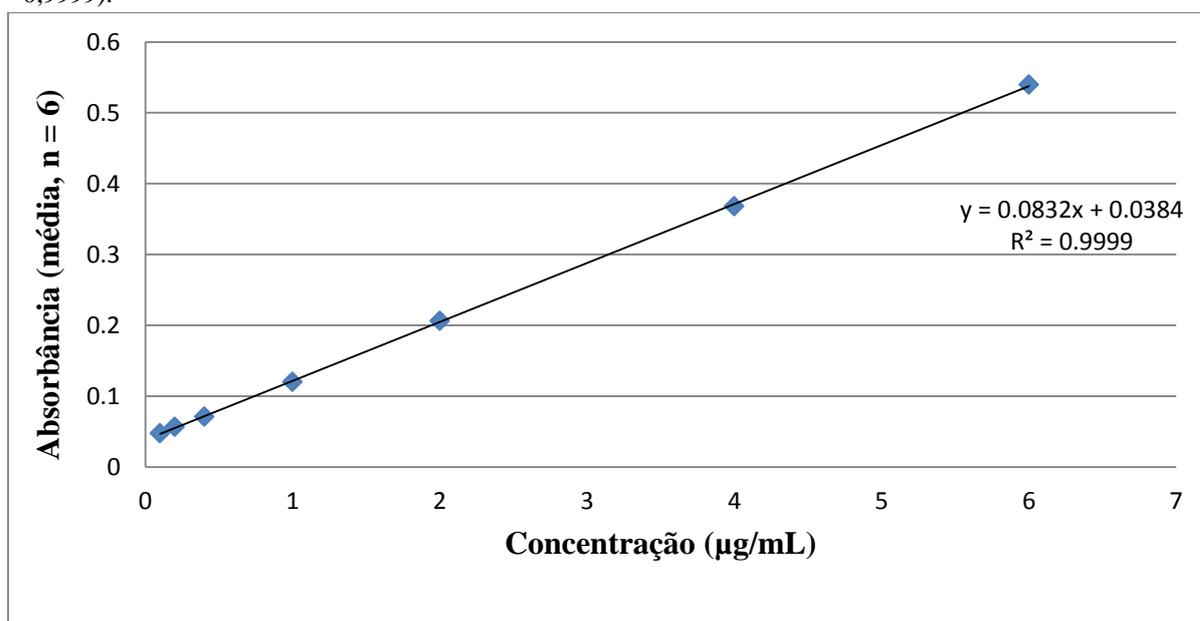
versus absorvância média (**Gráfico 2**) e obteve-se a equação da reta pela regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados, bem como o seu correspondente coeficiente de correlação linear (r). A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de correlação de 0.9999, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta $y = 0.0832x + 0.0384$.

Tabela 7. Dados utilizados na construção da curva de calibração do SB44-LSVM

Concentração (µg/mL)	abs 1	abs 2	abs 3	abs 4	abs 5	abs 6	Média	Desvpad	C.V %
0,1	0,049	0,048	0,048	0,046	0,047	0,047	0,0475	0,001049	0,022080
0,2	0,059	0,058	0,055	0,055	0,055	0,057	0,0565	0,001761	0,031163
0,4	0,075	0,074	0,065	0,064	0,074	0,073	0,0708	0,004956	0,069974
1	0,131	0,129	0,115	0,105	0,126	0,114	0,1202	0,010237	0,085310
2	0,216	0,219	0,190	0,186	0,215	0,212	0,2063	0,014431	0,069942
4	0,400	0,391	0,330	0,327	0,385	0,376	0,3681	0,031720	0,086157
6	0,595	0,583	0,471	0,48	0,557	0,552	0,5396	0,052283	0,096879

Abs = absorvância; DesvPad= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação

Gráfico2. Curva de calibração do SB44-LSVM (média, n=6).λ: 395 nm. Equação da reta: $y = 0.0832x + 0.0384$ (r =0,9999).



O método espectrofotométrico, nas condições adotadas no estudo, mostrou-se em concordância com os critérios estabelecidos pela RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, que preconiza valor mínimo de $r = 0,99$ (BRASIL, 2003). Os coeficientes de determinação (r^2) e o coeficiente de correlação (r) demonstram que nos intervalos de concentração estudados os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos fármacos na amostra e com uma excelente correlação devido ao r ser maior que 0,99.

Os dados foram ainda submetidos à análise de variância conforme a (**Tabela 8**), a qual demonstrou que a regressão linear foi altamente significativa e bem como não foi evidenciado a falta de ajustes do modelo, uma vez que, os valores de F calculados foram menores do que os valores de F críticos no nível de 95% de confiança. Portanto, o método analítico desenvolvido possui faixa de linearidade entre as concentrações do SB44-LSVM de 0,1 e 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

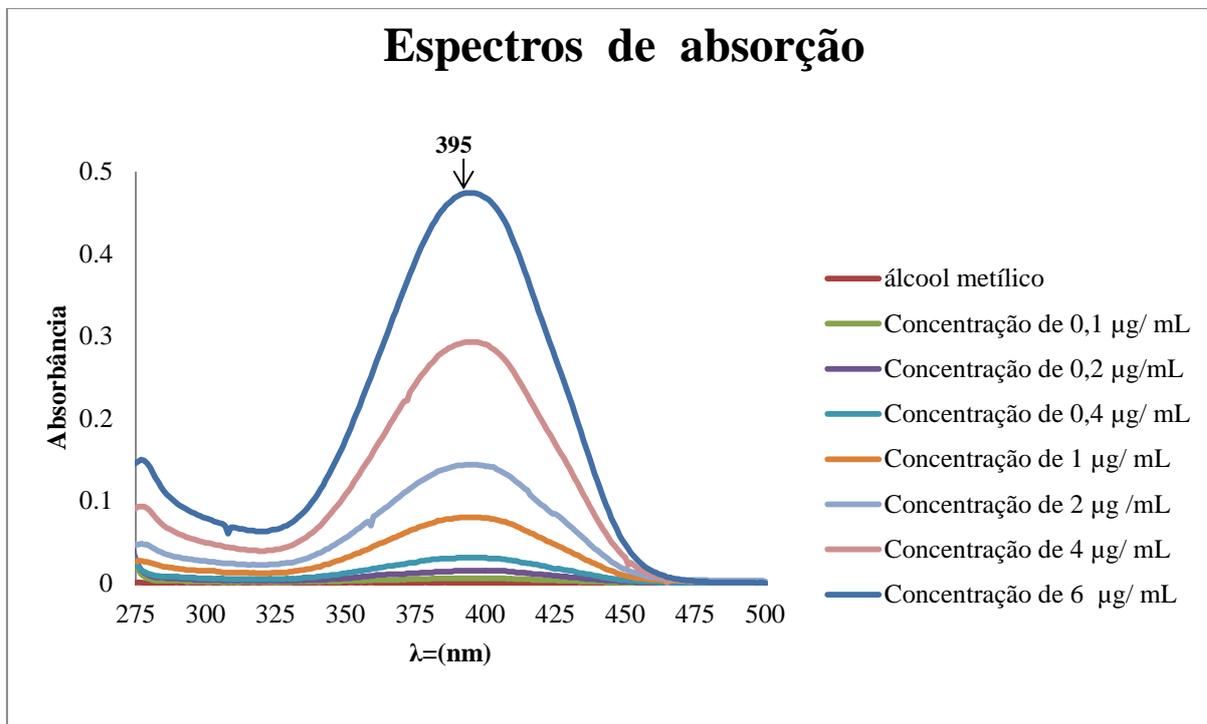
Tabela 8. Resultados da Análise de Variância-ANOVA um critério ($p < 0,05$).

FONTES DE VARIACÃO	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	F_{crítico}
Tratamentos	5	0,009	0,002	0.0585	2,4495
Erro	42	1,347	0,032		
Total	47	1,356			

5.4.3 Especificidade

A metodologia desenvolvida demonstrou ser seletiva, uma vez que no comprimento de onda encontrado para o fármaco (395nm) não foram evidenciados picos interferentes relacionados às amostras de SB44-LSVM. Este fato é evidenciado ao comparar os espectros das amostras contendo o fármaco com os espectros das amostras sem o fármaco, conforme demonstrado no (**Gráfico 3**).

Gráfico 3. Espectros de absorção do SB44-LSVM em concentrações de (0,1;0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL) em álcool metílico.



5.4.4 Precisão

A (Tabela 9), expressa os valores obtidos durante a determinação da precisão do método. Foram determinadas a repetibilidade e a precisão intermediária (intra-corrída). Conforme a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003), a repetibilidade do método foi avaliada a partir de três concentrações (baixa, média e alta) da curva de calibração (0,4; 1,0; 4,0 µg/ mL).

Tabela 9. Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Analista	Dia	Concentração	Concentração	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
		nominal (µg.mL ⁻¹)	obtida (média ± DP; n=3)		
Analista 1	Dia 1	0,4	0,3998 ± 0,0011	1,61	99,96
		1,0		1,92	97,67

			0,9767 ±0,0023		
		4,0	3,9294 ± 0,0040	1,10	98,23
		0,4	0,4158 ± 0,0034	0,47	103,95
	Dia 2	1,0	0,9847± 0,0028	2,39	98,47
		4,0	3.9214 ±0.0132	3,64	98,03
		0,4	0,4118± 0,0079	0,79	102,95
	Dia 1	1,0	1,0488 ± 0,0045	0,45	104,88
		4,0	4,1818 ±0,0104	1,04	104,54
Analista 2		0,4	0,4198± 0,0028	3,93	104,95
	Dia 2	1,0	0,9567 ± 0,0000	0,00	95,67
		4,0	4,1578± 0,0005	0,15	103,94

DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação

Os resultados obtidos no estudo de precisão intra e intercorridas demonstraram a precisão do método. Em ambos os ensaios foram observados valores de coeficiente de variação (CV) inferiores a 5%. Os resultados obtidos para cada concentração investigada nos dois ensaios foram ainda submetidos ao teste *t* de Student para avaliar uma possível diferença estatística. Como demonstrado na (**Tabela 10**), não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores determinados no ensaio intra-corrída daqueles determinados em diferentes dias e com diferentes analistas. O resultado da análise estatística confirma a análise da precisão do método para os diferentes ensaios.

Tabela 10. Resultados obtidos para os ensaios de repetibilidade, precisão intermediária (n = 3) e Teste *t* Student.

Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	Precisão intracorrída		Precisão intercorrídas		Teste <i>t</i> de Student (p)
	Média \pm DP ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	CV (%)	Média \pm DP ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)	CV (%)	
0,4	0,0721 \pm 0.0007	0,97	0,0725 \pm 0,0011	1,62	0,3700
1,0	0,1226 \pm 0,0042	3,45	0,1188 \pm 0,0011	0,99	0,3377
4,0	0,3758 \pm 0.0148	3,95	0,3748 \pm 0,0134	1,71	0,1710

5.4.5 Exatidão

O resultado das análises em triplicata das 3 concentrações (baixa, média e alta) do SB44-LSVM, conforme pode ser observado na (**Tabela 11**), mostra que o método em análise é considerado exato, visto que se encontram dentro do limite estabelecido pela RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, que é de 80 a 120% (BRASIL, 2003).

Tabela 11. Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método

Parâmetro	Concentração		Exatidão (%)
	Nominal ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	Obtida (média \pm DP; n=3)	
Exatidão	0,4	0,3998 \pm 0,0070	99,96

	1,0	0,9767±0,0192	97,67
	4,0	3,9294 ± 0,0040	98,23

DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação

5.4.6 Robustez

Ao observar os resultados apresentados na (**Tabela 12**), constata-se que o método apresenta robustez intrínseca, uma vez que ao analisar amostras na concentração de 1,0µg/mL em triplicata e em diferentes condições (diferentes fabricantes do solvente), as respostas mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela legislação.

Tabela 12. Resultados do ensaio para verificação da robustez do método

Modificações	Solvente metanol (F1)	Solvente metanol (F2)
Concentração nominal (µg.mL ⁻¹)	1,0	1,0
Concentração obtida (média ± DP; n=3)	0,1253 ± 0.0005	0,1256±0.0011
Precisão (%)	0,46	0,91
Exatidão (%)	104.48	104.88

F1= fabricante 1 (Química Moderna);F2= fabricante 2(NEON); DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação

5.4.7 Limite de detecção e quantificação

Os resultados encontrados par limite de detecção, que representa a menor quantidade que o método é capaz de identificar foi de $0,0281\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e para limite de quantificação, que é a menor quantidade que o método pode quantificar na amostra foi de $0,09639\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Conforme a (Tabela 13).

Tabela 13. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para cada método desenvolvido.

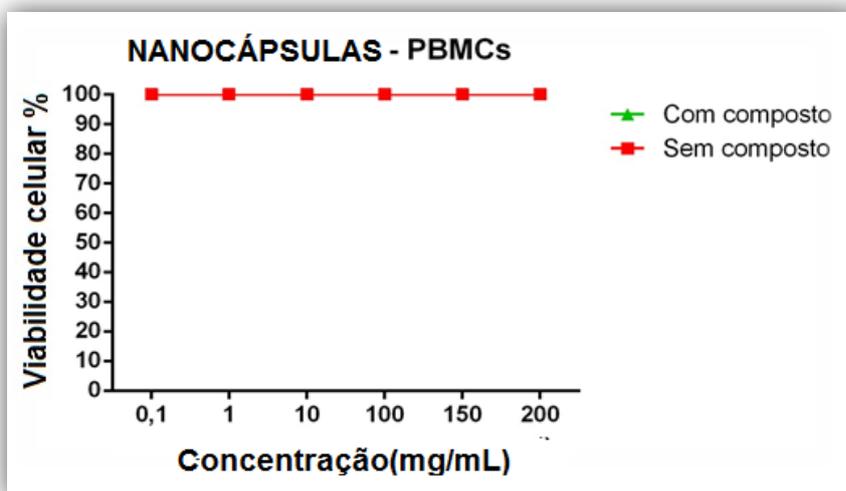
Fármaco	LD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
SB44-LSVM	0,0281	0,09639

5.5 Atividade antitumoral

5.5.1 Testes em células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) de voluntários saudáveis

Após a realização de três experimentos independentes, o composto SB44-LSVM encapsulado, bem como as nanocápsulas sem compostos apresentaram um IC-50 acima de 200mg/ml, isto é, a dose necessária para inibir 50% da proliferação das células saudáveis está acima de 200mg/ml. O composto não encapsulado apresentou um IC-50 de 37,7 mg/ml em PBMCs (Gráfico 4).

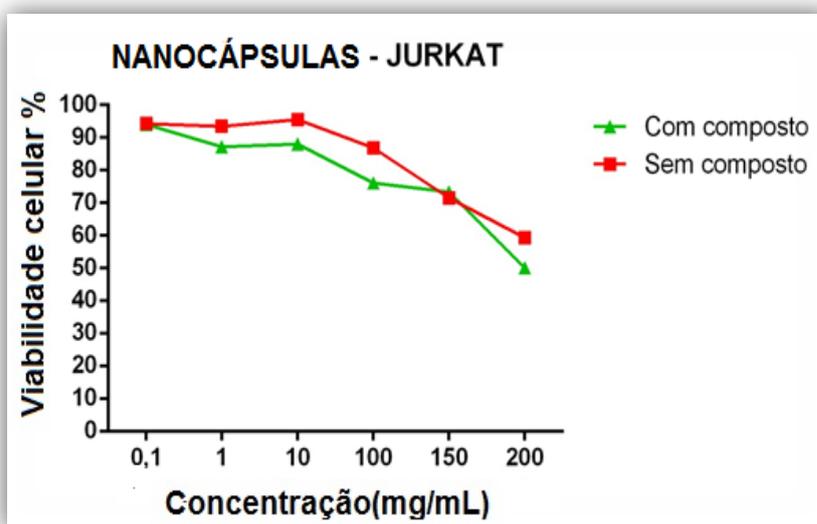
Gráfico 4. Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM em PBMCs.



5.5.2 Testes na linhagem JURKAT (leucemia de células T)

Após a realização de três experimentos independentes, o composto SB44-LSVM encapsulado, bem como as nanocápsulas sem compostos apresentaram um IC-50 acima de 200mg/ml, isto é, a dose necessária para inibir 50% da proliferação das células tumorais está acima de 200mg/ml (**Gráfico 5**).

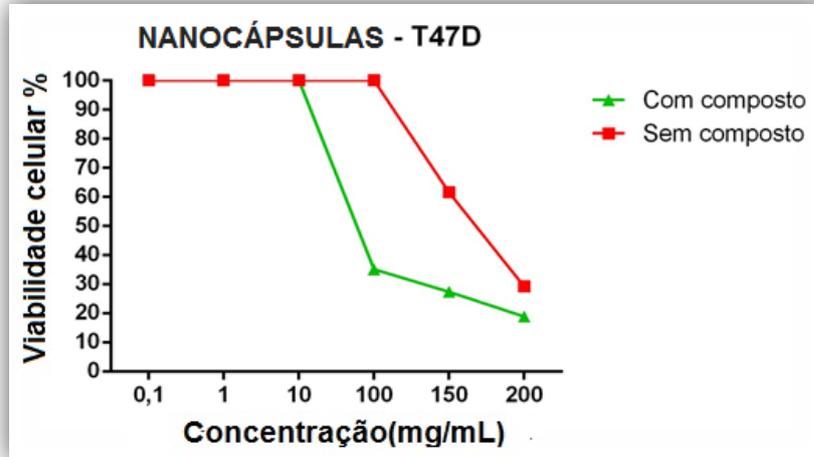
Gráfico 5. Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM na linhagem JURKAT..



5.5.3 Testes na linhagem T47D (câncer de mama metastático)

Após a realização de dois experimentos independentes, o composto SB44-LSVM encapsulado apresentou maior citotoxicidade em células tumorais da mama que as NCs sem compostos, onde o primeiro apresentou um IC-50 de 29,61mg/ml, e o NCs sem composto 199,88mg/ml (**Gráfico 6**).

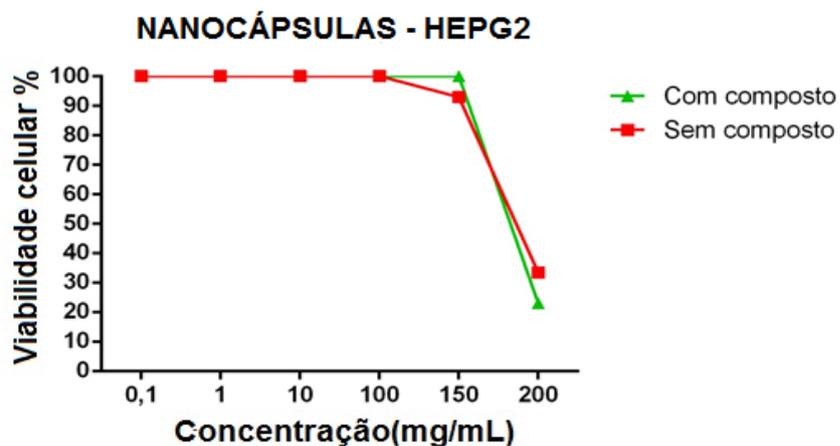
Gráfico 6. Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM na linhagem T47D.



5.5.4 Testes na linhagem HEPG2 (hepatocarcinoma)

Após a realização de dois experimentos independentes, o composto SB44-LSVM encapsulado apresentou um pequeno aumento na citotoxicidade em células tumorais de hepatocarcinoma que as NCs sem compostos, onde o primeiro apresentou um IC-50 de 192,97mg/ml, e a NCs sem composto 196,78mg/ml. Esses resultados sugerem que novos testes com doses entre 150mg/ml e 200mg/ml sejam realizados para um cálculo mais preciso do IC-50 de ambas as nanocápsulas (**Gráfico 7**).

Gráfico 7. Atividade antiproliferativa de formulação de NCs-SB44-LSVM e NCs sem o SB44-LSVM na linhagem HEPG2.



6 CONCLUSÕES

O método de deposição interfacial de polímeros pré-formados se mostrou adequado para obtenção de sistema nanoestruturado contendo SB44-LSVM. A caracterização físico-química revelou tamanho médio de 117,6 nm, polidispersividade de 0,280, potencial zeta de -27.2 mV, e eficiência de encapsulação 99.25%.

A solubilidade do candidato à fármaco SB44-LSVM, permite concluir que pode ser classificado como fármaco muito pouco solúvel em meio aquoso. Contudo neste estudo a associação de nanopartículas com o candidato à fármaco apresentou melhores resultados em relação a sua estabilidade, logo conclui-se que as nanopartículas conferem maior proteção.

O método analítico espectrofotométrico proposto e validado para o SB44-LSVM em 395 nm, foi simples, rápido, preciso, exato, reprodutível e que pode ser aplicado com segurança e confiabilidade. A análise de variância foi utilizada como ferramenta para análise da linearidade do método.

Quanto a atividade antitumoral do composto SB44-LSVM e encapsulado os resultados preliminares apresentados sugerem que a incorporação realmente modula a atividade da molécula, porém são necessários novos testes *in vivo* para comprovar essa modulação e avaliar a atividade do protótipo depois de encapsulado.

7 PERSPECTIVAS

- Aperfeiçoar os nanosistemas para que permitam a obtenção de nanocápsulas ainda mais potentes e avaliar sua atividade antitumoral.
- Realizar a cinética de liberação *in vitro* dos sistemas.
- Testar os nanosistemas com SB44-LSVM com a *Allium cepa*.
- Realizar ensaio de citotoxicidade *in vitro* do SB44-LSVM livre.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL,U. et al. Is nanotechnology a boon for oral drug delivery?; **Drug Discovery Today** ,v. 0, n. 0,2014.

ASAI, T et al. Nanoparticle-Mediated Delivery of Anticancer Agents to Tumor Angiogenic Vessels, **Biol. Pharm. Bull**, v. 35, n. 11, 2012.

BARKALINA, N. et al. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10,n 5 ,p 921-938, 2014.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carries for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization. **Journal Pharm. Science**, v. 82,n.11 , p.1069 - 1079, 1993.

BERNARDI, A. et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. **International Journal of Nanomedicine** , v. 8, p. 711-729, 2013.

BHARALI, D. J. et al. Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. Pharmaceutical Research Institute at Albany College of Pharmacy, Rensselaer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p.1-7, 2009.

BOULAIZ, H. et al.Nanomedicine: Application Areas and Development Prospects. **Int. J. Mol. Sci**, v. 12, p. 3303-3321, 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, volume 1, 5ª ed. Brasília 546p., 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, volume 2, 5ª ed. Brasília 546p., 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. B823f **Formulário nacional da farmacopeia brasileira** 2.ed. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Organização Pan-americana de saúde**. Nanotecnologia: A interação célula e nanopartículas. Brasília, p. 89-102, 2011.

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BULCÃO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences** , v. 132, p. 162-176, 2013.

BULCÃO, R. P. et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 167-177, 2014.

BYUN Y. et al. Formulation and characterization of a -tocopherol loaded poly-epsilon-caprolactone (PCL) nanoparticles. **LWT-Food Science and Technology** v.44, p24-28, 2011.

CARRARO, T. C. M. et al. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e biológica de nanopartículas poliméricas contendo Anfotericina B**. Dissertação de mestrado (Universidade Estadual do Centro-Oeste), Guarapuava, p 73, 2013.

CERIZE, N. N. P. **Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 amino levulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**. Tese de Doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto – SP, p. 48, 2012.

CLAUDIA, E.M.; OLIVER, G.; FESSI, H. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study; **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v 80, 235–239, 2012

CHEN, J. et al. Gold Nanocages as Photothermal Transducers for Cancer Treatment. **Small**, v. 6, n. 7, 2010.

DEZANI, A. B. **Avaliação in vitro da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina.** Aplicações na classificação biofarmacêutica 2010.140f.Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêutica) -USP, São Paulo, 140p. 2010.

DURÁN, N.et al.**Polymer nanoparticles containing amutraz and/or fluazuron,production method,formulation and uses.**Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.WO2014094087 (A1)-26 junho 2014

DURÁN, N.et al.,Nanocrystal technologies in pharmaceuticals. **Quim. Nova**,v.33,p.151-159,2010.

FAKHR, I. M. I. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[*b*]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1718-25, 2008.

FALLEIROS, J. P. B.; BRANDIL, A. L.; FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. **Nucleus**, v. 8, n. 1, 2011.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 :Estimated Cancer incidence and mortality and prevalence worldwide. Lyon, France: **IARC**, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>.Acesso em: 13 jan. 2014.

FERREIRA,D.M. **Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu éster derivado (8-ALA) aplicados na Eletroquimioterapia e Terapia Fotodinâmica contra câncer de pele.** Tese de doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto,74 p. 2012.

FESSI, H. et al.Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.** v. 55, p. 1-4, 1989.

FIEL, L. A. et al;. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, p. 233, 2014.

FIEL, L. A. et al. A strategy to estimate the intrinsic flux of a poorly-water soluble substance for comparison with its release from lipid-core nanocapsules. **Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 441, p. 716-724, 2014

FIGUEIREDO, T. M.P. **Validação de métodos analíticos-Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar**. Dissertação de mestrado(Qiímica)-Universidade de Coimbra,p.104,2012.

FINNEY, D. J. Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve. **Cambridge: Cambridge University Press**, p. 318, 1952.

FRIEDRICH R.B. et al. Nanoencapsulation of Tacrolimus in Lipid-Core Nanocapsules Showed Similar Immunosuppressive Activity After Oral and Intraperitoneal Administrations. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, p. 1599-1609, 2014.

GRILLO, R; et al . Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1645-1651, 2011.

GUTERRES, S. et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 951, 2014.

GUTERRES,S.S. et al. Poly(D-,L-lactide) nanocapsule containing diclofenac: I. formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**,v.13,p.57-63,1996.

KUMARI, A., YADAV, S.K., YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

JABIR, N. R. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, n.7, p. 4391-4408,2012.

LEPELTIER, et al., Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices, **Adv. Drug Deliv.**v.71,p.86-97, 2014.

LIU, H.; CHEN, J. Indomethacin-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation and characterization. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology** , n 63, p 207-216,2009.

LYRA M.A.M.et al.Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos.**Latin American Journal of Pharmacy(formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)**. v26 p.784-93, 2007.

INCA-INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 124p., 2014

ICH-International Conference on Harmonisation ; Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/), 2010.

ICH- International Conference on harmonization. Validation of Analytical Procedures: Methodology. **FDA Federal Register**, v. 62, p. 27463, 1997.

INMETRO-Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial ;**Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos** , DOQ-CGCRE-008, 2003

MELO, N.F.S.et al. Preparação e caracterização inicial de complexode inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.Rev. Ciênc. **Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.35-44, 2007.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MILADI,K.et al. Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications; **International Journal of Pharmaceutics**; v.445 ,p181– 195, 2013.

MOSMANN,T.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**.n.16,p.55-63.1983.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI,H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 385, p. 113-142, 2010.

OLIVEIRA,A. M.;JAGER,E.;JAGER,A.; Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward; **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**;v.436, p1092–1102, 2013

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. CID – 0: classificação internacional de doenças para oncologia. 2. ed. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo**: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. CID – 0: classificação internacional de doenças para oncologia. 3. ed. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo**: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. CID-10: classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. 10. ed. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo**, ,v.32007.

PARVEEN, S.;MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomed-Nanotechnol.**, v. 8, p. 147-166, 2012.

PIMENTEL,M.F. et al. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol.**Pan-American Journal of Aquatic Sciences** n.4: p.363-368, 2009.

PISSINATE, K. et al. Pyrimethamine-loaded lipid-core nanocapsules to improve drug efficacy for the treatment of toxoplasmosis. **Parasitology Research**, v. 113, p. 555-564, 2014.

POHLMANN, A. R.;JORNADA, D.D.; GUTERRES, S. S.**Polymeric finasteride nanoparticle, aqueous composition containing same, composition for the treatment of alopecia, method for preparing said composition, and use thereof**. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul - Ufrgs. WO2014032151 (A1)-06 março 2014.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery** , v. 10, p. 623-638, 2013.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RACHID L.; AHMAD, B.; MOHAMED, E.; Polymer encapsulation of inorganic nanoparticles for biomedical applications, **International Journal of Pharmaceutics**; v.458, p.230–241, 2013.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova** , vol.27, p. 771-780, 2014.

SAVJANI, K. T. et al. Drug Solubility : Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**. v.0, p. 10, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERREZ, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SEAL, S.; KARN, B.; Safety aspects of nanotechnology based activity; **Safety Science**. v.63, p.217-225, 2014.

SHUTAVA, T.G.; PATTEKARI, P.P.; TORCHILIN, V.P. Architectural layer-by-layer assembly of drug nanocapsules with PEGylated polyelectrolytes; **The Royal Society of Chemistry** , Soft Matter , v.8 , p.9418–9427, 2012.

SOUZA, B. C. C. et al. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, p. 221-236, 2012.

SPECTRUM. Laboratories, Inc. manufactures separation products for **R&D scale** through pilot and production scale biotech and pharmaceutical applications. Disponível em: <<http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html>> . Acesso em 19 mar. 2014

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

US-FDA -United States Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.

VILLANOVA, J. C.et al. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WHO. World Health Organization. Cancer. **Fact sheet** n. 297. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 13 mar. 2014

WONGSAGONSUP, R.et al Zeta potential (ζ) analysis for the determination of protein content in rice flour. **Starch/Starke**, v. 57,p. 25-21.2005.

WRIGHT,J; et al.Deliver on a promise :Effective treatment of cancer requires getting the drugs precisely to the target. Enter the nanoparticle.; **Nature** , vol 509, 2014

YEDOMON,B.;FESSI,H.; CHARCOSSET, C.; Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticlesby desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production; **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**;v.85,p.398–405,2013

YURGEL, V. C. ; OLIVEIRA, CATIÚSCIA P. ; BEGNINI, K. R. et al ; Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine** , p. 1583-1591, 2014.

ZHI,M.W.,XIN,D.,G.LI,J.Z; Solvent mediated microstructures and release behavior of insulin from pH-sensitive nanoparticles; **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.v.94, p206–212,2012

ZHONGHAI, W. Experimental and theoretical studies on organic attachment to silicon surfaces. 2005. 203 p. **Tese de Doutorado**- Departamento de Química, Universidade Nacional de Singapura.p 203,2005.