

Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais
Universidade Federal de Itajubá

FELIPE FARINATE LOPES DE SOUZA

Nanopartículas de sílica silanizadas contendo doxorrubicina: um potencial sistema aplicado ao tratamento do câncer

Orientador: Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique da Silveira.

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Química Medicinal

Instituição associada: Universidade Federal de Itajubá - Campus Itabira

Itabira-MG

Dezembro de 2020

FELIPE FARINATE LOPES DE SOUZA

Nanopartículas de sílica silanizadas contendo doxorrubicina: um potencial sistema aplicado ao tratamento do câncer

Relatório da dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Química submetido ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais pela Universidade Federal de Itajubá.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique da Silveira.

Itabira-MG
Dezembro de 2020

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me incentivaram e forneceram a base indispensável para vida que são a educação, dignidade e honestidade. Também dedico este trabalho aos meus irmãos, sobrinho e amigos que me deram forças para seguir nos momentos mais difíceis.

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas. ” (Ayrton Senna)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo amor incondicional e pela iluminação nos caminhos trilhados diante desta oportunidade em minha vida.

Ao professor Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares, pela disponibilidade, apoio, dedicação e ensinamentos constantes em toda orientação desta dissertação. Muito obrigado pelo voto de confiança e aprendizagem.

Ao professor Dr. Carlos Henrique da Silveira, por toda contribuição durante o trabalho realizado.

À minha família, em especial meus pais pelo apoio e compreensão em todos momentos. Aos meus irmãos que sempre torceram por mim e ao meu sobrinho que é a alegria da nossa família.

A toda equipe do laboratório de Bioengenharia da UNIFEI pela amizade, em especial a Bianca Ferreira por todo auxílio nos trabalhos desde o início.

A todos meus amigos pelo incentivo, carinho, companhia e lealdade. Em especial o Benedito e Fernando por toda contribuição em discussões construtivas acerca do conteúdo e também ao Tainan, Pedro, Isaac e Torres pelo apoio psicológico diário durante a pós-graduação.

Aos professores e funcionários gerais da UNIFEI e UFMG por todo conhecimento e parcerias nas análises de caracterização da amostra.

Ao professor Dr. Marcos R. A. Alves e a pós doutoranda Dra. Renata Salgado Fernandes por terem aceitado o convite para compor a banca da comissão examinadora.

A Universidade Federal de Itajubá por proporcionar esse momento.

RESUMO

O presente trabalho objetivou a síntese e funcionalização de nanopartículas de sílica Santa Bárbara 16 (SBA-16), visando utilizá-las para incorporar e modular a cinética de liberação do fármaco doxorrubicina (DOXO), um potente fármaco antitumoral, buscando dessa maneira diminuir efeitos adversos e aumentar a eficiência no tratamento do câncer. A matriz de sílica SBA-16 foi sintetizada pelo método sol-gel utilizando como agente precursor o tetraetilortossilicato e o surfactante Pluronic F127. O material obtido foi em seguida funcionalizado com o 3-aminopropiltriétoxissilano. Posteriormente, o sistema preparado foi caracterizado físico-química e morfologicamente e os resultados revelaram que as metodologias empregadas permitiram a obtenção de nanopartículas de sílica de matriz mesoporosa (SBA-16) com tamanho médio de 296 ± 29 nm e potencial Zeta $-32,23 \pm -2,5$ mV e também matrizes SBA-16 funcionalizadas com grupos alcoxissilanos (SBA-16-APTES) com tamanho médio de 312 ± 31 nm e potencial Zeta de $-8,3 \pm -1,3$ mV. Para estudar a taxa de incorporação do fármaco doxorrubicina nas matrizes, foi desenvolvido e validado um método de quantificação baseado na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). O método proposto revelou boa seletividade e especificidade para quantificação de doxorrubicina. Além disso, o método alcançou níveis de precisão, exatidão, robustez e linearidade preconizadas pela RDC n° 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na faixa de 1 a 250 $\mu\text{g/mL}$. O estudo da taxa de incorporação, revelou que a matriz SBA-16 permitiu uma taxa média de incorporação de 92,77%. Por outro lado, a matriz funcionalizada, SBA-16-APTES obteve um desempenho menor, alcançando uma taxa média de 66,52%. O estudo da cinética de liberação do fármaco incorporado em ambas as matrizes foi realizado em fluido corpóreo simulado (SBF), com pH igual a 4,5 e 7,4. Os dados obtidos revelaram que ambas as matrizes foram capazes de permitir a liberação sustentada do fármaco quando o estudo foi realizado no meio onde o pH do meio era igual a 4,5, alcançando cerca de 26,50 % de liberação, após 696 horas na matriz SBA-16 e cerca de 70,00%, após 696h na SBA-16-APTES. Por outro lado, em pH fisiológico ambos os sistemas revelaram um comportamento diferente, apresentando um perfil de liberação mais tímido, alcançando valores máximos de 10,00% em 696 h e 32,76% em 72h para as matrizes SBA-16 e SBA-16-APTES, respectivamente. A partir de todos os dados obtidos, o sistema SBA-16-APTES pode ser considerado um potencial sistema a ser aplicado na entrega controlada de doxorrubicina em pacientes oncológicos.

ABSTRACT

The present work aimed to synthesize and functionalize silica Santa Barbara-16 (SBA-16) nanoparticles to study the incorporation rate and release kinetics of doxorubicin (DOXO), a potent antitumoral agent in order to reduce side effects and enhance efficiency for cancer treatment. The matrix of silica SBA-16 was synthesized through the sol-gel method, using tetraethyl orthosilicate as a precursor with the surfactant Pluronic® F-127. The product was functionalized with 3-aminopropyl triethoxysilane and characterized physiochemically and morphologically. The results revealed that the methodology applied yielded silica nanoparticles with a mesoporous matrix (SBA-16), with an average size of 296 ± 29 nm and zeta potential of -32.23 ± 2.5 mV and SBA-16 matrices functionalized with alkoxy silane groups (SBA-16-APTES) with the average size of 312 ± 31 nm and zeta potential of -8.3 ± 1.3 mV. HPLC-DAD was used to evaluate the doxorubicin load rate and release kinetics profile in the obtained matrices. The developed method presented parameters preconized by RDC n° 166 standard from the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA), with a linear range from 1 to 250 $\mu\text{g/mL}$. The mean adsorption rate for SBA-16 was 92.77 % and 66.52 % for SBA-16-APTES. The release kinetics was studied using simulated body fluid (SBF) for both matrices at pH 4.5 and 7.4. Both matrices showed a controlled release profile for pH 4.5, reaching 26.50 %, after 696 hours for the SBA-16 matrices and 70.0 % after 696 hours for SBA-16-APTES. On the other hand, in physiological pH, the release rates were significantly reduced, reaching only 10.00 %, even after 696 hours for the SBA-16 matrix and 32.76 % after 72 hours for SBA-16-APTES. From all obtained results, SBA-16-APTES showed better and promising results for controlled release applications and may be considered a potential cancer treatment system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças entre tipos de tumores.....	17
Figura 2: Esquema demonstrativo do desenvolvimento da metástase.....	18
Figura 3: Figura representativa das administrações convencional e com liberação controlada de fármacos.....	20
Figura 4: Fórmula estrutural do TEOS.....	23
Figura 5: Esquema da estrutura da superfície da sílica. (1) grupo silanols isolado (2) grupo geminal (3) ponte de siloxano.....	26
Figura 6: Estrutura cúbica do SBA-16.....	27
Figura 7: Estrutura química da doxorubicina.....	27
Figura 8: Esquema representativo das reações químicas envolvidas na síntese do SBA-16.....	36
Figura 9: Funcionalização do SBA-16 com APTES.....	36
Figura 10: Espectro na região do infravermelho para SBA-16 e SBA-16-APTES.....	43
Figura 11: Análise termogravimétrica para SBA-16 e SBA-16-APTES.....	45
Figura 12: Imagens MET das amostras constituídas por: (A) SBA-16. Em (B) EELS para SBA-16-APTES e (C) análise de pedido feito pelo software Image J®.....	47
Figura 13: Análise de adsorção/dessorção de nitrogênio (método BET) para amostras de SBA-16 e SBA-16-APTES.....	48
Figura 14: Distribuição do tamanho, tamanho médio e índice de polidispersividade das amostras SBA-16 e SBA-16-APTES.....	50
Figura 15: Cromatogramas de DOXO obtidos na concentração de 180 µg mL ⁻¹ pela técnica de CLAE-DAD. (A) Cromatograma espectral 2D onde o detalhamento dos diferentes comprimentos estudado foi avaliado (450 a 510 nm). (B) Cromatograma convencional (absorbância versus tempo de retenção). (C) Cromatograma espectral 3D de DOXO.....	52
Figura 16: Curva analítica de calibração da DOXO	53
Figura 17: Seletividade para DOXO em SFB.....	54
Figura 18: Perfis de liberação de DOXO em diferentes meios para SBA-16.....	64
Figura 19: Perfis de liberação de DOXO em diferentes meios para SBA-16-APTES.....	64
Figura 20: Possíveis interações intermoleculares hidrofóbicas entre a DOXO e SBA-16-APTES.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados estruturais da SBA-16 e SBA-16-APTES.....	49
Tabela 2: Valores do tratamento estatístico para DOXO em CLAE.....	53
Tabela 3: Precisão intra-dia do método para quantificação da DOXO por HPLC.....	55
Tabela 4: Precisão inter-dia do método para quantificação da DOXO por HPLC.....	56
Tabela 5: Exatidão do método para quantificação da DOXO por HPLC.....	57
Tabela 6: Concentrações e desvio padrão analisados para o branco.....	57
Tabela 7: Variação da concentração da fase móvel para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO por HPLC.....	59
Tabela 8: Variação do pH da fase móvel para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO por HPLC.....	60
Tabela 9: Variação da temperatura da coluna para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO por HPLC.....	61
Tabela 10: Porcentagem de incorporação da DOXO em diferentes massas de sílica.....	62
Tabela 11: Porcentagem máxima de DOXO liberada em SBA-16 e SBA-16-APTES.....	65
Tabela 12: Parâmetros cinéticos obtidos aplicando o modelo de Ritger & Peppas nas liberações controladas de DOXO.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A - Quantidade do fármaco presente na matriz
ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária
APTES - 3-aminopropiltriétoxissilano
AS - Área superficial
 C_{em} - Concentração experimental média
 C_t - Concentração real
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CV - Coeficiente de variação
D - Coeficiente de difusão
DAD - Detector de arranjos de diodos
DLS - Espalhamento dinâmico da luz
DH - Diâmetro hidrodinâmico
DP - Desvio padrão
DPR - Desvio padrão relativo
DP' - Diâmetro do poro
DOXO - Doxorrubicina
EC - Comissão européia
EELS - Espectroscopia de perda de energia de elétrons
EPR - Permeabilidade e retenção aumentada
EROS - Espécies reativas de oxigênio
FAPAS - Esquema de avaliação de desempenho de análises de alimentos
FDA - Food and drug administration
FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho
INCA - Instituto nacional do câncer
INMETRO - Instituto nacional de metrologia, qualidade e tecnologia
IUPAC - União internacional de química pura e aplicada
K - Constante de proporcionalidade
 K_H - Constante da taxa de liberação do modelo de Higuchi
LD - Limite de detecção
LGC - Laboratório do governo químico - Reino Unido
LQ - Limite de quantificação

MAPK - Proteína quinase ativada por mitogênio
MDR - Multirresistência a fármacos
MSNs - Nanopartículas de sílica mesoporosa
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
 M_t - Quantidade de massa acumulada do fármaco
 M_∞ - Quantidade de massa liberada no infinito
 n - Número de medições
 n - Informações do mecanismo de liberação
 N_2 - Nitrogênio
NIST - Instituto nacional de padrões e tecnologia
pH - Potencial hidrogeniônico
PDI - Índice de polidispersividade
 Q_t - Quantidade total de fármaco liberado
 r - Coeficiente de correlação
 r^2 - Coeficiente de determinação
RDC - Resolução da diretoria colegiada
RPM - Rotação por minuto
 s - Estimativa do desvio padrão da resposta
 S - Inclinação da curva de calibração
 S' - Solubilidade do fármaco no meio
SFB - Soro fetal bovino
SBA-16 - Santa Bárbara 16
 t - tempo
TEOS - Tetraetilortossilicato
TG - Análise termogravimétrica
USA - Estados Unidos da América
USP - Universidade Estadual de São Paulo
VP - Volume do poro
 X - Média aritmética
 X_i - Valor individual de uma medição
%R - Percentual de recuperação
 ϵ - porosidade de matriz

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1- Câncer.....	16
2.2- Doxorubicina	20
2.3- Sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos para o tratamento de câncer.....	22
2.4- Nanopartículas de sílica e suas aplicações no tratamento de câncer.....	25
2.5- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	28
3- JUSTIFICATIVA	34
4- OBJETIVOS.....	35
4.1- Objetivo geral	35
4.2- Objetivos específicos.....	35
5- MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1- Síntese e funcionalização.....	35
5.2- Caracterização Físico-química e morfológica do material obtido.....	37
5.2.1- Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)	37
5.2.2- Análise Térmica.....	37
5.2.3- Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	38
5.2.4- Adsorção/dessorção de N ₂	38
5.2.5- Espalhamento dinâmico da LUZ (DLS) e avaliação do potencial zeta.....	38
5.3- Validação do método analítico em CLAE-DAD.....	39
5.4- Estudo da taxa de incorporação.....	41
5.5- Estudo da cinética de liberação do fármaco.....	41
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1- Caracterização dos materiais obtidos.....	42
6.1.1 - Caracterização química.....	43
6.1.2. Caracterizações morfológica e física.....	46
6.2- Validação do método analítico em CLAE-DAD.....	51
6.2.1- Linearidade.....	52
6.2.2- Seletividade.....	53
6.2.3- Precisão.....	54

6.2.4- Exatidão.....	56
6.2.5- Limite de detecção e limite de quantificação.....	57
6.2.6- Robustez.....	58
6.3- Estudo da taxa de incorporação da doxorubicina em SBA-16 e SBA-16- APTES.....	62
6.4- Estudo da cinética de liberação.....	63
7- Discussão geral.....	68
8- Conclusão.....	69
9- Perspectivas.....	70
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXO I.....	80
ANEXO II.....	94

1- INTRODUÇÃO

Atualmente, os nanomateriais com capacidade de armazenar, transportar e entregar fármacos, vêm sendo cada vez mais objetos de estudos, dentre eles, encontram-se os óxidos de silício mesoporosos. Esses materiais apresentam diversas vantagens como a elevada área superficial, diâmetro de poros bem definidos, espessuras largas nas paredes e uma alta estabilidade térmica. Idealmente, eles buscam melhorar a estabilidade, absorção e concentração terapêutica do fármaco no tecido alvo, bem como permitir a liberação controlada e de longo prazo no local de destino (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Dentre a ampla diversidade dos materiais mesoporosos desenvolvidos nos últimos anos, destaca-se o material nomeado de Santa Bárbara 16 (do inglês *santa barbara amorphous 16 - SBA-16*), a qual possui uma estrutura cúbica de poros 3D sendo que cada mesoporo desta nanoestrutura é conectado a oito vizinhos próximos, a partir de aberturas, formando um sistema multidirecional, o que facilita o transporte de diversos fármacos (FULVIO, 2009). Diante dessas características, nos últimos anos, observa-se na literatura um grande aumento do número de trabalhos científicos baseados no uso de nanopartículas de sílica em diferentes aplicações biomédicas na qual se destacam importantes trabalhos relacionados ao tratamento do câncer (INCA, 2012).

A quimioterapia vem sendo utilizada para o tratamento de pacientes com câncer, porém, o desenvolvimento de resistência a alguns quimioterápicos permanece como um relevante obstáculo à eficácia terapêutica desses compostos. A doxorubicina (DOXO), neste interim, é um fármaco de relevante atividade antineoplásica e de ampla utilização nesse campo. No entanto, muitas aplicações clínicas vêm sendo limitadas já que o uso do fármaco está associado a efeitos adversos graves como a cardiotoxicidade e a supressão da medula óssea (YILDIZ, et al., 2017). Buscando contornar estes desafios, a pesquisa de sistemas carreadores de fármacos baseados em nanotecnologia têm sido objeto de muitos trabalhos publicados nas últimas décadas onde a redução de efeitos adversos, associados ao aumento da concentração dos agentes terapêuticos no tecido alvo vêm sendo o projeto de muitos cientistas (INCA, 2017).

Embora a DOXO seja atualmente um dos fármacos quimioterápicos mais eficientes para o tratamento do câncer de mama, foi demonstrado que em alguns pacientes ela apresenta falhas em induzir a morte celular por meio de apoptose, e

parada do ciclo celular, caracterizando a ocorrência de mecanismos de resistência ao fármaco. Estudos sugerem que os eventos de resistência podem ocorrer a partir da ativação da via de proteína quinase ativada por mitogênio (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*-MAPK) regulada por um sinal extracelular, em um esforço para proteger células tumorais. Buscando contornar este problema, o encapsulamento da DOXO surge como uma alternativa que pode inibir a ativação da via citada, uma vez que a mesma utiliza um receptor de superfície celular e o encapsulamento pode permitir a entrega do fármaco diretamente ao citosol das células tumorais, minimizando a interação supracitada que é mais provável de acontecer com o fármaco livre (ABRAMS, et al., 2010).

Nesse sentido, no ano de 1995 o Doxil, uma formulação lipossomal PEGuilada contendo DOXO foi aprovada para uso clínico pelo FDA. Os lipossomas, vesículas esféricas microscópicas constituídas por membrana com uma ou mais bicamada de fosfolípidos orientados concentricamente em torno de um compartimento aquoso é também um exemplo de sistema nanoestruturado, o qual já possui aceitação na parte clínica. O Doxil vêm sendo objeto de estudos como sendo inclusive uma alternativa para redução da resistência da DOXO em pacientes (KANWAL, et al., 2018).

Embora a formulação apresente uma importante diminuição da cardiotoxicidade, o medicamento não demonstra significativa melhoria nos índices terapêutico e ainda não foi capaz de reduzir de forma significativa muitos dos efeitos secundários indesejáveis presentes na formulação convencional como: rubor, falta de ar durante a infusão intravenosa, eritrodisestesia palmo-plantar, sensibilidade e descamação da pele das mãos e dos pés (ROCHA, 2014).

Diante destes problemas e também devido ao alto custo final do medicamento, se faz necessário o desenvolvimento de sistemas carreadores de menor custo, que também possam permitir contornar os problemas de resistência farmacológica e ainda promoverem de forma efetiva uma melhoria nos índices terapêuticos. Neste sentido, o presente trabalho possui o objetivo de propor um sistema carreador alternativo para a entrega controlada de DOXO, baseado em sílica silanizada com APTES como um potencial sistema terapêutico contra o câncer.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Câncer

O câncer é uma palavra que vem do grego *karkínos*, o que quer dizer caranguejo. Tal nome se deve à semelhança entre as pernas do crustáceo e os vasos de tumores que infiltram nos tecidos sadios do corpo. É uma doença antiga, uma vez que compromete o homem há mais de três mil anos, sendo detectado, por exemplo, em múmias egípcias (INCA, 2015).

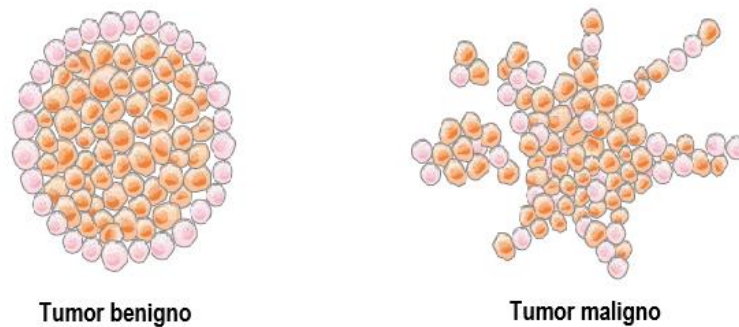
O termo câncer é o nome utilizado para descrever diversas doenças diferentes entre si, porém com uma característica em comum. Ao contrário das células normais que formam tecidos e órgãos do corpo humano e são capazes de se multiplicar por um processo contínuo e natural, ou seja, crescem, multiplicam-se e morrem de maneira ordenada, as células cancerosas são diferentes, ao invés de morrerem, continuam crescendo descontroladamente, formando então outras células anormais (INCA, 2017).

O tipo de crescimento celular pode ser classificado de duas maneiras, controlado e não controlado. Causado por estímulos fisiológicos ou patológicos, o crescimento controlado ocorre por um aumento localizado e autolimitado do número de células de tecidos normais que formam o organismo, nesse caso o efeito é reversível após o término dos estímulos que o provocam. Podemos citar como exemplo desse crescimento celular a hiperplasia, a metaplasia e a displasia. Já no crescimento não controlado, o crescimento é incontrolável mesmo após o término dos estímulos que o provocaram, tendo então uma massa anormal de tecido. As neoplasias, que na prática são denominados tumores, correspondem a essa forma de crescimento celular não controlada (INCA, 2017).

As neoplasias podem ser classificadas como malignas ou benignas (Figura 1). As neoplasias malignas apresentam células diferentes do tecido normal, crescimento desorganizado, possuindo maior autonomia, sendo então capazes de invadirem os tecidos vizinhos, provocando a metástase, podendo ser resistente ao tratamento e causando a morte do hospedeiro. Já as neoplasias benignas apresentam células semelhantes do tecido normal, crescimento de forma organizada, frequentemente lento, expansivo e apresentando limites nítidos. Embora não invadam tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos próximos. Como exemplos de tumores benignos

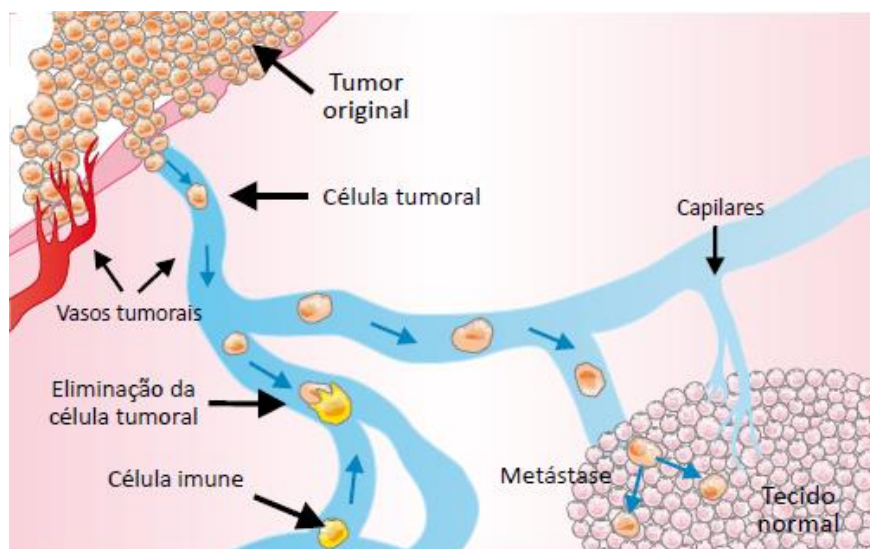
têm-se: o lipoma (tecido gorduroso), mioma (tecido muscular liso) e adenoma (glândulas) (INCA, 2017).

Figura 1: Diferenças entre tipos de tumores. Adaptado de INCA, 2017.



O primeiro estágio em que o câncer pode ser classificado é o câncer não invasivo ou carcinoma *in situ* (não se aplica aos cânceres do sistema sanguíneo). Nesse estágio as células cancerosas ainda não se espalharam para outras camadas do órgão de origem, estando somente na camada de tecido na qual se desenvolveram. Nesse caso temos que a maioria dos cânceres são curáveis, caso sejam tratados antes de progredir para a fase de câncer invasivo. Já no câncer invasivo, as células cancerosas invadem outras camadas celulares do órgão, invadem a corrente sanguínea ou linfática e têm a capacidade de se espalharem para outras partes do corpo. Essa capacidade de invasão e espalhamento que os tumores malignos apresentam é conhecida como metástase (Figura 2), sendo essa a principal característica e a maior causa de mortes em pacientes com câncer (GUPTA, 2006; LADEIRA, 2016).

Figura 2: Esquema demonstrativo do desenvolvimento da metástase. Adaptado de INCA, 2017.



Em 2012, ocorreram 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes no mundo. Os índices de mortalidade foram 53% para o sexo masculino e 47% para o sexo feminino. Foi possível observar, que as maiores taxas de incidência foram em países desenvolvidos (Europa Ocidental, América do Norte, Japão, Coreia do Sul, Nova Zelândia e Austrália). Taxas intermediárias são vistas na América do Sul, América Central, Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático. Entretanto, as menores taxas são em grande parte da África do Sul e Oeste da Ásia, o que pode estar relacionado com o sistema de saúde precário destes locais tanto quanto a alimentação. Nos países desenvolvidos, são predominantes os tipos de câncer relacionados à urbanização e ao desenvolvimento, que são: pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto. Já nos países de médio e baixo desenvolvimento, as ocorrências de tipos de câncer estão associadas às infecções, que são: colo do útero, estômago, esôfago e fígado (FERLAY, 2015).

Estima-se que nos anos de 2018 e 2019 no Brasil, houve uma ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. Excluindo nessa estimativa o câncer de pele não melanoma, que correspondem cerca de 170 mil novos casos, para cada ano. Os cânceres de mama em mulheres (60 mil) e próstata (68 mil) em homens foi estimado como os mais frequentes. Com exceção do câncer de pele, os tipos de cânceres mais incidentes em mulheres segundo a pesquisa foram: mama (29,5%),

intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%). Já nos homens: próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%), foram os principais (INCA, 2017).

A divisão da incidência por região geográfica mostra que as regiões sul e sudeste concentram 70% da ocorrência de novos casos de câncer, sendo que apenas na região sudeste encontra-se quase metade dessa incidência. No entanto, existe uma grande variação nos tipos de câncer predominantes nessas diferentes regiões do Brasil. Nas regiões sul e sudeste predominam os cânceres de mama feminina e próstata, bem como os de pulmão e intestino. Na região centro-oeste, apesar de semelhante incorpora em seu perfil os cânceres do colo do útero e de estômago entre os mais incidentes. Nas regiões norte e nordeste, embora apresentem também os cânceres de mama feminina e próstata entre os principais, observa-se também uma grande incidência dos cânceres do colo do útero e estômago, sendo esses de grande impacto nessa população. A região norte é a única onde as taxas dos cânceres de mama e do colo do útero são equivalentes entre as mulheres (INCA, 2017).

A dificuldade do diagnóstico precoce da doença é um dos principais problemas, pois as células que foram alteradas só podem ser identificadas na circulação sanguínea quando estão em altas concentrações (JAIN, 2007; PAVON, 2007). Vale também ressaltar que os métodos de imagens disponíveis atuais não conseguem diagnosticar as células anormais, dificultando então uma intervenção hábil para o sucesso na identificação e cura da doença (COSTA; SILVA, 2017).

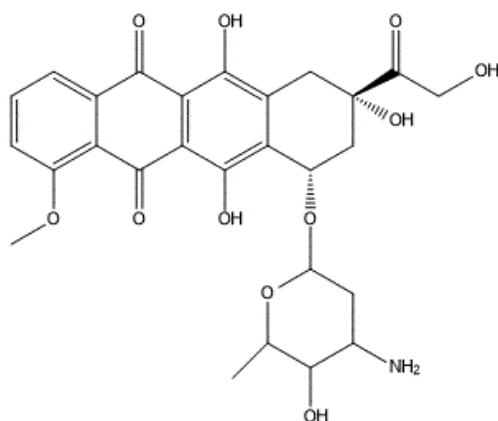
Para o tratamento dessa doença, existem três formas principais: a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Para tratamentos quimioterápicos, utilizam medicamentos que se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo seu espalhamento. Na radioterapia utilizam radiações ionizantes, que são um tipo de energia para destruir ou impedir que as células do tumor aumentem, esse tratamento é feito no local específico. Já a cirurgia oncológica consiste na retirada do tumor a partir de operações, quando indicada, sua intenção é remover totalmente o tumor. Nesse último caso, caso a doença esteja em fase inicial, o câncer pode ser controlado, ou até mesmo curado. Esses tratamentos podem ser utilizados em conjunto, variando apenas quanto a suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e a melhor sequência de sua administração (INCA, 2010; INCA, 2011).

No entanto, esses tratamentos apresentam falhas como: resistências aos medicamentos, questões farmacológicas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e de toxicidade adepta a efeitos adversos, que na maioria das vezes diminuem a qualidade de vida dos pacientes (INCA, 2017). Então, diante desses problemas, estratégias utilizando o princípio da nanotecnologia tem permitido o direcionamento do fármaco para as células tumorais, fazendo com que as células saudáveis não sejam alvo de sua ação (PAVON, 2007).

2.2- Doxorrubicina

Muitos agentes quimioterápicos têm sido amplamente utilizados, dentre eles o cloridrato de doxorrubicina, que é um quimioterápico antineoplásico e pertence à família das antraciclinas, desenvolvido no início dos anos de 1960, a partir das espécies de *Streptomyces peucetii* var *Caesius* (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). Atualmente ela é extremamente utilizada no tratamento de leucemia, linfomas, câncer de mama, entre outros (LAI, 2010)

Figura 3: Estrutura química da doxorrubicina. (Autor).



A partir da Figura 3, considere DOXO como cloridrato de doxorrubicina. Embora tenha sido mostrada em estudos experimentais e na parte clínica a eficiência desse medicamento no tratamento de câncer, os mecanismos de ação da DOXO ainda não estão bem estabelecidos (HOSONO, 2010; LANDMAN, 2010). Sua atividade tumoricida pode ocorrer por vários mecanismos. Entretanto, acredita-se que a inibição

da enzima Topoisomerase II é a principal delas, ocorrendo pelo impedimento da replicação do DNA, desencadeando então alguns mecanismos de morte celular (TEWEY; ROWE; YANG, 1984; PEREGO, 2012). Além disso, a DOXO causa o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por interação com Fe^{+3} , produzindo radicais livres de hidroxila, o que leva ao aumento na geração de estresse oxidativo que pode gerar danos no DNA (ROCHETTE, 2015) e ativação de mecanismos apoptóticos, aumentando a afinidade da proteína p53 com o DNA, bem como a ativação das caspases (CHANG, et al., 2011), as quais clivam diversos substratos celulares, levando as células a morte (AMARANTE, 1999).

O tratamento padrão com DOXO é feito por injeção intravenosa de uma dose relativamente elevada. O fármaco não é administrado oralmente devido à baixa absorção pelo sistema digestivo e sua eficácia global no tratamento do câncer é baixa, devido à multirresistência a fármacos (MDR). A MDR é a capacidade das células tumorais, expostas a um único fármaco, desenvolverem resistência a uma vasta gama de fármacos. As células tumorais são cinco vezes mais sensíveis que as células normais, mas perdem essa sensibilidade durante o tratamento e ficam resistentes (ROCHA, 2014).

Embora a quimioterapia seja um dos principais modos de tratamento contra o câncer, sua eficácia é bastante limitada pelo processo de resistência aos fármacos quimioterápicos, que pode ser tanto intrínseca como adquirida (ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO, 2012). No primeiro caso, é proposto que os fatores que interferem a resistência já estejam presentes entre as células que compõem o tumor, o que tornaria ineficaz. Já para a resistência adquirida é proposto que durante o tratamento do tumor, que era inicialmente sensível ao fármaco, possam ocorrer mutações em algumas células tumorais, que ativariam vias de sinalização compensatórias, possibilitando que essas células não mais respondam ao tratamento, o que confeririam a elas vantagens proliferativas em relação a massa tumoral total (HOLOHAN et al., 2013).

Mesmo sendo considerado um dos fármacos mais ativos no tratamento quimioterápico do câncer disponível no mercado, obtendo destaque, principalmente, para o tratamento de doenças em estádios precoce, a toxicidade da DOXO tem limitado sua aplicação terapêutica, as quais estão associadas a reações adversas como: náuseas, vômitos, perda de cabelo, estomatite e cardiotoxicidade (BAPTISTA, 2005).

Dentre essas reações adversas, a que apresenta maior destaque é a cardiotoxicidade. No homem, caso a dose cumulativa máxima de 550 mg/m² seja excedida, aumenta o risco de cardiomiopatia grave e irreversível. Esse efeito cardiotóxico da DOXO é caracterizado clinicamente por insuficiência cardíaca, anormalidades eletrocardiográficas, arritmias e morte súbita (SILVA; CAMACHO, 2005).

Diante desses problemas e por apresentar resultados satisfatórios no tratamento do câncer, a DOXO é usualmente encapsulada em veículos carreadores de fármacos a fim de reduzir os efeitos indesejáveis sem reduzir a eficácia do fármaco (WU et al. 2013).

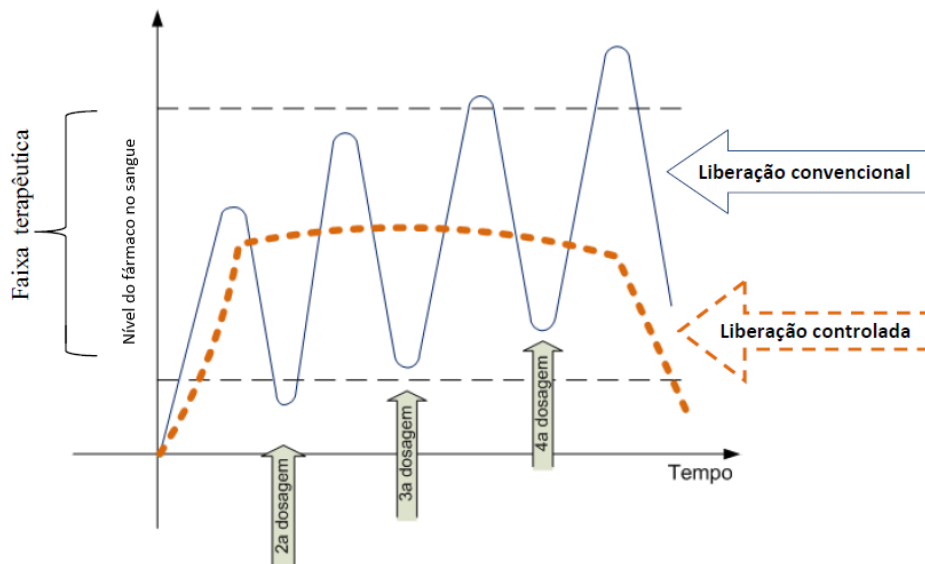
2.3- Sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos para o tratamento de câncer

A nanotecnologia está associada à manipulação dos materiais em escala nanométrica, uma vez que nesta escala, os átomos revelam características peculiares, podendo apresentar tolerância à temperatura, reatividade química, condutividade elétrica, tornando assim vantajosos para a construção de nanopartículas (também chamados de nanocarreadores) utilizadas para o tratamento de câncer (CHAN, 2017).

Um dos maiores problemas que ocorrem na atualidade em relação aos agentes antitumorais utilizados para o tratamento de câncer está diretamente ligado aos efeitos adversos. Com isso estratégias podem ser utilizadas para melhorar a eficiência dos tratamentos quimioterápicos e reduzir conseqüentemente os efeitos adversos. Uma das alternativas seria desenvolver novos fármacos, capazes de atuarem especificamente no sítio tumoral, porém esse processo é lento e necessita de altos investimentos financeiros. Já outra estratégia seria a criação de sistemas nanocarreadores, capazes de aumentar o tempo do fármaco na corrente sanguínea e facilitar o acúmulo do fármaco no sítio tumoral, ou seja, as nanopartículas passam apenas pela parede dos vasos nas regiões com tumor, a conseqüência é um acúmulo das nanopartículas no tecido tumoral vizinho ao vaso sanguíneo. Essa estratégia é conhecida como vetorização de efeito EPR (permeabilidade e retenção aumentada) (WANG; THANOU, 2010).

Quando um fármaco é utilizado de forma livre, apenas uma pequena quantidade atinge o tecido alvo, ocorrendo um grande desperdício da maior parte devido a sua distribuição por outros tecidos, além da metabolização e excreção antes de atingir o local de ação. Para “suprir” essa falha, o sistema de carreamento de fármacos apresenta diversas vantagens no setor da nanotecnologia como: liberação controlada do fármaco; direcionamento para região do tumor, que leva a menor toxicidade sistêmica; diminuição dos efeitos adversos devido a menor distribuição do fármaco e maior intervalo de administração. (UCHEGBU, 2006).

Figura 4: Figura representativa das administrações convencional e com liberação controlada de fármacos. Adaptado de PEIXOTO, 2013.



Diante disso, sistemas carreadores nanoestruturados vêm sendo utilizados em tratamentos de câncer, uma vez que protegem o fármaco através da encapsulação em seu interior, evitando a baixa solubilidade, a baixa biodisponibilidade, degradação enzimática e hidrolítica no tratamento gastrointestinal, bem como a instabilidade da corrente sanguínea, liberando grande quantidade de fármacos no local alvo, podendo então, atuar de forma mais efetiva (SUN, et. al., 2016), melhorando as propriedades farmacocinéticas e a biodistribuição do fármaco. (WANG; THANOU, 2010).

Diversos sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados têm sido investigados no tratamento de câncer, na intenção de aumentar a disponibilidade dos fármacos, dentre eles pode-se destacar as micelas, os polímeros, os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, de sílica mesoporosa e de sistemas biodegradáveis

metálicos, fazendo parte das inovações para tratamentos quimioterápicos (BATTOGTOKH, KANG, KO, 2015. SUN et al., 2016). Algumas séries desses sistemas estão, atualmente, em estágios de estudos clínicos e outros já estão presentes no mercado, dentre eles podemos destacar o Doxil®, primeiro fármaco para tratamento de câncer aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), bem como Myocet® e Caelyx®. Esses fármacos encapsulados em sistemas nanoestruturados vêm apresentando diversas vantagens comparadas ao tratamento convencional (JAHAN; MANSOOR; KANWAL, 2014).

Os sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados podem ser aplicados como sistema de transporte de fármacos utilizados no tratamento do câncer, melhorando o desempenho, a aceitabilidade pelo aumento da efetividade, a segurança e também a adesão do paciente (ANDERSSON; HUGHES, 2010). A elevada área de superfície, a versatilidade em ligar-se a grupos funcionais e a biocompatibilidade, fazem das nanopartículas um dos materiais mais estudados como sistemas de entrega de fármacos (COUTINHO, 2014). Dentre os sistemas nanoestruturados na área da tecnologia farmacêutica, as nanopartículas de sílica mesoporosa têm apresentado grande aumento de estudos, no interesse de sua utilização como carreadora de fármacos (WEISS et al., 2016).

Na concepção de um sistema de liberação, o perfil de liberação dos fármacos é muito importante, pois entender o seu processo ajuda a fornecer o mecanismo do mesmo, de modo a aperfeiçoar a cinética de liberação. Uma das maneiras de modelar esse processo é a equação clássica de Fick ou por expressões simplificadas de Higuchi (Higuchi, 1963).

Higuchi foi o primeiro a conseguir desenvolver uma equação que descrevesse a cinética de liberação de um fármaco a partir de uma matriz sólida insolúvel, como mostra a equação 1:

$$Q_t = K_H t^{1/2} \quad \text{equação 1}$$

Onde: Q_t é a quantidade total do fármaco liberado no tempo t e K_H a constante da taxa de liberação do modelo de Higuchi. A seguir a equação da constante K_H :

$$K_H = [2DS'\varepsilon(A - 0,5\varepsilon)]^{\frac{1}{2}} \quad \text{equação 2}$$

Sendo: D o coeficiente de difusão; S' a solubilidade do fármaco no meio; ε a porosidade da matriz e A a quantidade de fármaco presente na matriz.

Uma maneira mais fácil para descrever a cinética de liberação de matrizes sólidas é a utilização do modelo de Kitger & Peppas (RITGER; PEPPAS, 1987).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Knt \quad \text{equação 3}$$

Onde: M_t é a quantidade acumulativa de fármaco liberada no tempo; M_∞ a quantidade de massa acumulativa de fármaco liberado no infinito; K a constante de proporcionalidade que incorpora características da rede macromolar e do fármaco e n é utilizado para obter informações sobre o mecanismo de liberação.

Os parâmetros da equação 3 podem ser obtidos a partir da equação 4:

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln(K) + n \ln(t) \quad \text{equação 4}$$

Assim como o modelo de Higuchi, a aplicação desse modelo requer algumas considerações, dentre a qual o coeficiente de liberação do fármaco é constante e é válido somente para os 60% de fármaco liberado a partir da matriz. O expoente difusional n especifica o mecanismo de liberação e esta equação pode ser utilizada para analisar a liberação de fármacos em diferentes formas geométricas da matriz (ANDRADE, 2011).

O valor de n , que é o expoente utilizado para obter informações sobre o mecanismo de liberação pode ser dividido em três tipos:

Caso I - Difusão Fickiana ($n \leq 0,43$) - difusão mais lenta que o tempo de acomodação das cadeias, sendo este o tempo necessário para máxima expansão até atingir o equilíbrio sol-gel. Neste caso, a difusão é o fator principal na transferência de massa.

Caso II - Difusão Fickiana ($0,43 < n < 0,85$) - difusão mais rápida que o tempo de relaxação das cadeias. Neste caso, o tempo é o fator principal.

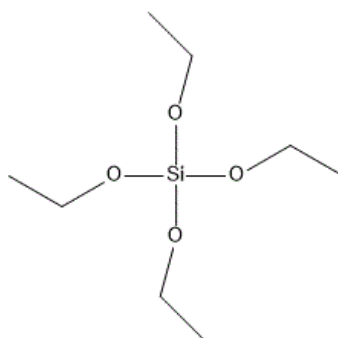
Caso III - Difusão não Fickiana ou anômala ($n > 0,85$) - nenhum dos fatores predomina, sendo a difusão e o tempo de relaxação comparáveis.

2.4- Nanopartículas de sílica e suas aplicações no tratamento de câncer

As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) foram preparadas pela primeira vez em 1990 e a síntese normalmente ocorre a partir da reação de polimerização sol-gel: ocorrem reações de hidrólise e condensação do precursor que permite a formação de partículas de tamanho coloidal (sol) e, posteriormente, a formação de rede tridimensional (gel) (CHOWDHURY, 2017). No processo sol-gel os

alcóxidos de silício são os precursores de sílica mais comuns, dentre eles o mais utilizado é o TEOS (tetraetilortossilicato) (Figura 5). Nessa reação os catalisadores frequentemente utilizados são: ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido fluorídrico, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio (TANG; CHEN, 2012; SOLER-ILLIA; AZZARONI, 2011).

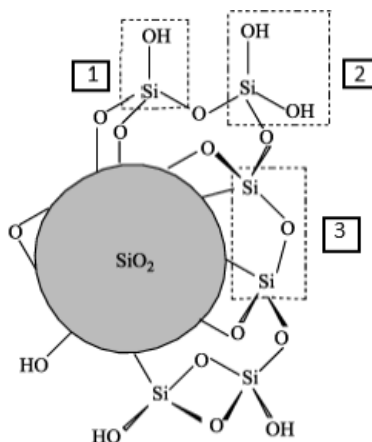
Figura 5: Fórmula estrutural do TEOS. (Autor).



Segundo classificação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o termo utilizado mesoporoso se refere ao tamanho do poro na faixa de 2 a 50 nm. Os mesoporos são distribuídos de forma alinhada e estruturada apresentando estruturas de “favo de mel” com centenas de canais vazios, sendo essas propriedades dos mesoporos muito utilizadas para entrega de fármacos e outras moléculas. A estrutura interna das MSNs, incluindo tamanho, volume e estrutura alinhada dos mesoporos, pode ser controlada por reagentes utilizados e condições reacionais durante a síntese (CHOWDHURY, 2017).

Já o termo sílica é referente aos compostos formados por unidades estruturais constituídas de Si e O, o qual a fórmula geral é SiO_2 . Esses compostos possuem sua superfície formada por grupos silanóis (Si-OH) e em seu interior grupos siloxanos (Si-O-Si) (OTHMER, 1997). Os grupos silanóis agem como centros de adsorção molecular ou podem ser centros reativos, formando ligações com grupos orgânicos ou metais (AMGARTEN, 2006). Desse modo, observa-se em sua superfície grupos de SiO_2 e grupos Si-OH, como mostrado na Figura 6.

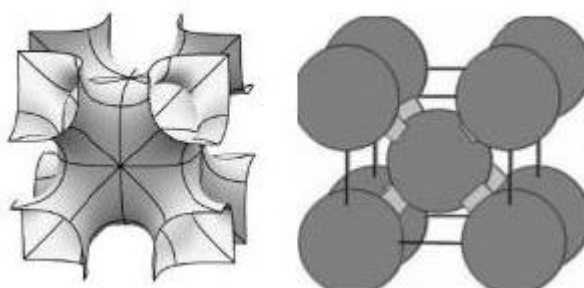
Figura 6: Esquema da estrutura da superfície da sílica. (1) grupo silanol isolado (2) grupo silanol geminal (3) ponte de siloxano. Adaptado de MOURA, 2008.



Os grupos silanos presentes nas superfícies das MSNs permitem com que estas sejam facilmente funcionalizadas com uma vasta gama de grupos funcionais orgânicos, como exemplo, o grupo amino. Os grupos funcionais da superfície podem desempenhar vários papéis de aplicações biomédicas de MSNs como: controle de cargas de superfície; interações intermoleculares com moléculas funcionais dentro e fora dos poros; controle do tamanho do poro de entrada para aprisionar moléculas nos mesoporos, entre outros (COUTINHO, 2014).

Devido à forte ligação Si-O, MSNs são mais estáveis a estímulos externos, tais como estresse mecânico e degradação em comparação com outras partículas orgânicas e inorgânicas, eliminando a necessidade de estabilização adicional, como a utilização de ligantes covalentes utilizados em outros sistemas de entrega. Existem vários tipos de MSNs, dentre elas o SBA-16, que é um material com arranjo cúbico de poros 3D e cada mesoporo nesta estrutura cúbica é conectado com oito vizinhos próximos, como mostrado na Figura 7 (CHOWDHURY, 2017).

Figura 7: Estrutura cúbica do SBA-16. Adaptado de GOBIN et al., 2006.



Então, devido às vantagens da modificação das superfícies das sílicas, reações que permitem a incorporação de fármacos e estes levados ao local de interesse. Esse fato tem atraído muita atenção ao longo dos últimos anos para desenvolvimento de aplicações biomédicas. Dentre elas, as MSNs oferecem oportunidades interessantes como utilização de fármacos antitumorais empregados na quimioterapia para tratamento de câncer (ORSI, 2016).

2.5- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O primeiro estudo que envolveu a cromatografia como ciência foi publicada no início do século XX por Michael Tswett, onde foram separadas substâncias de extrato de plantas. Desde então, essa técnica ampliou-se até uma forma instrumental com alta sofisticação, inicialmente com a cromatografia gasosa (CG), em seguida, a cromatografia líquida (CL) e finalmente a cromatografia com fluido supercrítico (CFS) (MÜHLEN; LANÇAS, 2004).

A cromatografia é um método empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Conhecida também como uma técnica nas quais componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade, as quais são transportadas por uma fase móvel líquida ou gasosa. Diante disso, pode-se observar que os componentes que movem lentamente no fluxo da fase móvel são mais fortemente retidos na fase estacionária. Já os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária movem-se mais rapidamente. Como resultado dessa diferença de mobilidade dos componentes da amostra, esses são separados em bandas ou zonas discretas, podendo ser analisadas de maneira qualitativa ou quantitativa (SKOOG, 2002).

Dentre as técnicas de separação, baseada na cromatografia líquida destaca-se a CLAE, que é um tipo de cromatografia que utiliza pequenas colunas, preenchidas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões (MALDANER, JARDIM, 2009). Ela possui a capacidade de realizar separações em análises quantitativas de uma grande quantidade de componentes presentes em vários tipos de amostras líquidas em pequena escala de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (VALENTE, et al., 1983).

Em CLAE, para fase móvel deve-se utilizar um solvente de grau cromatográfico, uma vez que esse apresenta alto teor de pureza, permitindo então realizar análises de alta sensibilidade. Além disso, é importante que a amostra seja solúvel na fase móvel, para que possa ser transportada através da coluna sem que os seus componentes se modifiquem. Destaca-se também que, quando possível, o solvente da amostra deve ser a própria fase móvel ou um de seus componentes, evitando a precipitação no injetor ou na coluna, o que conseqüentemente provocará queda de resolução na separação (COLLINS et al., 1997). De acordo com a natureza das fases móvel e estacionária, o processo pode ser classificado como cromatografia em fase normal ou cromatografia em fase reversa. Na cromatografia em fase normal são utilizadas uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, o que faz os componentes mais apolares serem eluídos primeiramente, em conseqüência, os componentes polares são retidos pela fase estacionária e eluídos depois. Já a cromatografia em fase reversa utiliza-se a fase estacionária apolar e a fase móvel polar, então os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares posteriormente (VOGEL, 1981).

A CLAE é uma técnica que utiliza um conjunto de equipamentos especiais que são: reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de introdução da amostra, sistema analítico (coluna cromatográfica e termostato da coluna), sistema de detecção e o sistema de registro e tratamento de dados (CIOLA, 2000).

A exigência de mostrar uma maior confiabilidade na qualidade de medições químicas vem sendo destaque em trabalhos analíticos, uma vez que, as medidas não confiáveis, podem levar a decisões errôneas e a prejuízos financeiros. Então, na intenção de diminuir esses problemas, deve ser criado um método analítico, o qual gere informações sobre a amostra que possa ser confiável e interpretável, esse método deve passar por uma avaliação, denominado validação. A validação, neste sentido, é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado apresenta aos órgãos reguladores a segurança de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. (RIBANI, et al., 2004). Embora não haja um consenso comum em relação aos parâmetros que devem ser validados, há, no entanto, guias de validações criadas por

órgãos e instituições que são aceitos. Dentre eles: USA-FDA, ANVISA, EC, INMETRO, entre outros (LANÇAS, 2009).

Segundo a ANVISA, a validação deve garantir, por meios de ensaios experimentais que a avaliação do método forneça e confirme evidências, a fim de atender as exigências requeridas, de modo que possa assegurar a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017). Os parâmetros analíticos para validação de métodos analíticos normalmente são: seletividade, linearidade, faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. (BRITO, et al., 2003).

Seletividade

A seletividade está relacionada com a capacidade de um método produzir respostas para diversos analitos, sendo capaz de diferenciar a resposta de um analito dos outros. Ela avalia então, o grau de interferência em análises, na presença de componentes como impurezas, produtos de degradação ou outros compostos que possam estar presentes na matriz da amostra (ANVISA, 2017).

Uma das maneiras de avaliar a seletividade em métodos cromatográficos, dentre eles a CLAE, é comprovar a pureza cromatográfica do sinal do analito (ANVISA, 2017). Para isso, basta comparar a matriz sem a substância de interesse com a matriz onde a substância de interesse foi adicionada. Sendo assim, a partir deste estudo é possível verificar se nenhum interferente tem eluição no tempo de retenção da substância de interesse, que deverá estar bem separada dos outros compostos presentes na amostra (EMER; MILLER, 2005).

Linearidade

A linearidade de um método corresponde à capacidade de fornecer resultados, proporcionais à concentração da substância a analisar na amostra através de uma relação linear. É avaliada a partir de um gráfico onde são representados os sinais de respostas (área dos picos) em função das concentrações das substâncias a ser analisada em soluções padrão. Através desse gráfico, é possível obter uma relação matemática, que pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (EMER, MILLER, 2005). A equação da reta fornecida é determinada pelo método dos mínimos quadrados e é do tipo: $y = ax + b$. A partir de um conjunto de medidas experimentais, os coeficientes a e b da curva analítica, podem ser estimados,

utilizando o método matemático de regressão linear. A partir dos pontos experimentais, também é possível calcular o coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2). O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade da curva obtida, sendo que quanto mais próximo de um, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 (ANVISA, 2017).

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade de um analito que pode ser detectado em uma amostra, porém, não há necessidade de ser quantificado, sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017). Este parâmetro pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, razão sinal-ruído (3:1) ou baseado nos parâmetros da curva analítica (BRITO, et al, 2003). Para o método baseado em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado pela equação 5:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 5})$$

Onde, “s” é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação. Já “S” é a inclinação da curva de calibração (tangente) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI, et al., 2004).

Limite de Quantificação (LQ)

O LQ é a menor quantidade do analito em estudo que pode ser medida com um nível aceitável de precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas. Ele pode ser calculado de maneira similar ao LD, entretanto, a razão sinal-ruído deve ser no mínimo (10:1) (BRITO, et al, 2003). Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o LQ pode ser calculado pela equação 6. O significado de “s” e “S” é similar ao descrito para LD.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 6})$$

Após cálculo do LQ, esse deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão obtidas são satisfatórias. As análises podem ser feitas em concentrações

correspondentes (ANVISA, 2017). Para técnicas analíticas em geral, o método mais utilizado é a razão sinal-ruído, porém em técnicas como a CLAE, a medição do ruído não é tão simples, pois a curva analítica é construída com a área e não somente com o sinal do detector. Então, a melhor maneira para resolução desse problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, sendo esse método mais confiável estatisticamente (RIBANI, et al., 2004).

Precisão

A precisão é representada pela dispersão de resultados entre análises independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostra semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Normalmente, sua avaliação se dá em termo de desvio padrão (DP) (equação 7) e desvio padrão relativo (DPR) (equação 8), mais conhecido como coeficiente de variação (CV) (AUGUSTO, et al., 2008).

$$DP = \sqrt{\frac{\sum(X_i - X)^2}{n - 1}} \quad (\text{equação 7}) \quad CV(\%) = \frac{DP}{X} \times 100 \quad (\text{equação 8})$$

Onde:

X é a medida aritmética.

X_i é o valor individual de uma medição.

n é o número de medições.

Normalmente, a taxa de aceitação de CV em processos de validação é de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Sendo assim, a precisão em validação de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes que são a repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade (ANVISA, 2017). A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, sendo denominada como precisão intra-dia e pode ser expressa pelo CV. Ela representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, sob as condições de medição do mesmo analista, mesmo local, mesmo procedimento e repetições em curtos espaços de tempo. Além disso, a ANVISA estipula que deve utilizar um número de nove determinações, sendo três concentrações presentes na curva analítica (baixa, média e alta) com três réplicas em cada concentração ou seis réplicas de uma concentração preparada. A precisão intermediária ou precisão inter-dia, representa a

precisão sobre a mesma amostra, quando um método é aplicado dentro do mesmo laboratório, porém variando os dias de análise. O número de ensaios para avaliação da precisão inter-dia segue a mesma recomendada para intra-dia. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas como a mudança de operador, local ou equipamentos (RIBANI, et al., 2004).

Exatidão

A exatidão de um método analítico indica a concordância entre os resultados individuais obtidos em uma determinada análise e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os números de análises a serem feitos variam segundo a legislação, e recomendam-se ensaios em triplicata em três níveis de concentração presentes na curva analítica (baixa, média e alta) (ANVISA, 2017). Os quatro métodos principais propostos para o estudo da exatidão são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. Os materiais de referência são acompanhados de um certificado que possui o valor da concentração de uma dada substância com uma incerteza associada. Alguns fornecedores desses materiais são: NIST, LGC, USP, FAPAS. No entanto, devido ao alto custo desses materiais e a abrangência limitada de matrizes e analitos, seu uso é restringido (RIBANI, et al., 2004).

Na comparação de métodos são empregados o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos a partir de um método referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Nos ensaios de recuperação, tem a proporção da quantidade da substância de interesse presente ou adicionada na porção analítica do material de teste, que é extraída e possível de ser quantificada. Os ensaios de recuperação é o método mais utilizado em validação de métodos analíticos, o qual a recuperação relaciona-se com a exatidão, uma vez que reflete a quantidade de analito recuperado no processo. A exatidão é expressa como um erro percentual inerente ao processo, que pode ser devido a medidas volumétricas imprecisas e interferentes (AUGUSTO, et al.; 2008).

As medidas de exatidão são expressas em termos de porcentagem e os intervalos aceitáveis de recuperação para análise, geralmente, estão entre 70 e 120%, com precisão de 20%. Porém dependendo da complexidade analítica e da amostra,

este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15%. Na avaliação da exatidão usando método adição de padrão, cabe o uso quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. Nesse método, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis em uma matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância, com propósito de recuperá-las no término da amostra (RIBANI, et al., 2004).

Robustez

A robustez na validação do método analítico indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas, ou seja, o método é robusto caso seja praticamente insensível a pequenas variações que podem ocorrer durante a execução (ANVISA, 2017). A robustez de um método cromatográfico como em CLAE, podem ser avaliadas variando os seguintes conteúdos: a concentração da fase móvel em 2%, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH e a temperatura da coluna em 5°C para mais ou para menos. Caso estas mudanças estejam dentro dos limites de exatidão e precisão, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas no experimento (RIBANI, et al., 2004).

3- JUSTIFICATIVA

Atualmente, o câncer é um dos problemas de saúde mais complexos que os sistemas de saúde em todo o mundo enfrentam. A quimioterapia é um dos tratamentos para essa doença que tem objetivo de diminuir o número de células tumorais, no entanto, esses tratamentos que utilizam um arsenal de diferentes fármacos que inclui a DOXO, atuam também sob células sadias do corpo humano.

Com isso, o tratamento com a DOXO está associado a severos efeitos adversos, como: náuseas, vômitos, alopecia, cardiotoxicidade, entre outros. Diante destes problemas, estratégias usando princípios da nanotecnologia têm permitido o direcionamento do fármaco para as células tumorais, fazendo que as células saudáveis não sejam alvos da sua ação. Nanocarreadores de fármacos como as nanopartículas de sílica constituem um grande potencial no tratamento e vem apresentando vantagens como a liberação controlada do fármaco, direcionamento

para região do tumor, diminuição dos efeitos adversos e maior intervalo de administração.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral sintetizar nanopartículas de sílica SBA-16 funcionalizadas com 3-aminopropil-trietoxissilano (APTES) contendo DOXO.

4.2- Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar e funcionalizar nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-16 com APTES;
- ✓ Caracterizar fisicoquimicamente e morfologicamente os materiais obtidos;
- ✓ Desenvolver e validar o método analítico para quantificação de doxorrubicina por meio da técnica de CLAE-DAD;
- ✓ Estudar *in vitro* a taxa de incorporação do fármaco em nanopartículas de sílica;
- ✓ Estudar *in vitro* a cinética de liberação do fármaco em diferentes valores de pH.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- Síntese e funcionalização

As nanopartículas de sílica foram sintetizadas pelo método sol-gel sob condições ácidas por meio de estudos prévios realizados por Andrade et al., 2013. Como agente precursor e surfactante, foram utilizados tetraetilortossilicato (TEOS) (Sigma Aldrich, SP-Brasil, 98%) e Pluronic F127 (Sigma Aldrich, SP-Brasil), respectivamente.

Inicialmente, 3g de F127 foram dissolvidos em 144 mL de água ultrapura (Thermo Scientific do tipo Smart2Pure 3 UV - Hungria). Em seguida, 13,9 mL de HCl 38%(m/v) (Alphatec, SP-Brasil, 38%) também foram adicionados e o sistema permaneceu por 30 minutos sob agitação constante em agitador magnético e a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 11 mL de butan-1-ol (Merck, SP - Brasil, 99,5%) como co-surfactante, mantendo a proporção da massa de 1:3 (F127: Butan-1-ol), calculado a partir da densidade do butan-1-ol. Após 1 hora,

15,3 mL de TEOS foram lentamente gotejados e o sistema foi deixado sob constante agitação, em temperatura ambiente, por 24 horas. O sistema foi filtrado e os sólidos foram coletados e armazenados em câmaras de aquecimento por 5 horas, sob temperatura de 100°C, para envelhecimento. O último passo consistiu na calcinação das amostras que foi realizada em estufa aquecida com taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ da temperatura ambiente até 550°C, sob atmosfera inerte (gás argônio).

Figura 8: Esquema representativo das reações químicas envolvidas na síntese do SBA-16. Adaptado de GOMEZ, 2016.

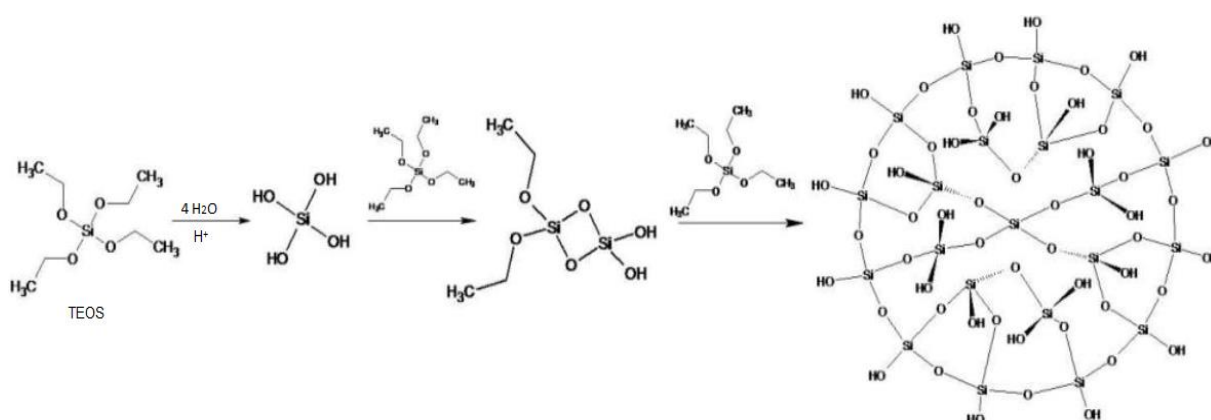
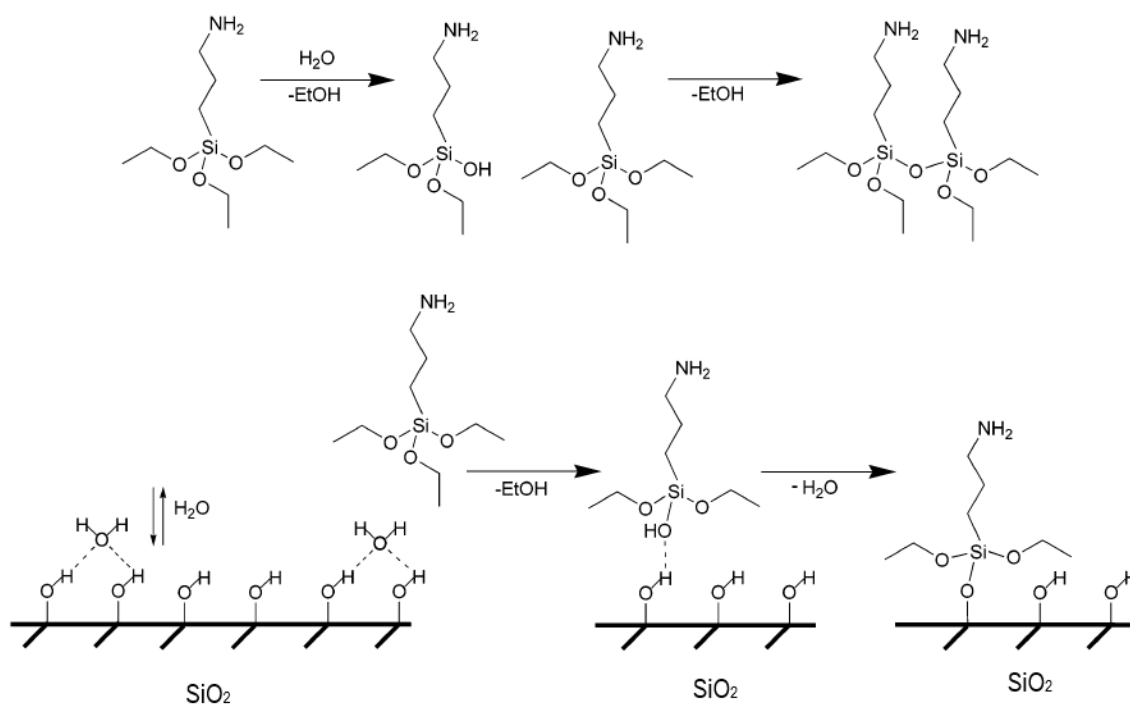


Figura 9: Funcionalização do SBA – 16 com APTES. Adaptado de HOWARTER, YOUNGBLOOD, 2006.



O processo de funcionalização ocorreu basicamente em duas etapas, por meio de estudos prévios realizados por Andrade et al., 2013. Primeiramente, a hidrólise do grupo alcóxido com formação de grupos reativos do tipo silanóis e, posteriormente, à condensação dos grupos silanóis, que resultou na formação da rede de ligações Si-O-Si (ALFAYA, KUBOTA, 2002). As nanopartículas de sílica SBA-16 foram funcionalizadas como exemplificado na Figura 9. Esse processo consiste na reação entre a sílica mesoporosa SBA-16 e o oxissilano presente no 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES). Nesse procedimento, 0,2 g de nanopartículas de SBA-16 sintetizadas foram dispersas em solução constituída por 30 mL de tolueno e 1 mL de APTES. O sistema foi deixado em refluxo por 24h a 100°C. Posteriormente, o material obtido foi lavado e filtrado. Os sólidos resultantes foram armazenados em câmara de aquecimento, por 4h, a 60°C (HOWARTER, YOUNGBLOOD, 2006).

5.2- Caracterização físico-química e morfológica do material obtido

5.2.1- Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho possui o objetivo de caracterização das bandas características dos compostos sintetizados. A radiação do espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier compreende a faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Foi usada a técnica da pastilha de brometo de potássio (KBr), onde uma pequena porção da amostra (1,0 mg) foi prensada com KBr, que foi previamente seco em estufa a 120°C, por 4h. A mistura foi colocada em um molde que foi levado à prensa e submetido a um peso. A pastilha, muito fina e frágil, foi retirada do molde e colocada no suporte disponível no próprio equipamento. Os espectros abrangendo a região de 400-4000 cm^{-1} foram obtidos por meio de um espectrofotômetro modelo Rayleigh WQF-510 (Pequim, China) com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras por minuto.

5.2.2- Análise térmica

As análises termogravimétricas (TG) foram realizadas no equipamento TGA 50 WS, Shimadzu (Tóquio, Japão). Amostras em torno de 5 mg foram analisadas nas seguintes condições: razão de aquecimento 10°C/min, faixa de temperatura de 35 a

600°C e sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 20 mL/min e célula de platina aberta.

5.2.3- Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada a partir do aparelho Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-20- SuperTwin FEI-200kV (Hillsboro, EUA), com detector para Espectroscopia de Perda de Energia de Elétrons (EELS) com resolução de até 1eV, e possui o objetivo de analisar a morfologia (tamanho, forma e distribuição) das nanopartículas pertencente ao Centro de microscopia da UFMG. A amostra foi dispersa em água e sonicada por 5 minutos em banho de ultrassom. Após decantação por 10 minutos, uma gota da solução foi depositada sobre uma grade-suporte de cobre de 300 mesh de malha, revestida com carbono.

5.2.4- Adsorção/dessorção de N₂

As características dos poros das amostras foram realizadas usando o equipamento Quantachrome NOVA 1000 (Boynton, EUA) utilizando gás nitrogênio a 77 K. Os dados de volume adsorvido e dessorvido em várias pressões relativas foram utilizados para gerar informações sobre a área superficial, volume de poros, distribuição e tamanho médio de poros. As análises da área superficial, tamanho de poros e volume total de poros foram obtidas pelo método Barret, Joyner e Halenda (BJH).

5.2.5- Espalhamento dinâmico da luz potencial zeta

A técnica de Espalhamento dinâmico da Luz (DLS) permitiu determinar o diâmetro médio das nanopartículas de sílica e o índice de polidispersividade (PDI), que é uma medida adimensional da largura da distribuição do tamanho de partícula. Esta análise foi realizada no equipamento Zetasizer Nano Zs, Malvern (Malvern, Reino Unido), após diluição apropriada em água ultrapura em pH igual a 7,4. O potencial zeta no mesmo equipamento, empregando-se a técnica de mobilidade eletroforética dos materiais. Nesse caso, as amostras foram analisadas após diluição de 0,9 mg/mL e todas as medições foram realizadas em triplicatas, a 25°C.

5.3- Desenvolvimento e validação do método analítico de CLAE-DAD

O desenvolvimento e validação do método analítico em CLAE-DAD foi feita a partir do sistema VWR Hitachi 5260 (Tóquio, Japão), o qual possui uma bomba com pressão máxima de 600 bar, um termostato e um detector DAD. Foi empregada a coluna cromatográfica de fase reversa Purospher® STAR RP-18 (Merck - São Paulo, Brasil), tamanho de partícula 5 µm, comprimento de 150 mm e diâmetro de 4,6 mm, mantida, a 25°C, foi empregada nas análises. A fase móvel durante toda análise, constituiu-se de 50% de acetonitrila grau HPLC (CRQ, São Paulo, Brasil) (solvente A) e 50% de tampão acetato de sódio (ácido acético: Alphatec, SP-Brasil, 99,7% e acetato de sódio anidro: Sigma Aldrich, São Paulo-Brasil, P.A) (solvente B), em pH igual a 4,6 e concentração 0,1 mol/L, em uma vazão de 2,0 mL/min. Foram testadas também outras fases móveis: água (pH = 4,0), acetonitrila e metanol grau HPLC (Merck – São Paulo, Brasil), na proporção de 68:19:13 e; água (pH = 4,4) e acetonitrila na proporção de 50:50. As proporções citadas foram em v/v e o pH foi ajustado com ácido fosfórico (Sigma Aldrich, Rio de Janeiro - Brasil, P.A.).

Foi empregado um padrão secundário (CRM) de Doxorrubicina (Sigma Aldrich, São Paulo-Brasil) e a eluição foi monitorada a 487 nm. O *software Chromaster System Manager*, versão 1,1 foi utilizado para calcular as áreas de cada pico, para então contruir uma curva de calibração do fármaco, o qual apresentou tempo de retenção de, aproximadamente, 1,73 min. O volume de injeção em cada amostra foi de 20 µL, varrido entre 450 e 510 nm.

Para todas as soluções preparadas de DOXO na validação do método analítico, foi usado como solvente a fase móvel, tampão acetato de sódio em pH igual a 4,6 e concentração 0,1 mol/L. Além disso, as soluções mais diluídas foram preparadas a partir de uma solução mãe. O método analítico validado seguiu a resolução RDC 166 da ANVISA, publicada no DOU nº 141, de 25 de julho de 2017, onde foram analisados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade foi avaliada a partir da análise apresentada pelo branco do Soro Fetal Bovino em pH igual a 7,4, comparando-o na presença de DOXO adicionada. Com este estudo, pretende-se verificar se nenhum interferente tem eluição no tempo de retenção do analito de interesse, que deverá estar bem separado dos compostos restantes da amostra.

A determinação da linearidade foi efetuada a partir da construção da curva de calibração com soluções padrão de doxorrubicina em dez diferentes concentrações, conforme: 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 µg/mL. Cada solução foi analisada em triplicata por CLAE e a curva de calibração foi construída a partir da área dos picos *versus* concentração. A linearidade do método proposto foi avaliada usando o coeficiente de correlação (r) e coeficiente de determinação (r²) da curva de calibração.

A precisão foi avaliada pela dispersão entre as análises repetidas em triplicatas de quatro concentrações diferentes. Para precisão intra e inter-dia, foram feitas três análises em intervalos de 2h e 48h respectivamente. A precisão foi expressa como porcentagem do coeficiente de variação de cada concentração da amostra analisada.

A avaliação da exatidão do método foi baseada em teste de recuperação, realizado com amostra de tampão fosfato de sódio utilizado como branco em pH igual a 5,8 e concentração 0,1mol/L. O teste de recuperação consistiu entre as análises repetidas em triplicata de três concentrações diferentes conhecidas, sendo essas adicionadas em tampão fosfato de sódio utilizado com branco.

O percentual de recuperação (%R) foi calculado conforme a equação 9. Em seguida foi calculado o coeficiente de variação (equação 8) da amostra para cada concentração da amostra analisada.

$$\%R = \frac{C_{em}}{C_t} \times 100 \quad (\text{equação 9})$$

Onde:

C_{em} é a concentração experimental média;

C_t é a concentração real

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados usando-se as equações 5 e 6, respectivamente. Onde, “s” é o desvio padrão da curva analítica ou desvio do branco e “S” é o coeficiente angular da curva analítica. Em seguida foi feito um teste para LD pelo método visual.

A robustez foi avaliada em três condições diferentes, a partir das variações a seguir: temperatura da coluna: 25, 28 e 30°C; pH da fase móvel: 4,5, 4,6 e 4,7; concentração da fase móvel (tampão acetato): 0,095, 0,098 e 0,1 mol/L. Foi calculado o coeficiente de variação para cada variação da amostra analisada e todos os

resultados obtidos a partir das condições cromatográficas foram comparados com resultados de análises obtidos em condições normais por meio da exatidão.

5.4- Estudo da taxa de incorporação

Para o estudo da taxa de incorporação do fármaco em SBA-16 e SBA-16-APTES, soluções de DOXO nas concentrações de 100 µg/mL e 200 µg/mL foram preparadas em tampão acetato 0,1 mol/L e pH igual a 3,5. Em seguida, foram pesados em tubos eppendorfs, 10 mg, 20 mg e 30 mg de SBA-16 e SBA-16-APTES, em triplicatas para cada concentração em estudo. Cada tubo eppendorf recebeu 1 mL de solução com o fármaco diluído nas concentrações preparadas em triplicatas. Após adição da solução do fármaco, os tubos eppendorfs foram previamente identificados e deixados durante 48 horas sob agitação, em um agitador orbital da marca Nova Ética (180 RPM - ThermoFischer Scientific, São Paulo, Brasil), a 25°C. Como as concentrações das soluções de cada eppendorf são conhecidas, na próxima etapa os tubos foram centrifugados (3000 RPM e 25 °C) e procedeu-se a análise de alíquotas dos sobrenadantes das soluções, por meio da técnica de CLAE-DAD. As alíquotas foram colocadas em vials (frascos) e analisadas de acordo o método descrito no item 5.3, da seção de materiais e métodos.

A taxa percentual de incorporação foi calculada pela diferença entre concentração inicial adicionada de DOXO (C_i) e concentração residual de DOXO (C_r) presente em solução, após o processo de incubação descrito, conforme:

$$\% \text{ de incorporação} = \frac{C_i x - C_r Y x}{C_i x} \quad (\text{equação 10})$$

Onde:

C_i é a concentração inicial de DOXO.

C_r é a concentração residual de DOXO em solução após 48h.

Y é a massa presente em cada eppendorf.

x é a concentração da DOXO estudada para incorporação.

5.5- Estudo *in vitro* da cinética de liberação do fármaco

O estudo da cinética de liberação do fármaco foi realizado à temperatura de 36,5°C de forma a simular a temperatura corpórea humana, em tampão fosfato e

tampão acetato de sódio, com pH igual a 7,4 e 4,5, respectivamente. Foram adicionados 2mL dos tampões aos tubos eppendorfs contendo amostras de 30 mg de SBA-16 e SBA-16-APTES incorporadas com as soluções de DOXO de 100µg/mL e centrifugados a uma rotação de 3000 RPM, por 5 minutos. Na sequência, de cada tubo eppendorf foi coletado 0,5mL do sobrenadante para análise via CLAE-DAD, de forma que a mesma massa que se tinha da coleta foi recomposta por adequado volume de tampão fosfato e acetato. Depois, os tubos foram colocados novamente sob agitação no agitador orbital e depois de 2, 4, 8, 24, 48, 72, 144, 240, 360, 528 e 696 horas. Seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, amostras dos sobrenadantes foram analisadas por CLAE (n=3). Em todas as amostras foram realizados os cálculos das concentrações antes e depois da reconstituição dos sobrenadantes para a obtenção adequada do montante e DOXO liberada em cada um dos tempos propostos.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Caracterização dos materiais obtidos

Uma sequência de operações envolve o processo sol-gel, das quais se incluem reações químicas e processos físicos, conduzindo a formação de sólidos porosos a partir de soluções líquidas de precursores moleculares. O termo sol é utilizado para definir uma distribuição de partículas coloidais estável em fluidos, já o termo gel pode ser visto como sendo o sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. Desse modo, os géis coloidais resultam da agregação de partículas primárias, que só ocorre pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão (HIRATSUKA, SANTILLI, PULCINELLI, 1995).

As nanopartículas de sílica foram sintetizadas sob condições ácidas, e o mecanismo reacional pode ser explicado em duas etapas:

(i) Hidrólise: que é caracterizada pela protonação dos grupos alcóxidos ligado ao átomo silício, tornando-o mais susceptíveis ao ataque nucleófilo da água. O álcool é o melhor grupo de saída, sendo então eliminado, obtendo na sequência os grupos reativos do tipo silanois.

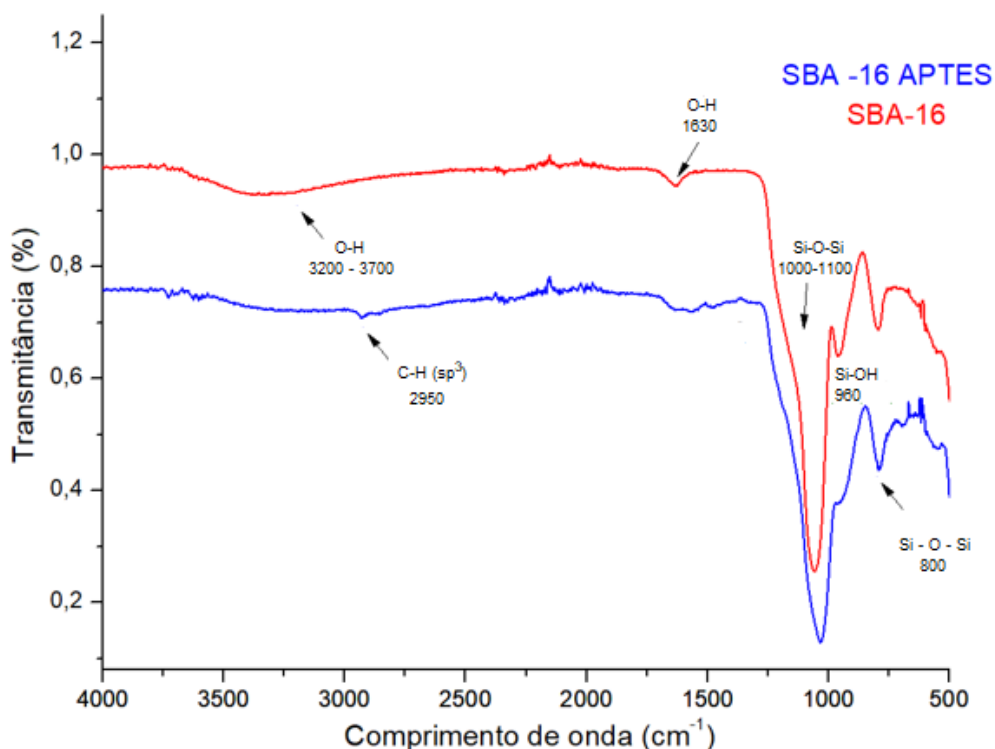
(ii) Condensação: as moléculas hidrolisadas do tetraetilortossilicato (TEOS) são inicialmente protonadas em uma etapa rápida, e na sequência, em uma etapa lenta, as moléculas de TEOS reagem com as moléculas que passaram por hidrólise, formando ligações do tipo siloxano (Si – O – Si) (Figura 8).

O processo de funcionalização foi conduzido em duas etapas. Na primeira, ocorreu a hidrólise do grupo alcóxido com formação de grupos reativos do tipo silanois, e posteriormente, ocorreu a condensação dos grupos silanois, que resultou na formação da rede de ligações (Si - O - Si) (ALFAYA, KUBOTA, 2002). Já na segunda, as nanopartículas de SBA-16 foram funcionalizadas pelo processo que consistiu na reação entre a sílica mesoporosa SBA-16 e o oxissilano presentes no APTES (Figura 9).

6.1.1 - Caracterização química

Os espectros vibracionais obtidos na região do infravermelho referentes às nanopartículas de SBA-16 e SBA-16-APTES podem ser observados na Figura 10.

Figura 10: Espectro na região do infravermelho para SBA-16 e SBA-16-APTES.



Pode-se observar uma banda larga na região de 3200 a 3700 cm⁻¹ que foi atribuída ao estiramento do grupo OH e a banda em 1630 cm⁻¹ está associado à

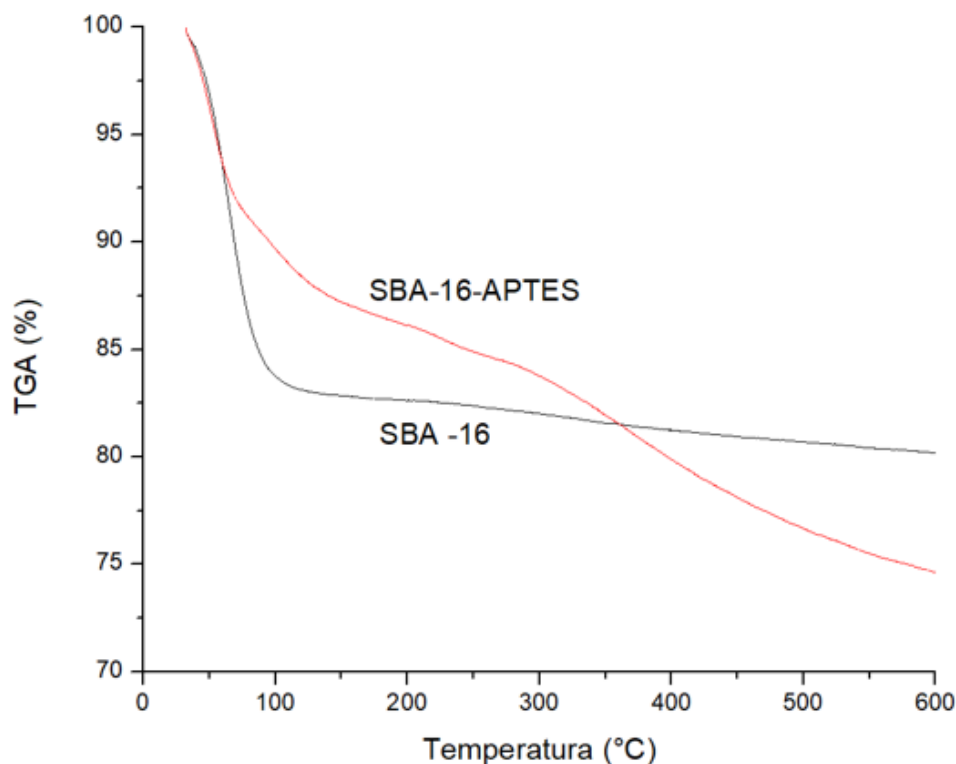
deformação deste mesmo grupamento químico, confirmando então a sua presença (AZIZI, et al., 2015). A formação da rede de sílica apresenta estiramentos nas seguintes regiões: 750-830 cm^{-1} e 800-1000 cm^{-1} (NAKAMOTO, 1997). As principais características da sílica são apresentadas nas regiões próximas de: 1100 cm^{-1} correspondente ao estiramento assimétrico (Si-O-Si) e 800 cm^{-1} associado a vibração de estiramento (Si-O-Si). Além disso, a banda atribuída ao estiramento (Si-OH) é observada em torno de 960 cm^{-1} (ANDRADE, et al. 2013).

O espectro infravermelho para o SBA-16-APTES não só apresentam bandas de absorção similares correspondentes à estrutura da sílica, mas também apresentam picos em regiões específicas originadas a partir do agente funcionalizante.

As bandas relativas ao estiramento simétrico das ligações N-H são largas e ocorrem em torno de 3345 cm^{-1} . No presente estudo, estas bandas podem estar sobrepostas pelas bandas formadas pelas absorções dos grupos hidroxilas (BARROS, et al., 2015). Entre 1100-1200 cm^{-1} , normalmente se observa uma banda de absorção devido ao estiramento da ligação C-N, no entanto, essa banda não aparece no espectro devido à uma provável superposição com as bandas de absorção do estiramento da ligação Si-O-Si, que também ocorre em torno de 1100 cm^{-1} e Si-CH₂-R, que ocorre entre 1200-1250 cm^{-1} (SILVERSTEIN, et al 1994; WANG et al. 2005). Já a presença de uma banda em torno de 2950 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento assimétrico C-H (sp^3) correspondente ao APTES (ANDRADE, et al. 2013).

As análises termogravimétricas dos materiais sintetizados foram empregadas desde a temperatura ambiente até uma temperatura de 600°C, usando atmosfera de ar sintético. Os experimentos dessas análises térmicas fornecem, após construção de um gráfico, curvas de perda de massa em função do aumento da temperatura. Com isso, informações importantes podem ser obtidas sobre a temperatura de degradação dos grupos presentes à superfície dos materiais. A partir desses resultados é possível observar perdas de massa em regiões características de cada tipo de material. As curvas de TG do SBA-16 e SBA-16-APTES são apresentadas na Figura 11.

Figura 11: Análise termogravimétrica para SBA-16 e SBA-16-APTES.



Para a matriz SBA-16, uma perda de massa de 17,5% ocorreu entre 25 e 150°C. Tal perda foi associada à dessorção da água fisicamente adsorvida na superfície do material. Já em um segundo evento, observa-se uma ligeira perda de massa de aproximadamente 2,5%, a qual está relacionada ao restante do copolímero F127 residual. Esse evento indica que a calcinação removeu completamente o surfactante, pois não se observa evento na faixa entre 150 e 600°C, relativo à decomposição do copolímero.

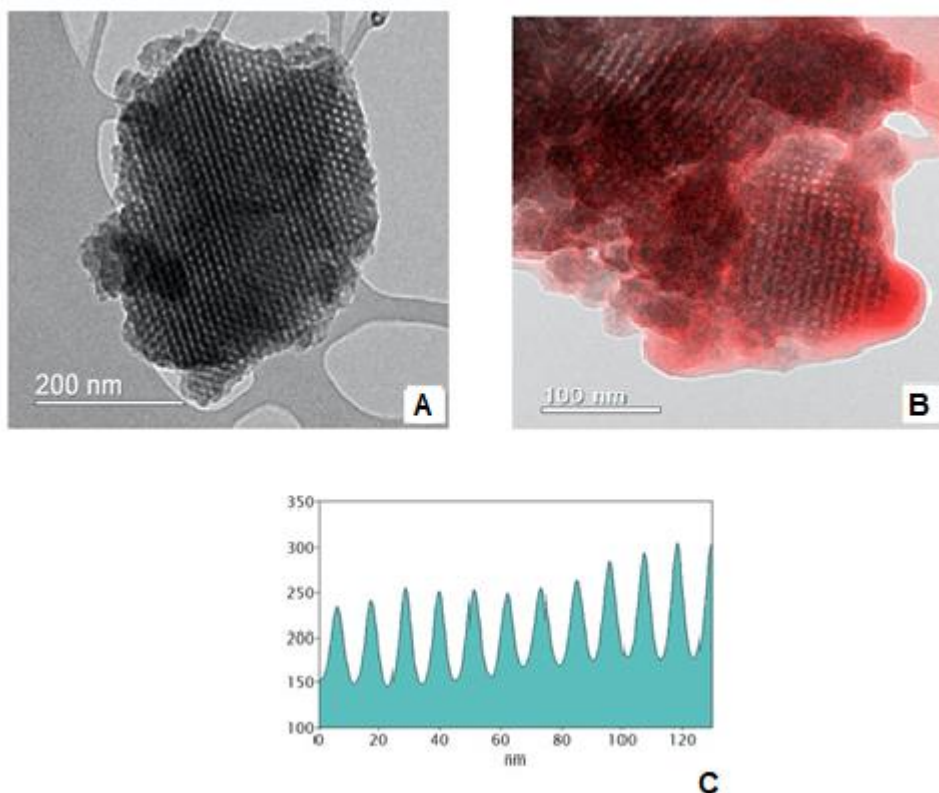
O mesmo estudo realizado em amostras SBA-16-APTES, revelou que além da perda de massa de aproximadamente 12,5%, ocorrida entre 25 e 150°C, que foi atribuída às moléculas de água que estava fisicamente adsorvida na superfície das nanopartículas, há também um segundo evento térmico de perda de massa de aproximadamente 12,5%, que ocorreu entre 150 e 600°C, que foi atribuída a degradação térmica das moléculas do agente funcionalizante APTES, incorporados também na superfície da matriz de sílica. Foi possível observar uma perda de massa total de aproximadamente 25%. As temperaturas onde os eventos térmicos ocorreram

estão de acordo com estudos prévios conduzidos por ANDRADE, et al. 2013 e GESZKE- MORITZ; MORITZ, 2016.

6.1.2. Caracterização morfológica e física

A estrutura dos poros da SBA-16 foi esclarecida pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens de MET para SBA-16 são encontradas na Figura 12 (A), a qual foi obtida através do feixe de elétrons incidente na direção paralela ao eixo dos poros, revelando uma estrutura cúbica dos mesoporos de canais homogêneos e equidistantes. Na Figura 12 (B) está disponível a Imagem de *Electron energy loss spectroscopy* (EELS) de XXXeV que é característica de elétrons do elemento químico nitrogênio. A imagem revela a presença da matriz SBA-16-APTES sob a co-existência de átomos de nitrogênio do agente funcionalizante (APTES) na cor vermelha. A Figura 12(C) foi obtida pelo software Image J[®] e os picos presentes representam os centros dos poros da matriz SBA-16, sendo que a distância calculada entre os picos pelo mesmo software revelou um valor médio de aproximadamente 11 nm de forma que a sequência de ordenamento paralelo equidistante dos poros pode ser confirmada como em Maheswari e colaboradores (2014).

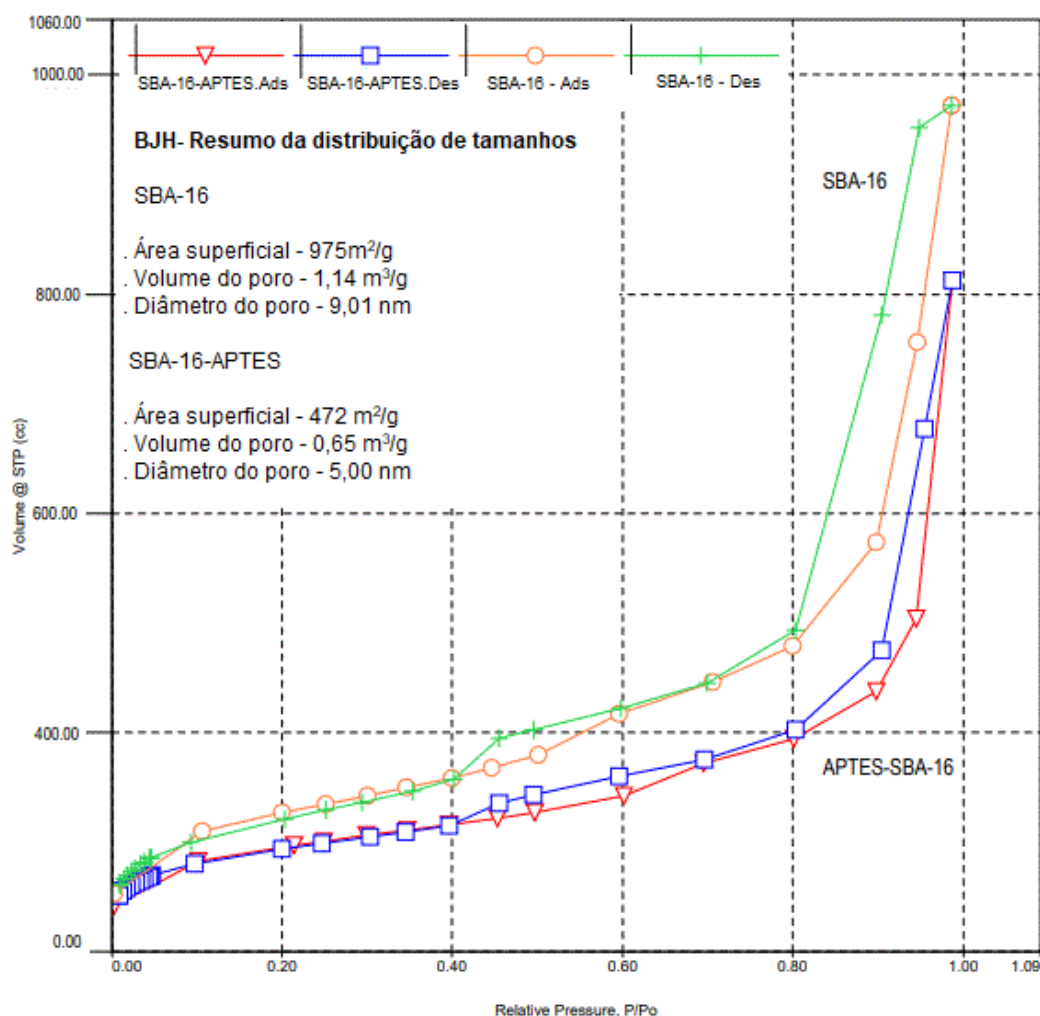
Figura 12: Micrografias de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de amostras constituídas por: (A) SBA-16. Em (B) Imagem de *Electron energy loss spectroscopy* (EELS) para SBA-16-APTES revelando a presença de átomos de nitrogênio do agente funcionalizante (APTES) na cor vermelha e (C) análise do perfil superficial da amostra (A), revelando o ordenamento de poros da estrutura da imagem (A). Imagem obtida pelo software Image J®.



As imagens de MET obtidas para a matriz SBA-16 são semelhantes aos estudos prévios conduzidos por GOSCIANSKA, OLEJNIK, NOWAK, 2017 e MAHESWARI, et al. 2014.

As medidas de adsorção e dessorção de nitrogênio servem para avaliar a efetividade dos processos de síntese em obter materiais mesoporosos com elevadas áreas superficiais como o SBA-16, uma vez que essa técnica permite, a partir do perfil das isotermas de adsorção/dessorção quantificar características importantes da estrutura, tais como: área específica, o volume e o tamanho dos poros das sílicas obtidas. As isotermas de adsorção e dessorção obtidas para amostras de matrizes de SBA-16 e SBA-16-APTES são mostradas na Figura 13.

Figura 13: Análise de adsorção/dessorção de nitrogênio (método BET) para amostras de SBA-16 e SBA-16-APTES.



As duas isotermas apresentam perfis semelhantes do tipo IV, que são, de acordo com a IUPAC, características de materiais mesoporosos e apresentam diâmetro de poro na faixa de 2 a 50nm. Nesta análise é possível observar loop de histerese, com ramos de adsorção e dessorção paralelos, classificados como H₁ que são histereses de materiais mesoporosos regulares de formato cilíndrico e com extremidades abertas, o que está de acordo com a estrutura de poros apresentada na Figura 6. As curvas de histerese estão associadas à condensação capilar que ocorre nos mesoporos na adsorção e a evaporação capilar na dessorção (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001). Os resultados obtidos para a área superficial, volume e diâmetro dos poros foram calculados a partir do método BJH. De acordo com o gráfico obtido, pode-se observar que o processo de funcionalização acarretou uma diminuição do diâmetro de poros da SBA-16, o que já era esperado, pois a

incorporação de moléculas orgânicas como o APTES preenche parcialmente os poros e, como consequência impede a entrada de nitrogênio durante a análise, fazendo com que o volume de nitrogênio adsorvido na sílica diminua e por sua vez também o volume do poro.

Na Tabela 1, estão resumidos os dados de área superficial (AS), volume do poro (VP) e diâmetro do poro (DP').

Tabela 1: Dados estruturais da SBA-16 e SBA-16-APTES.

Sílica	AS(m ² /g)	VP (m ³ /g)	DP'(nm)
SBA-16	975,00	1,14	9,01
SBA-16-APTES	472,00	0,65	5,00

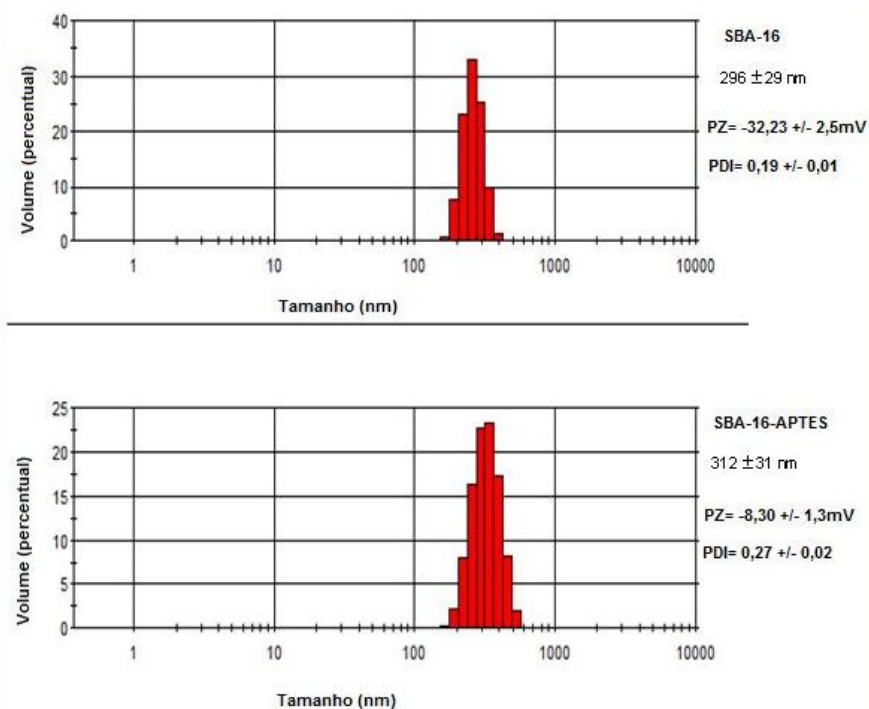
Como esperado, a funcionalização faz com que haja uma redução significativa na área superficial, aproximadamente 52%. Outros trabalhos obtiveram a mesma redução devido à funcionalização, entretanto, porcentagens diferentes. Moritz (2016) observou uma redução por volta de 43% (751 para 430m²/g), GOSCIANSKA, OLEJNIK, NOWAK, 2017 obteve uma redução de 70% (740 para 220m²/g) e YOUSEFPOUR, TAHERIAN, 2015 uma redução de 65% (879 para 306 m²/g). Tal fato pode estar ligado com a quantidade de APTES utilizada, bem como a diferente maneira de síntese.

Com a metodologia de DLS foi possível determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz decorrido do movimento Browniano das partículas. Quando uma partícula é dispersa em meio líquido, é formada uma camada de solvatação em sua superfície e o DH inclui essa camada de solvatação (MALVERN, 2004). Tal fato pôde ser notado em estudo, pois a amostra de SBA-16-APTES apresentou um aumento no valor do seu tamanho em relação às amostras de SBA-16, os quais podem ser atribuídos aos grupos de APTES inseridos na superfície da sílica, aumentando assim o perfil de aglomeração entre eles.

Como pode ser visto na Figura 14, o tamanho nas nanopartículas de sílica SBA-16 é igual a 296 ± 29nm e da SBA-16-APTES igual a 312 ± 31 nm. Uma maneira de controlar os tamanhos dessas nanopartículas seria controlar a velocidade de agitação e a velocidade de gotejamento com uma bureta automática afim de aumentar a

dispersão das nanopartículas, uma vez que embora esses fatores tenham sido controlados, pode não ter adquirido o rigor necessário (VAYSSIERES, 2005).

Figura 14: Distribuição do tamanho, tamanho médio e índice de polidispersividade das amostras SBA-16 e SBA-16-APTES.



Essa metodologia oferece também a possibilidade de determinar o índice de polidispersividade (PDI), o qual fornece informações sobre a distribuição das populações de tamanho das partículas analisadas. O PDI refere-se à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade (MALVERN, 2004). Seus resultados são compreendidos entre 0 e 1 e, quanto menor esse resultado, mais monodispersa estará as partículas que conseqüentemente será mais homogênea (<0,3) (NEMEN, SENNA, 2011). Tanto os valores de PDI para SBA-16 e SBA-16-APTES são baixos, justificando que as nanopartículas são monodispersas e homogêneas. Pode-se observar também uma maior distribuição das populações das nanopartículas analisadas referente à SBA-16-APTES, as quais podem ser atribuídas às interações intermoleculares, devido à cadeia orgânica do APTES ligada à superfície da sílica, aumentando assim o perfil de aglomeração entre eles.

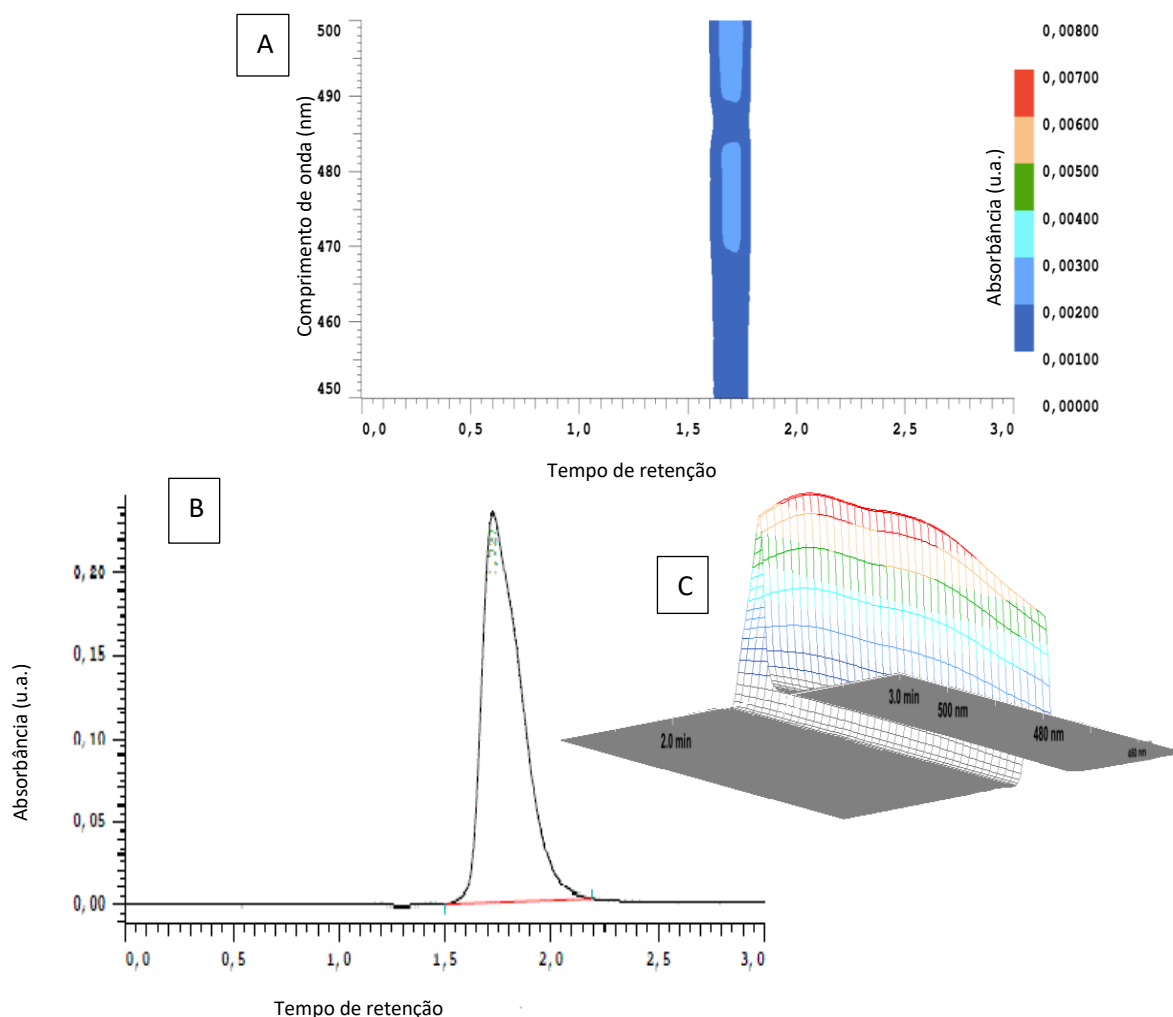
No mesmo instrumento foi possível determinar o potencial zeta, que é um valor referente à carga elétrica presente na bicamada elétrica que recobrem as nanopartículas (camada de Stern), sendo então um indicativo de estabilidade coloidal, uma vez que quanto maior o valor das cargas em módulo, maior será a repulsão eletrostática entre as partículas, menor o estado de agregação e menor a probabilidade de ocorrência de fenômenos de floculação, colascência ou sedimentação (MALVERN, 2004).

Os elevados módulos de potencial zeta negativo determinado nas amostras de SBA-16 indicam a boa estabilidade da amostra e pode ser relacionado com a presença de grupos silanóis presentes nas superfícies do SBA-16. Os dados obtidos para amostras funcionalizadas revelaram que houve uma importante redução no módulo negativo do potencial zeta no sistema funcionalizado. Esta redução pode ser atribuída a presença de grupos amino-alcoxissilanos do APTES, que em pH neutro o qual foi realizado o ensaio, encontram-se significativamente protonados. Esta afirmação se baseia no fato de que grupamentos amino-alquil primários possuem pKa da ordem de 9 e, em pH 7,4 estarão significativamente protonados.

6.2- Desenvolvimento e validação do método analítico de CLAE-DAD

A Figura 15 apresenta um cromatograma obtido em 487 nm, em que foi empregada a fase móvel constituída de acetonitrila e tampão acetato 0,1 mol/L e pH igual a 4,6 na razão de 50:50 em que demonstrou melhor eficiência de detecção de DOXO, na concentração de 180 µg/mL. O resultado revela um tempo de retenção de aproximadamente 1,73 minutos para esse fármaco.

Figura 15: Cromatogramas de DOXO obtidos na concentração de $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ pela técnica de CLAE-DAD. (A) Cromatograma espectral 2D onde os detalhamentos dos diferentes comprimentos de onda estudados foram avaliados (450 a 510 nm). (B) Cromatograma convencional (absorbância versus tempo de retenção). (C) Cromatograma espectral 3D.



6.2.1- Linearidade

A determinação da linearidade do método desenvolvido foi efetuada a partir da construção da curva de calibração com soluções padrões de DOXO, nas seguintes concentrações: 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e $250 \mu\text{g/mL}$. As análises para a obtenção da curva de calibração foram realizadas em triplicatas, e os dados obtidos foram tratados pelo *software Chromaster System Manager Versão 1.1*.

A equação da reta igual a $y = 7382,5x - 50586,0$ foi determinada e a avaliação da linearidade entre as variáveis foi realizada a partir do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r^2), que são 0,9989 e 0,9978, respectivamente.

A existência de uma relação matemática entre a concentração do fármaco e a área do pico obtida, foi avaliada por meio de análise de variância (ANOVA) empregando-se o aplicativo MS Excel®. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 2 e os dados obtidos revelam que o valor-p encontrado é muito baixo ($<0,01$), então há forte evidência da relação entre concentração e área do pico.

Figura 16: Curva analítica de calibração da DOXO.

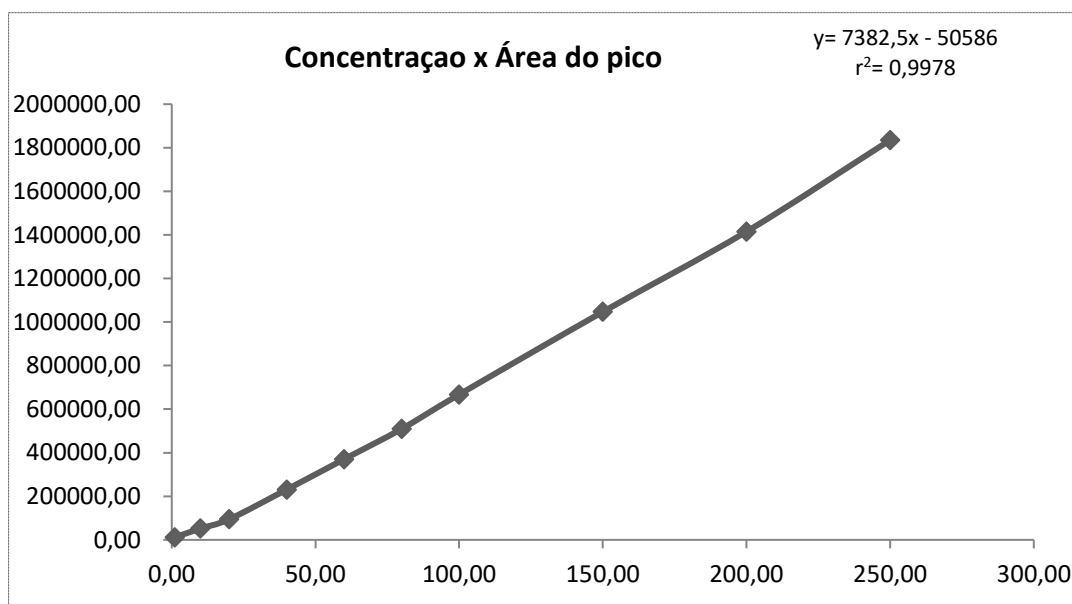


Tabela 2: Valores do tratamento estatístico para DOXO em CLAE.

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>
Interseção	-50586,22202	14847,93705	-3,40695289	0,009264759
Concentração	7382,478398	122,4216716	60,30368891	6,35377E-12

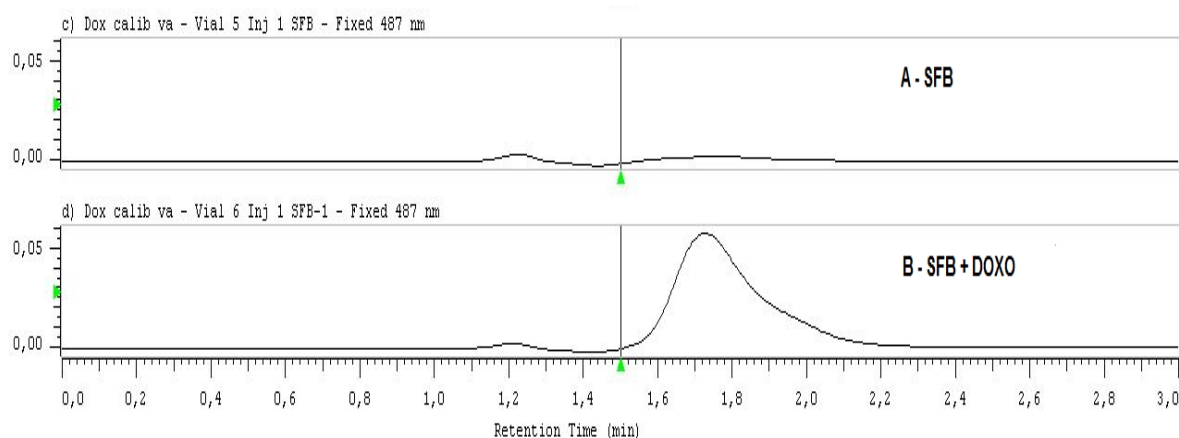
6.2.2- Seletividade

Na Figura 16 é possível verificar que o método proposto apresentou significativa seletividade do fármaco na presença de soro fetal bovino (SFB), uma vez que o branco dessa amostra não evidenciou pico relevante de absorção no comprimento de onda de 487 nm e tempo de retenção de 1,73 minutos, descartando assim, a possibilidade de interferentes. Na Figura 16 (A) está apresentado o

cromatograma do SFB. Já na Figura 16 (B) tem-se o cromatograma obtido da mistura de SFB, contendo DOXO na concentração de 40 µg/mL.

Utilizou-se o SFB pois a continuidade dos estudos remete ao emprego de ensaio com células e o SFB é um meio biológico comumente utilizado em cultivo celular.

Figura 17: Seletividade para DOXO em SFB e TAMPÃO FOSFATO



6.2.3- Precisão

Os valores encontrados para o coeficiente de variação das análises, para avaliação da precisão intra e inter-dia encontram-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Na tabela 3, hora 1 e 2 referem-se a 0h e 2h, respectivamente, e para tabela 4, dia 1 e 2 referem-se aos tempos de 0h e 48h, respectivamente.

De acordo com Ribani, 2004 os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, apresentando valores pequenos para o coeficiente de variação de cada concentração em estudo (variando entre 0,3 e 4,93) e estão em concordância com a especificação estabelecida pela qual preconiza um coeficiente de variação (CV) \leq 20% como critério de avaliação deste parâmetro. Com isso, pode-se concluir que o método é preciso.

Tabela 3: Precisão intra-dia do método para quantificação da DOXO por CLAE.

Concentração teórica (µg/mL)	Hora	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração experimental Média (µg/mL)	% CV (%)
20,00	1	21,21	23,02	3,44
		23,56		
		23,39		
	2	21,98	22,82	3,23
		23,35		
		23,13		
80,00	1	80,25	78,79	4,20
		75,01		
		81,12		
	2	83,34	80,21	4,93
		81,53		
		75,77		
150,00	1	149,11	146,70	2,05
		147,67		
		143,02		
	2	152,49	151,45	1,50
		153,01		
		148,85		
200,00	1	205,41	196,48	3,94
		192,02		
		191,99		
	2	185,91	192,79	3,28
		198,37		
		194,10		

Tabela 4: Precisão inter-dia do método para quantificação da DOXO por CLAE.

Concentração teórica (µg/mL)	Dia	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	CV (%)
20,00	1	21,83	22,42	2,32
		22,79		
		22,65		
	2	21,98	22,82	3,23
		23,35		
		23,13		
80,00	1	83,02	79,14	4,52
		78,45		
		75,96		
	2	83,34	80,21	4,92
		81,53		
		75,77		
150,00	1	147,33	149,55	2,75
		154,29		
		147,04		
	2	152,49	151,45	1,50
		153,01		
		148,85		
200,00	1	193,20	192,99	0,30
		193,43		
		192,34		
	2	185,91	192,79	3,28
		198,37		
		194,10		

6.2.4- Exatidão

A avaliação da exatidão do método desenvolvido foi baseada no teste de recuperação da amostra. O teste de recuperação consistiu na razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica que se encontra na tabela 5. Os dados revelam que para todas as análises a recuperação permaneceu entre a faixa de 70 a 120%. Além disso, os valores do coeficiente de variação obtidos para as

três concentrações foram inferiores a 20%, com isso, podemos afirmar que o método analítico desenvolvido é exato.

Tabela 5: Exatidão do método para quantificação da DOXO por CLAE.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	R (%)	CV (%)
10,00	11,03	11,44	114,39	3,22
	11,75			
	11,54			
100,00	95,70	99,58	99,58	3,45
	102,24			
	100,80			
180,00	180,04	180,80	100,45	0,49
	180,59			
	181,78			

Obs.: As concentrações experimentais foram calculadas através da subtração do branco (fase móvel).

6.2.5- Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e limite de quantificação do método foi determinado experimentalmente a partir do desvio padrão obtido de nove diferentes análises do branco. Os dados obtidos estão disponíveis na Tabela 6 e revelam média da área do pico com desvio padrão de $26576,11 \pm 741,36$.

Tabela 6: Concentrações e desvio padrão analisados para o branco.

Área do pico	Média da área do pico	Desvio padrão
26685,00	26576,11	741,36
25886,00		
27260,00		
26428,00		
27654,00		
26364,00		
27418,00		
25498,00		
25992,00		

O valor calculado para o limite de quantificação é 1,00 µg/mL e se encontra dentro da curva de calibração como recomendado pela ANVISA. O valor calculado para o limite de detecção encontrado foi de 0,33 µg/mL, entretanto, pelo método visual, foi possível detectar a presença de DOXO em concentração de 0,20 µg/mL.

6.2.6- Robustez

A robustez do método foi avaliada alterando algumas variáveis como a concentração da fase móvel, o pH e a temperatura do forno de coluna. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. A partir dos dados obtidos foram calculados os efeitos de cada variável, por meio dos mesmos critérios utilizados para a determinação da exatidão, que são a taxa de recuperação da amostra e seu coeficiente de variação. Os resultados desses cálculos forneceram valores de exatidão que variaram entre 70 a 120% e coeficientes de variação inferiores a 20%. Então, após os dados obtidos, pode-se afirmar que o método é capaz de sofrer pequenas variações sem causar uma variação maior nos resultados obtidos, logo o método possui robustez e essas variações de pH, temperatura e concentração da fase móvel podem ser incorporadas ao procedimento.

Tabela 7: Variação da concentração da fase móvel para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO por CLAE.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Concentração da fase móvel (mol/L)	% R	CV (%)			
25,00	26,35	26,50	C= 0,10	105,99	1,62			
	26,98							
	26,16							
120,00	115,13	119,23		C= 0,10	99,36	3,43		
	119,25							
	123,31							
225,00	225,96	224,81			C= 0,10	99,91	0,45	
	224,35							
	224,11							
25,00	25,15	24,69				C= 0,095	98,74	2,18
	24,81							
	24,10							
120,00	116,20	116,00	C= 0,095				96,66	1,57
	114,08							
	117,71							
225,00	221,8101	221,86		C= 0,095			98,60	0,22
	222,3751							
	221,3911							
25,00	25,5974	25,11			C= 0,098		100,43	2,62
	25,3665							
	24,3602							
120,00	116,09	115,39				C= 0,098	96,16	3,36
	118,87							
	111,20							
225,00	222,60	221,49	C= 0,098				98,44	0,45
	221,19							
	220,68							

Tabela 8: Variação do pH da fase móvel para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO por CLAE.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	pH	% R	CV (%)
25,00	25,76	25,68	4,50	102,73	1,37
	25,99				
	25,30				
120,00	118,28	116,98	4,50	97,49	2,44
	118,28				
	113,71				
225,00	224,32	223,54	4,60	99,35	0,33
	223,45				
	222,32				
25,00	26,35	26,50	4,60	105,99	1,62
	26,98				
	26,16				
120,00	115,13	119,23	4,70	99,36	3,43
	119,25				
	123,31				
225,00	225,96	224,81	4,70	99,91	0,45
	224,35				
	224,11				
25,00	25,18	25,21	4,70	100,85	1,49
	25,60				
	24,86				
120,00	113,33	117,51	4,70	97,92	3,41
	117,86				
	121,33				
225,00	225,16	224,37	4,70	99,72	0,32
	224,17				
	223,79				

Tabela 9: Variação da temperatura do forno de coluna para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO por HPLC.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Temperatura da coluna experimental (°C)	% R	CV (%)		
25,00	25,76	26,50	25	105,99	1,62		
	25,99						
	25,30						
120,00	115,13	119,23		28	99,36	3,43	
	119,25						
	123,31						
225,00	224,32	224,81			25	99,91	0,45
	223,45						
	222,32						
25,00	26,80	27,13	28			108,53	1,132
	27,41						
	27,19						
120,00	117,49	116,38		25		96,99	2,31
	113,32						
	118,34						
225,00	221,86	221,10			28	98,27	0,30
	220,59						
	220,86						
25,00	26,41	26,53	30			106,13	0,91
	26,81						
	26,37						
120,00	116,47	115,41		25		96,18	2,42
	112,24						
	117,53						
225,00	221,46	220,80			28	98,1330	0,259
	220,51						
	220,43						

6.3- Estudo da taxa de incorporação da DOXO em SBA-16 e SBA-16-APTES

O estudo da taxa de incorporação de DOXO nas matrizes de sílica foi feito a partir de diferentes concentrações de DOXO (Glenmark Farmacêutica Ltda - Buenos Aires, Argentina). Depois do método de quantificação por CLAE-DAD ser desenvolvido e validado, procedeu-se com os estudos da taxa de incorporação nas amostras do SBA-16 e SBA-16-APTES, onde 1mL de concentrações de 100 e 200 µg/mL de DOXO foram adicionadas em triplicatas a tubos eppendorfs com 10, 20 e 30mg de SBA-16 e APTES-SBA-16. Após 48h de incubação (180 RPM e temperatura de 25°C), as amostras foram centrifugadas a 3000 RPM e 25°C, alíquotas dos sobrenadantes das soluções foram analisadas em CLAE. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 10 e revelam que as matrizes de SBA-16 apresentaram maiores taxas de incorporações da DOXO e que ambas as matrizes obtiveram melhores resultados em 30mg de sílica.

Sendo assim, %i 10₂₀₀ significa a porcentagem de incorporação de DOXO em amostras de 10 mg e concentração de 200 µg/mL.

Tabela 10: Porcentagem de incorporação da DOXO em diferentes massas de sílica.

Amostra	%i 10 ₁₀₀	%i 10 ₂₀₀	%i 20 ₁₀₀	%i 20 ₂₀₀	%i 30 ₁₀₀	%i 30 ₂₀₀
SBA-16	71,70	57,23	87,15	85,72	92,77	91,81
SBA-16-APTES	26,32	12,69	48,57	37,85	66,52	58,63

A maior porcentagem de incorporação do fármaco foi observada em amostras SBA-16 quando comparadas com amostras de SBA-16-APTES. Este comportamento foi previsto uma vez que a partir dos resultados da análise de adsorção e dessorção de N₂ que demonstraram para amostras não funcionalizadas (SBA-16) uma maior área superficial e maior diâmetro dos poros, o que permite uma maior interação com as moléculas do fármaco. Além disso, sob o ponto de vista das interações intermoleculares, nas amostras não funcionalizadas é possível que ocorram interações entre os grupamentos polares da DOXO e grupos silanóis da superfície porosa da matriz SBA-16. Por outro lado, uma menor taxa de incorporação foi observada nas amostras SBA-16-APTES, quando comparadas ao SBA-16. Este comportamento pode ser atribuído ao processo de funcionalização, que contribui para

uma redução importante dos espaços disponíveis para incorporação do fármaco e bem como a diminuição de interações intermoleculares polares através da adição de grupos amino-alcoxissilanos do APTES.

A funcionalização do SBA-16 com APTES já foi descrito, anteriormente, em vários trabalhos envolvendo sílica, como em BARROS, et al., 2015; GOSCIANSKA; OLEJNIK; NOWAK, 2017; GESZKE- MORITZ; MORITZ, 2016. Em todos esses trabalhos os autores observaram comportamentos semelhantes ao obtido no presente trabalho, ou seja, que o processo de funcionalização com APTES promove uma significativa redução das taxas de incorporação de fármacos polares e, que tal comportamento pode ser atribuído ao processo de funcionalização que apresenta capacidade de modificar as superfícies de nanomateriais, aumentando ou diminuindo as forças intermoleculares, ligação covalente ou ligação eletrostática com os fármaco, ou seja, a funcionalização possui o objetivo de melhorar a eficiência da quantidade do fármaco liberado em estudo (ANDRADE, et al., 2013).

6.4- Estudo *in vitro* da cinética de liberação

Os ensaios de liberação da DOXO a partir das matrizes SBA-16 e SBA-16-APTES foram realizados analisando a quantidade liberada de DOXO em função do tempo, a partir da técnica de CLAE-DAD. Dessa forma, os perfis de liberação da DOXO para sílica não funcionalizada e sílica funcionalizada em tampão acetato (pH=4,5) e fosfato (pH= 7,4) estão apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. Esses valores de pH foram escolhidos para simula o pH dos tumores e o ambiente do tecido sanguíneo.

Os dados obtidos revelam que ambas as matrizes permitiram que o fármaco fosse liberado de forma controlada, por um significativo número de horas em ambos os fluidos. Para a amostra de SBA-16 (pH = 7,4) observa-se que a liberação ocorreu muito lentamente, sendo a liberação máxima da DOXO de 10,00% após 696 h, uma vez que 40,00% desse valor foi liberado nas primeiras 4h. Por outro lado, foi possível observar que a mesma matriz sob a presença de um meio com pH mais ácido, (pH = 4,5) obteve sua liberação máxima de 26,05% após 696h, com 41,50% desse valor sendo liberado nas primeiras 4h.

O sistema funcionalizado, como esperado, revelou um comportamento de liberação diferente da matriz não funcionalizada, onde maiores porcentagens de

liberação da DOXO foram observadas. A amostra de SBA-16-APTÉS (pH = 7,4) apresentou liberação máxima de 32,76% após 72h, com 45,77 % sendo liberado nas primeiras 4h. Já a amostra de SBA-16- APTÉS (pH = 4,5) obteve sua liberação máxima de 70,00% após 696h, com 40,15 % sendo liberado nas primeiras 4h.

Figura 18: Perfis de liberação de DOXO em diferentes meios para SBA-16.

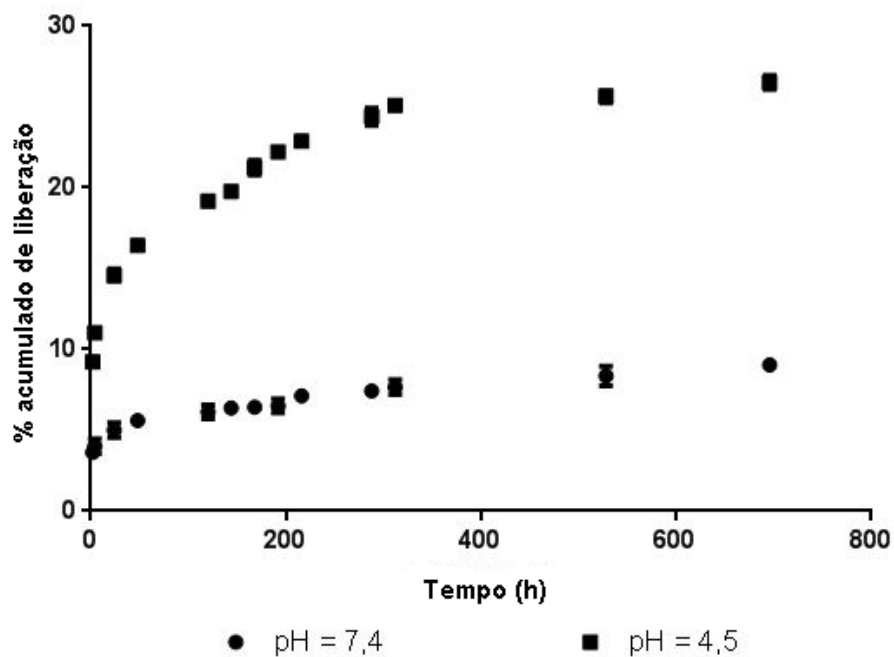
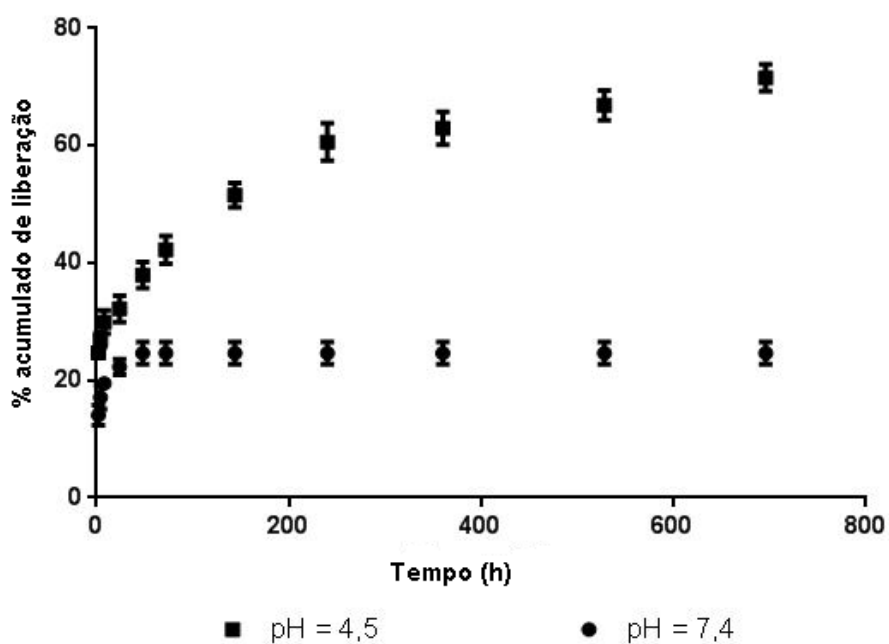


Figura 19: Perfis de liberação de DOXO em diferentes meios para SBA-16-APTÉS.



Os valores máximos da cinética liberação estão apresentados na tabela 12 e revelaram que embora a SBA-16 tenha obtido maior taxa de incorporação com 92,77% em relação a SBA-16-APTÉS com 66,5%, sua cinética de liberação é menos eficiente, pois a cada 92,77 mg do fármaco incorporado, apenas 7,5 mg são liberados em pH 7,4 e 23,6 mg em pH 4,5. Já para o sistema de SBA-16-APTÉS, a cada 66,5 mg incorporados da DOXO, 21,8 mg são liberados em pH 7,4 e 46,55 mg em pH 4,5.

Tabela 11: Porcentagem máxima acumulada de liberação de DOXO em SBA- 16 e SBA-16-APTÉS.

pH	SBA-16	SBA-16-APTÉS
4,5	25,40%	70,00%
7,4	8,10%	32,80%

Os perfis da cinética de liberação da DOXO foram investigados tomando-se como base o modelo de Ritger & Peppas, de acordo com a equação 4, o mesmo modelo utilizado por Dórame-Mirando e colaboradores (2018). A partir da linearização deste modelo foi possível encontrar os parâmetros cinéticos, como a constante K que diz respeito a velocidade de liberação nos primeiros 60% e também o valor de n que indica o mecanismo de liberação.

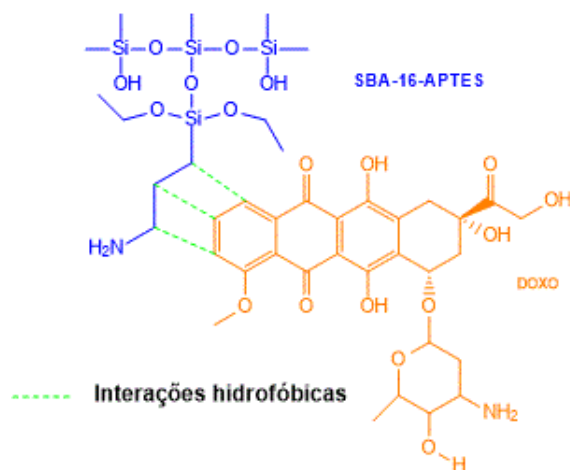
Após as linearizações dos sistemas de liberação, os parâmetros cinéticos são mostrados na tabela 13. Os dados obtidos revelam a cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor de $n \leq 0,43$, como obtido nos quatro casos, indicando que o mecanismo de liberação observado é de difusão do soluto a partir de camadas da matriz (SOARES, et al. 2020).

Tabela 12: Parâmetros cinéticos obtidos aplicando o modelo de Ritger & Peppas nas liberações controladas de DOXO.

Amostra	K	n	r^2
SBA-16 (pH 4,5)	8,29	0,14	0,9903
SBA-16 (pH 7,4)	3,23	0,18	0,9907
SBA-16-APTÉS (pH 4,5)	21,69	0,17	0,9738
SBA-16-APTÉS (pH 7,4)	13,46	0,18	0,9685

A Figura 20 apresenta um modelo que descreve possíveis interações hidrofóbicas que podem ocorrer entre a DOXO e a rede da sílica funcionalizada (em linha pontilhada verde). As geometrias das moléculas não são reais.

Figura 20: Possíveis interações intermoleculares hidrofóbicas entre a DOXO e SBA-16-APTES. (Autor).



Um perfil de liberação mais rápida do fármaco nas amostras SBA-16-APTES foi observado e pode ser adequadamente associado a um menor número de interações da DOXO com a rede da sílica devido ao processo de funcionalização, onde a imobilização das moléculas dos alcoxissilanos permitiram que houvesse interações mais fracas entre as estruturas, diminuindo a probabilidade de o fármaco ficar em grande parte ou totalmente retido na matriz. Já para SBA-16, grupos hidroxilas e amino da DOXO permitem fazer ligações de hidrogênio mais forte com grupo silanol da sílica, aumentando então, a força das interações e, conseqüentemente, fazendo que a liberação ocorra de forma mais lenta ou não ocorra.

Essa diferença entre as forças de interações intermoleculares da DOXO com as redes da sílica é um dos motivos que fazem com que o fármaco seja liberado em maior quantidade e em tempo mais prolongado para SBA-16-APTES em relação ao observado na matriz SBA-16, em pH igual a 4,5. A alta taxa de incorporação observada na matriz SBA-16 não apresentou vantagem em relação a SBA-16-APTES, já que na primeira o fármaco ficou fortemente retido na matriz.

A rápida liberação da DOXO nas primeiras horas dos experimentos pode ser atribuída às moléculas do fármaco que estavam dispersas na interface da água e superfície das nanopartículas (SCHAFFAZICK, et al., 2003). Como a funcionalização diminui a hidrofobicidade da superfície porosa, foi possível observar que nesse sistema houve uma diminuição em porcentagem no comportamento de liberação inicial do fármaco.

Nota-se que o valor de pH influenciou consideravelmente na cinética de liberação da DOXO, o que é importante, pois estas características fisiológicas conferem um grande diferencial aos tratamentos antitumorais, uma vez que a mudança de pH provoca a protonação dos grupos hidroxila e amino da DOXO, diminuindo assim a estabilidade do nanossistema, ou seja, as interações intermoleculares com a rede da sílica, desencadeando maior liberação do fármaco (TIAN; BAE, 2011).

Sob a ótica das aplicações *in vivo*, os tumores sólidos crescem muito rápido, seu microambiente fisiológico é normalmente caracterizado por má perfusão e altas taxas metabólicas. Como consequência, muitas regiões dentro dos tumores não permitem que haja uma rede de vascularização que receba uma grande oxigenação, então, a medida que esses tumores vão crescendo se tornam mais hipóxicos. A falta de oxigênio faz com que os metabolismos dessas células sejam anaeróbicos, produzindo mais ácido láctico na região dos tumores que é o produto da via glicolítica na ausência de oxigênio (ZHANG, LIN, GILLIES, 2010). Por isso, em regiões mais internas do tumor o pH é mais baixo e como mostrado nos experimentos, as liberações ocorrem de maneira mais eficiente para esse meio em estudo.

Outro fato importante é que quando as nanopartículas são endocitadas, elas ocorrem pelo processo de fagocitose, que gera uma vesícula dentro da célula, chamado de endossomo. Existem dois tipos de endossomo, o inicial em que o pH é mais próximo do neutro e o tardio que é o deslocamento do endossomo inicial para o interior da célula, que apresenta pH mais baixo, próximo de 4,5 (ATTIAS, SILVA, 2010). Então, o estudo nestes dois valores de pH é de fundamental importância, pois ele pode permitir e prever o comportamento de fármacos em diferentes meios.

Diante dos resultados obtidos *in vitro*, estudos *in vivo* são necessários para estudar melhor o comportamento de liberação do sistema e ter um correto panorama sobre a potencial aplicação do sistema no tratamento do câncer.

7- DISCUSSÃO GERAL

A metodologia de síntese empregada neste trabalho permitiu obter nanopartículas de sílica de matrizes compatíveis com o material SBA-16. A modificação da superfície a partir da funcionalização com o APTES, originou a matriz mesoporosa SBA-16-APTES, levando a uma significativa diminuição da área superficial e do diâmetro dos poros. Estes resultados mostram que o processo de funcionalização implicou em uma menor taxa de incorporação do fármaco. Porém, devido a elevada área superficial da matriz base ainda permitiu que quantidades importantes do fármaco fosse incorporada na matriz silanizada, alcançando 2,22 ug de DOXO por mg de sílica. O medicamento Caelyx®, também utilizado no tratamento do câncer de mama, apresenta 2,0 ug de DOXO por mg de lipossomas PEGuilados.

O método analítico de CLAE-DAD foi desenvolvido e validado localmente. A metodologia mostrou boa seletividade e especificidade para a quantificação de DOXO, com valores suficientes de precisão, exatidão e robustez. Apresentou linearidade na faixa de 1 µg/mL a 250 µg/mL com coeficiente de correlação maior do que 0,990. O limite de quantificação encontrado foi igual a 1 µg/mL.

Dadas as características da DOXO, que possui fluorescência intrínseca de 595 nm após excitação a 470 nm, importantes procedimentos na área da pesquisa e aquisições de imagens são ainda nos dias de hoje, objeto de intensas investigações em muitos centros no mundo. Existem na literatura muitos trabalhos publicados onde protocolos de análises de doxorrubicina pelo método de CLAE empregando detector de fluorescência foram desenvolvidos e validados. Entretanto, trabalhos que descrevem procedimentos que empregam a técnica de CLAE com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) são escassos e não apresentam etapas de validação do método desenvolvido, processo necessário aos estudos laboratoriais, onde são avaliadas se a performance do método proposto e os parâmetros estabelecidos atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida.

Embora a incorporação da DOXO na matriz não silanizada SBA-16 tenha alcançado uma elevada taxa de incorporação, foi possível notar que o processo de silanização foi de grande importância, uma vez que a alteração das características químicas da superfície do material foi capaz de reduzir significativamente as interações entre a rede da sílica e as moléculas do fármaco, permitindo obter um melhor perfil de liberação da DOXO. Além disso, o estudo da cinética de liberação

revelou que as matrizes apresentaram diferentes comportamentos quando submetidas a meios de liberação em diferentes pHs na temperatura de 36,5 °C. Melhores resultados foram obtidos pelo material funcionalizado em meio mais acidificado (pH = 4,5). Este valor de pH é compatível com as regiões tumorais e também com a fase tardia endossomal.

O sistema em estudo apresenta grande vantagem em relação aos disponíveis no mercado, principalmente pelo baixo custo envolvido na obtenção das nanopartículas de sílica. Naturalmente a continuidade dos estudos com ensaios *in vitro*, *in vivo* e pré-clínicos poderão revelar informações adicionais do sistema produzido de forma a considerá-lo como um potencial sistema contra o câncer.

8- CONCLUSÃO

Todas as análises de quantificação da DOXO foram realizadas a partir de um método de CLAE-DAD que foi desenvolvido e validado localmente seguindo a norma RDC nº 166 da ANVISA, sendo um método simples, reprodutível e de baixo custo. Esse método buscou preencher uma carência na literatura de métodos de CLAE-DAD para o doseamento cloridrato de doxorubicina, visto que a grande maioria dos métodos utilizam a técnica de CLAE-FL (fluorescência).

A encapsulação de DOXO nas matrizes SBA-16-APTES permitiu um perfil de liberação lenta e controlada devido a diminuição das forças de interações entre a sílica e o fármaco. Em pH ácido, o comportamento da curva de liberação revelou que a liberação da DOXO ocorreu em maior porcentagem que em pH básico, apresentando grande vantagem, já que o pH dos tumores sólidos é próximo do pH igual a 4,5 em estudo e pelo motivo do endossomo tardio que também se encontra em meio ácido, fazendo que seja diminuída consideravelmente afinidade dos ligantes por seus receptores, favorecendo a sua utilidade para o tratamento do câncer. O sistema em estudo pode permitir a diminuição da MDR da DOXO por sua encapsulação nas nanopartículas de sílica, por não utilizar a via MAPK regulada por um sinal extracelular.

Embora existam formulações nanoestruturadas contendo DOXO em uso clínico nos dias atuais, como por exemplo o Doxil, ainda se faz necessário estudos de novos sistemas carreadores, uma vez que os sistemas disponíveis possuem elevado custo e ainda demonstraram uma tímida melhoria terapêutica, contabilizando ainda severos

efeitos adversos aos pacientes. Neste sentido, no presente trabalho, um sistema nanoestruturado de sílica com custo mais baixo foi preparado como um latente sistema para tratamento de câncer. A potencialidade do sistema pode ser evidenciado pelo tamanho médio das nanopartículas, significativa taxa de incorporação do fármaco e perfil de liberação controlado da DOXO em diferentes faixas de pH.

9 - PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade de estudos pode-se citar:

1- A quantificação do grau de funcionalização das nanopartículas de sílica a partir da caracterização por análise elementar.

2- A condução de ensaios *in vitro* envolvendo culturas de células tumorais e normais objetivando avaliar a citotoxicidade do sistema sob diferentes faixas de pHs. Neste interim, será também possível estudar a possível ativação da via MAPK pela DOXO incorporada.

3- A realização de estudos *in vivo*, poderá revelar dados sobre a toxicidade do sistema, bem como permitir estudos de biodistribuição que visem mostrar a acumulação tumoral

4- Estudos *in silico* também poderão contribuir para trabalhos futuros com a utilização de software em uma modelagem molecular assistida por computador. Esses modelos avançados são ferramentas principalmente preditivas, que permitem:

(i) aproximar a realidade e podem estabelecer se uma reação vai acontecer ou não.

(ii) a partir de parâmetros das estruturas, cálculos que facilitam a compreensão do mecanismo de liberação de fármacos, pois o poder dos cálculos computacionais teóricos fornece informação necessária para compreensão desses processos.

Por essas razões, eles devem se tornar ferramentas essenciais para a química experimental em geral, e principalmente para o estudo de nanopartículas de sílica mesoporosa.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, S.L.; STEELMAN, L.S.; SHELTON, J.G.; WONG, W.; CHAPPELL, W.H.; BÄSECKE, J.; et al. **The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy.** Cell Cycle. v.9, nº 9, p. 1781–1791, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Validação de métodos analíticos.** Diário Oficial da União, nº 141, 25 jul, 2017.
- ALFAYA, A.A.S., KUBOTA, L.T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores.** Quim. Nova, v. 25, nº 5, p.835-841, 2002.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. **The regulation of apoptotic cell death.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 32, n. 9, p. 1053-1061, 1999.
- AMGARTEN, D. R. **Determinação de volume específico de poros de sílicas cromatográficas por dessorção de líquidos em excesso.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas-SP, Brasil, 2006.
- ANDERSSON, D.; HUGHES, D. **Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?** Nat Rev Microbiol 8, 260-271, 2010.
- ANDRADE, G.F. **Funcionalização de sílica mesoporosa para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármaco.** Dissertação de mestrado. CDTN, Belo Horizonte-MG, Brasil, 2011.
- ANDRADE, G. F. et al. **Mesoporous silica SBA-16 nanoparticles: Synthesis, physicochemical characterization, release profile, and in vitro cytocompatibility studies.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 168, p. 102-110, 2013.
- AUGUSTO, J. et al. **Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.** Química Nova v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- AZIZI, S. N. et al. **A new modified electrode based on Ag-doped mesoporous SBA-16 nanoparticles as non-enzymatic sensor for hydrogen peroxide.** Sensors and Actuators B: Chemical, v. 216, p. 271-278, 2015.

- ATTIAS, M.; SILVA, N.C. **Biologia Celular I**. v. 2. Fundação CECIERJ, 2010.
- BAPTISTA, M.Z. **Doxorrubicina lipossomal peguilada no tratamento do câncer de mama metastático**. *Prát. Hosp.*, n.37, p. 2012-2037, 2005.
- BARROS, A. L. B. et al. **Synthesis, characterization, and biodistribution studies of ^{99m}Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles**. *Materials Science and Engineering C*, v. 56, p. 181-188, 2015.
- BATTOGTOKH, G.; KANG, J. H.; KO, Y. T. **Long-circulating self-assembled cholesteryl albumin nanoparticles enhance tumor accumulation of hydrophobic anticancer drug**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 96, p. 96-105, 2015.
- BRITO, N. M. et al. **Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão**. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, p.179, 2000.
- CHAN, W.C.W. et.al. **Accelerating advances in science, engineering, and medicine through nanoscience and nanotechnology**. *ACS Nano*. 11(4): 3423-3424, 2017.
- CHANG, Y.-L. et al. **Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2-heteroannelated anthraquinones and doxorubicin**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 43, n. 12, p. 1720-1728, 2011.
- CHEN, Y. et al. **Co-delivery of doxorubicin and imatinib by pH sensitive cleavable PEGylated nanoliposomes with folate-mediated targeting to overcome multidrug resistance**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 542, n. 1, p. 266–279, 2018.
- CHOWDHURY, P. et al. **Pluronic Nanotechnology for Overcoming Drug Resistance**. In: **Bioactivity of Engineered Nanoparticles**. Springer, Singapore, p. 207-237, 2017.
- COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia**. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27, 1997.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. In: **Fundamentos de cromatografia**, 2006.

- COSTA, A.M; SILVA, V.V. **Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer**. Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA, Três Lagoas, v.5, n.2. p. 1-13, 2017.
- COUTINHO, E. C. **Nanopartículas Híbridas de Sílica Mesoporosa**. Lisboa: Técnico Lisboa. Tese de Mestrado, Bioengenharia e Nanossistemas, 2014.
- DOADRIO, A.L. et.al. **A rational explanation of the vancomycin release from SBA-15 and its derivative by molecular modeling**. Microporous and Mesoporous Materials. 132: 559-566, 2013.
- Dórame-Miranda, R.F., Rodríguez-Félix, D.E., López-Ahumada, G.A. et al. **Effect of pH and temperature on the release kinetics of urea from wheat-gluten membranes obtained by electrospinning**. Polym. Bull. 75, 5305–5319 (2018).
- EMER, J.; MILLER, J.H.M. **Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, ISBN: 3-527-31255-2, 2005.
- FERLAY, J. et al. **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012**. International Journal of Cancer, Geneve, v. 136, n. 5, p.359-386, 2015.
- FULVIO, P. F. **Synthesis and characterization of ordered mesoporous inorganic nanocomposite materials**. Tese de doutorado, Kent State University, 2009.
- GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. **APTES-modified mesoporous silicas as the carriers for poorly water-soluble drug. Modeling of diflunisal adsorption and release**. Applied Surface Science, v. 368, p. 348-359, 2016.
- GOBIN, O. C. SBA – 16: **Synthesis, diffusion and sorption properties**. Quebec: Laval University, 2006.
- GOMEZ, M. D. C. L. **Synthesis and Characterization of pH Stimuli-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles**. Dissertação de mestrado. Universidade Nova de Lisboa. Portugal, 2016.
- GOSCIANSKA, J.; OLEJNIK, A.; NOWAK, I. **APTES-functionalized mesoporous silica as a vehicle for antipyrine – adsorption and release studies**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 533, p. 187-196, 2017.
- GUPTA, G.P.; MASSANGUÉ, M. **Cancer metastasis: building a framework**. Cell Press. 127(4): 679-695, 2006.

- HIGUCHI, T. **Mechanism of sustained-action medication. theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices.** J. Pharm. Sci., v. 52, p. 1145-1149, 1963.
- HIRATSUKA, R.S.; SANTILLI, C.V.; PULCINELLI, S. H. **O processo sol-gel: uma visão físico-química.** Química Nova, v.18, p. 171-180, 1995.
- HOLOHAN, C. et al. **Cancer drug resistance: An evolving paradigm.** Nature Reviews Cancer, v. 13, n. 10, p. 714-726, 2013.
- HOSONO, K. et al. **Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial.** Cancer Prevention Research, v. 3, n. 9, p. 1077-1083, 2010.
- HOWARTER, J. A; YOUNGLOOD, J. P. **Optimization of sílica silanization by 3 – aminopropyltriethosilane.** Indiana: Escola de Engenharia de Materiais. Universidade Purdue, 2006.
- HUANG, Y. et al. **Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities.** Journal of Materials Chemistry, v. 21, n. 33, p. 12358-12362, 2011.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Políticas e ações para prevenção do câncer no Brasil: alimentação, nutrição e atividade física.** 2. Rio de Janeiro: INCA; 2012.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2015.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2017.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Quimioterapia: orientações aos pacientes.** Rio de Janeiro: INCA; 2010.
- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Radioterapia: orientações aos pacientes.** Rio de Janeiro: INCA; 2011.
- JAHAN, S., MANSOOR, F., & KANWAL, S. **“Polymers effects on synthesis of AuNPs, and Au/Ag nanoalloys: indirectly generated AuNPs and versatile sensing applications including anti-leukemic agent.”** Biosensors and Bioelectronics, v. 53, p. 51-57, 2014.
- JAIN, P.K; EL-SAYED, I.H.; EL-SAYED, M.A. **Au nanoparticles target cancer.** Nanotoday; 2(1): 18-28, 2007.

- KANWAL, U.; BUKHARI, N.I.; OVAIS, M.; ABASS, N.; HUSSAIN, K.; RAZA, A. **Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight.** Journal of drug targeting; 26(4): 296-310, 2018.
- LADEIRA K.M.; MARTINS, S.F.F. **Impacto prognóstico do número de linfonodos ressectados na sobrevida de pacientes com câncer colo-retal.** Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro); 36(3): 130-138, 2016.
- LAI, H.C. et al. **Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts.** European Journal of Pharmacology, v. 644, n. 1-3, p. 176–187, 2010.
- LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise.** São Carlos: RiMa. p. 62, 2004.
- LANÇAS, F.M. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?** Scientia Chromatographica. 1(2): p. 35-61, 2009.
- LANDMAN, G. W. D. et al. **Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: Zodiac-16.** Diabetes Care, v. 33, n. 2, p. 322-326, 2010.
- MAHESWARI, R.; PACHAMUTHU, M. P.; RAMANATHAN, A.; SUBRAMANIAM, B. **Synthesis, Characterization, and Epoxidation Activity of Tungsten Incorporated SBA-16 (W-SBA-16).** Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Química Nova, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.
- MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. **User Manuals**, England, 2004.
- MOURA, A.O. **Síntese e Aplicação de Magadiíta na Liberação Controlada de Herbicidas.** Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química. Universidade de Brasília - UnB, 2008.
- MÜHLEN C.V.; LANÇAS, F.M. **Cromatografia unificada.** Química Nova. v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.
- NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry.** New York. 6^a ed. John Wiley, 1997.
- NEMEN, D.; SENNA E. L. **Preparation and characterization of resveratrol-loaded lipid-based nanocarriers for cutaneous administration.** Química Nova,

v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

- ORSI, C. **Nanopartículas de sílica fazem medicamento agir apenas em célula de câncer.** Jornal da UNICAMP. Campinas-SP. 1º a 7 de agosto, 2016.
- OTHMER, K. **Encyclopedia of chemical technology.** 4ªed. Wiley-Interscience. v. 21. p 977-1005, 1997.
- PAVON, L.F.; OKAMOTO, O.K. **Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer.** Einstein: Revendo Ciências Básicas. 5(1): 74-77, 2007.
- PEIXOTO, A.C.B. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida.** Dissertação de Mestrado - UFRJ. 2013.
- PEREGO, P. et al. **Role of Apoptosis and Apoptosis-Related Genes in Cellular Response and Antitumor Efficacy of Anthracyclines.** Current Medicinal Chemistry, v. 8, n. 1, p. 31-37, 2012.
- RASPANTINI, G. L. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PCL-TPGS contendo docetaxel visando terapia do câncer de próstata. 2018.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2018.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química nova, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIVERA-MUÑOZ, E. M.; HUIRACHE-ACUÑA, R. **Sol Gel-derived SBA-16 mesoporous material.** International Journal of Molecular Sciences, v. 11, n. 9, p. 3069-3086, 2010.
- RITGER, P.L.; PEPPAS, N.A. **A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices.** J. Control. Release, v. 5, p. 37-42, 1987.
- ROCHA, M.E.B. **Desenvolvimento de uma formulação lipossomal para entrega de um fármaco anticancerígeno.** Dissertação de Mestrado - Universidade do Minho, 2014
- ROCHETTE, L. et al. **Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 36, n. 6, p. 326-348, 2015.
- SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. **The present and future of nanotechnology in human health care.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology

- and Medicine, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SCHAFFAZICK, S. Z.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova, v. 26(5), p. 726 - 737, 2013.
 - SILVA, C.E.V.; CAMACHO, A.A. **Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorrubicina.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57, p.300-306, 2005.
 - SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5ª ed. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 1994.
 - SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5ª ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676, 2002.
 - SOARES, D. C. F.; SOARES, L. M.; GOES, A. M.; et al. **Mesoporous SBA-16 silica nanoparticles as a potential vaccine adjuvant against Paracoccidioides brasiliensis.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 291. p. 1 - 11, 2020.
 - SOLER-ILLIA G.J.; AZZARONI, O. **Multifunctional hybrids by combining ordered mesoporous materials and macromolecular building blocks.** Chemical Society Reviews, v.40, p.1107-1150, 2011.
 - SUN, B.; LUO, C.; LI, L.; et al. **“Core-matched encapsulation of an oleate prodrug into nanostructured lipid carriers with high drug loading capability to facilitate the oral delivery of docetaxel.”** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 143, p. 4755, 2016.
 - TANG F., LI L., CHEN D. **“Mesoporous Silica Nanoparticles Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery”.** Advanced. Materials, v.24, p 1504–1534, 2012.
 - TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. **Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management.** Progress in Cardiovascular Diseases, v. 49, n. 5, p. 330-352, 2007.
 - TEIXEIRA, V.G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. **Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno.** Química Nova v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

- TEWEY, K.M.; ROWE, T.C.; YANG, L. et al. **Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II**. *Science*, v.226(4673) p. 466-468, 1984.
- THORN, C. F. et al. **Doxorubicin pathways**. *Pharmacogenetics and Genomics*, v. 21, n. 7, p. 440-446, 2011.
- UCHEGBU, I.F. **Pharmaceutical nanotechnology: polymeric vesicles for drug and gene delivery**. *Expert Opin Drug Deliv.* v 3(5), p 629-640, 2006.
- VALENTE, A.L.P.; COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.E. **Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência**. *Química Nova*, São Paulo, p.103-109, 1983.
- VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; COLILLA, M.; MANZANO, M. **Bioceramics and pharmaceuticals: A remarkable synergy**. *Solid State Sciences*, v. 9, p. 768-776. 2007.
- VAYSSIERES, L. **On the thermodynamic stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions**. *International Journal Nanotechnology*, v.2, n.4, p. 411-439,2005.
- VOGEL, A. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. São Paulo: Mestre Jou, p.462, 1981.
- WANG, X.; LIN, K.S.K.; CHAN, J.C.C.; CHENG, S. **Direct Synthesis and Catalytic Applications of Ordered Large Pore Aminopropyl-Functionalized SBA-15 Mesoporous Materials**. *The Journal of Physical Chemistry B*, Taipei, Taiwan, v. 109, p. 1763-1769, 2005.
- WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90-99, 2010.
- WEISS, C. A. et al. Microporous Mesoporous Mater., **227**, 242–251, 2016.
- WU, S. et al. **Adsorption properties of doxorubicin hydrochloride onto graphene oxide: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies**. *Materials*, v. 6, n. 5, p. 2026–2042, 2013.
- YILDIZ, O.E, GULCE, I, S, ANIL, M. et. al. **Cytotoxic responses of carnosic acid and doxorubicin on breast cancer cells I butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture**. *Cytotechnology* 69, 337-347, 2017.
- YOUSEFPOUR, M.; TAHERIAN, Z. **Functionalization of SBA-16 silica particles for ibuprofen delivery** **Functionalization of SBA-16 silica particles for**

ibuprofen delivery. Journal of Sol-Gel Science and Technology , 2015. DOI: 10.1007/s10971-015-3631-6.

- ZAFFIRI, L., GARDNER, J., TOLEDO P. L.H. **History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins.** J Invest Surg. Apr; 25(2): 67-77, 2012.
- ZHANG, x.; LIN, Y.; GILLIES, R.J. **Tumor pH and its measurement.** J. Nucl. Med. 51(8): 1167-1170, 2010.
- ZHAO, Y.; LI, Z.; KABEHIE, S.; BOSTROS, Y.Y; STODDART, J.F. **pH-operated nanopistons on the surfaces of mesoporous silica nanoparticles.** J Am Chem Soc. 2; 132(37): 13016-13025, 2010.
- ZHAO, N.; WOODLW, M.C.; MIXSON, A.J. **Advances in delivery systems for doxorubicin.** Physiology & behavior, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

ANEXO I

Artigo Submetido a revista *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* Doxorubicin in blood serum samples: determination through HPLC-DAD

(short communication)

Fabília Nunes Jesus Guedes, Felipe Farinate Lopes Souza, Carlos Henrique da Silveira and Daniel Crístian Ferreira Soares*

Universidade Federal de Itajubá - Campus Itabira – Bioengineering Laboratory - Rua Irma Ivone Drumond, 200 - Itabira - Minas Gerais – 35.903-087- Brazil.

Abstract

Today, doxorubicin is one of the most worldwide prescribed agents against cancer due to its broad spectrum of efficacy. Due to high costs, the hydrochloride-based doxorubicin (DOX) formulations still integrate almost all pharmaceutical preparations available for clinical use in Brazil. The main analytical methods used in the quantitative analyzes are based on the high-performance liquid chromatography employing a fluorescence detector (HPLC-FL). However, studies describing the use of the HPLC-DAD (diode array detector) technique for DOX are unusual and, in general, do not have a validated methodology. Thus, in this study, an analytical methodology was developed and validated for doxorubicin hydrochloride quantification through the HPLC-DAD technique in blood serum samples. The obtained results revealed that the developed method presented relevant linearity, precision, selectivity, accuracy, and robustness. Furthermore, the methodology allowed obtaining reduced limits of quantification and detection. From the obtained data, the developed method can be considered as an alternative for the DOX quantification in blood serum samples through the HPLC-DAD technique, when a fluorescence detector is not available.

Keywords: Doxorubicin HPLC-DAD analysis; Doxorubicin validation; CLAE-DAD analysis; Doxorubicin hydrochloride analysis.

e-mail: soares@unifei.edu.br

Introduction

Doxorubicin (DOX), even today, is one of the most prescribed chemotherapeutic agents worldwide, mainly due to its broad spectrum of therapeutic efficacy in many types of solid tumors and the low cost (Wallace et al., 2020). Derived from bacteria of the genus *Streptomyces peucetius*, the antibiotic belongs to the anthracyclines class, which chemically consists of 4 rings linked to an amino sugar. In use since the 1960s, the drug has been used in the treatment of many tumor types related to breast, ovary, bladder, thyroid, and also osteosarcomas, with relative success (Isakoff et al., 2015).

The antitumor mechanisms of DOX are associated with the topoisomerase II enzyme inhibition, which prevents DNA replication in altered cells. This enzyme is overexpressed in tumor cells, making it an important pharmacological target for the DOX action. Unfortunately, some healthy cells, that are continually multiplying processes, such as the bone marrow cells, also become a target for the drug action.

Another antitumor mechanism of DOX is related to intracellular free radical generation. Such radicals can promote a relevant increase in cellular oxidative stress, which can culminate in damage to the DNA of the tumor. This mechanism is also associated with the drug cardiotoxicity in humans (Congras et al., 2018; Lynch et al., 1997; Marinello et al., 2018). The effects of DOX over the cardiac musculature may appear later, between 10-15 years after the drug usage, following a dose-dependent pattern, in which the most severe effects can be observed in female individuals (Jain, 2000; Lipshultz et al., 1995). The pre-existence of other comorbidities such as diabetes, hypertension, liver disease, and the coexistence of other cardiac pathologies, can significantly increase the risks associated with the use of the drug (Wallace et al., 2020).

These drawbacks have motivated the development of controlled-release pharmaceutical formulations such as PEGylated (Caelyx®) and non-PEGylated (Myocet®) liposomes that have received authorization for use from the FDA, since 1996 and 2000, respectively. These pharmaceutical formulations promoted a relevant improvement in the toxicological profile of the drug, with prices still too high, making access to the drug restricted to a small portion of the

population (Brana and Taberero, 2010; Franco et al., 2018; Kumari et al., 2020; Lao et al., 2013; Reynolds et al., 2012). Unfortunately, the doxorubicin formulations based on hydrochloride still integrate the mainly pharmaceutical formulations currently available for clinical use.

The main analytical methods used for DOX quantification are high-performance liquid chromatography (HPLC), equipped with a fluorescence detector (HPLC-FL), and UV-VIS spectroscopy. DOX has an intrinsic excitation and fluorescence at 470 nm and 595 nm, respectively. Given these characteristics, relevant procedures in the biomedical areas related to imaging and treatment have been the target of intense research and clinical activities worldwide. In this sense, there are available previously published works in which many protocols for doxorubicin analysis were validated using the HPLC-FL method. However, studies describing validated methods for DOX analysis, using the HPLC-DAD technique, in biological samples, are not available. Thus, seeking to obtain an alternative methodology, in the present work, a simple and reproducible method for DOX analysis in blood serum matrix, using the HPLC-DAD technique was developed and validated, according to the rules of RDC n° 166 of the Brazilian National Agency of Health Surveillance (ANVISA) (Brasil, 2017).

Experimental

Materials

Doxorubicin chloride as a Pharmaceutical Secondary Standard (Certified Reference Material) and Fetal Bovine Serum were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Doxorubicin hydrochloride as medicine (Fauldoxo[®]) was purchased from Libbs farmacêutica (São Paulo, Brazil). Acetonitrile (HPLC grade), sodium acetate (ACS grade), acetic acid (HPLC grade), Purospher[®] STAR RP-18 column, and Phosphoric acid (HPLC grade – 85%) were purchased from Merck (São Paulo, Brazil). Ultra-pure water, produced from a Smart2Pure 3 UV/UF (Thermo, São Paulo, Brazil), was used in all experiments. All chemicals were used without further purification.

Method development

The method was developed at the VWR Hitachi 5260 system (Hitachi - Tokyo, Japan), equipped with a quaternary pump with a maximum pressure of 600 bar, an automated injection system, and a DAD detector. Initially, the optimum absorbance of the drug was previously determined through a standard solution ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in which was scanned in the visible region, ranging between 390 to 780 nm (slit width of 0.5 nm).

For method development, the following chromatographic conditions were employed. Column: Purospher STAR[®] RP-18, particle size 5 μm , length 150 mm, and diameter 4.6 mm. The mobile phase was constituted by a mixture of acetonitrile (solvent A) and sodium acetate buffer (pH 4.6) (solvent B), isocratically eluted in a flow rate of 2.0 ml min^{-1} . The injection volume was 20 μl . The following ratios between solvents A and B were tested: 60:40, 50:50, 40:60, 30:70. Also, different buffer concentrations (0.05, 0.01; 0.1 mol L^{-1} , were evaluated). The column oven was kept at 25, 35, and 40 $^{\circ}\text{C}$. The detection was monitored at 487 nm, and the Chromaster System Manager Version 1.1 software was used to calculate the peak areas obtained. The injection volume in each sample was 20 μL , and the spectral range from 450 to 510 nm. Starting from a doxorubicin chloride (Reference material) stock solution ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$), an intermediate standard solution ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared.

Different standards ($n=3$), in the following concentrations were prepared: 1; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 150; 200 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The following parameters were considered: selectivity, linearity, detection and quantification limits, precision, accuracy, and robustness (Brasil, 2017).

Method validation

The linearity of the method was evaluated from the calibration curve obtained in which was obtained from the DOX standard solutions (standard reference material), ranging 1-250 mg mL^{-1} . Each solution ($n=3$) was analyzed and the calibration curve was obtained from the area of the peaks versus concentration. The linearity of the proposed method was evaluated, in which the correlation coefficient (r) and determination coefficient (r^2) of the calibration curve were obtained.

The results were treated statistically through the least-squares method, reaching a linear regression. (Brasil, 2017; Valderrama et al., 2009).

The method selectivity was evaluated from the quantitative analysis of DOX (Doxorubicin hydrochloride-Fauldoxo®) in samples constituted by blood serum (fetal bovine serum-FBS) at pH 7.4, without any presence of DOX (Blank FBS) and FBS containing DOX at 180 µg.mL⁻¹ (FBS-DOX). In this study, the capacity of the method to quantify DOX in blood serum samples was evaluated.

The method precision was evaluated by the dispersion among different samples (n=3), considering four different concentrations. For the intra-day and inter-day precision determination, three independent analyses were performed, following intervals of 2h and 48h, respectively. The obtained data were expressed as a percentage of the variation coefficient for each concentration (Ermer, Joachi; McB. Miller, 2005; Marson et al., 2020).

The accuracy evaluation was based on a recovery test, performed with a sample of sodium phosphate buffer used as white at pH equal to 5.8 and a concentration of 0.1mol L⁻¹. The recovery test has consisted of repeated analyzes (n=3) of three different known concentrations, which were added in sodium phosphate buffer used as a blank. The recovery percentage (% R) was calculated according to equation 1. Then the coefficient of variation (relative standard deviation – RSD) (equation 2) was calculated for each concentration of the analyzed sample (El-ghobashy et al., 2018; Ribani et al., 2004).

$$\%R = \frac{C_{ac}}{C_r} \times 100 \quad (1)$$

Where:

C_{ac} : average experimental concentration

C_r : real concentration

$$RSD(\%) = \frac{SD}{C} \times 100 \quad (2)$$

Where:

SD: Standard deviation

C: average concentration

The method robustness was evaluated in three different samples ($n=3$), consisting of 25, 120, and 225 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Doxorubicin hydrochloride). The following variations were employed: (i) column temperature: 25, 28, and 30 $^{\circ}\text{C}$; (ii) pH of the mobile phase: 4.5, 4.6, and 4.7; (iii) concentration of the mobile phase (acetate buffer): 0.05, 0.01; 0.1 mol.L^{-1} . The coefficient of variation in each analyzed sample was calculated and all the results obtained, in each chromatographic condition were compared with the results obtained under normal conditions (Miller, J. N.; Miller, 2000). The limits of detection and quantification were calculated using equations 3 and 4, respectively.

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (3)$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (4)$$

Where:

σ : standard deviation of the curve response

S: slope of the calibration curve

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation. The groups of data and the homoscedasticity of the method were evaluated through ANOVA. The differences between the groups were measured by Tukey post-test (GraphPad Prism software. Version 6.0), where the P values < 0.05 were considered significant.

Results and Discussion

During the analytical method development, the stationary and mobile phase choices must be adequate and focused on low cost. In the proposed methodology, several runs were carried out, in which the mobile phase was isocratically eluted. The solvent (A) constituted by acetonitrile (ACN), and the solvent (B), a sodium acetate buffer solution (pH 4.6 - 0.1 mol.L⁻¹) were eluted, in different ratios. Different mobile phase flows and temperatures of the column oven were evaluated, seeking to obtain the best separation and detection for a shorter retention time.

The optimal chromatogram was obtained at 487 nm, using a 50:50 ratio between the solvents A and B, using a sample with a DOX concentration of 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 1). The obtained data revealed the presence of a peak in 1.73 minutes, with a slightly broadened base. This broadening was attributed to the method, which was inefficient to allow the separation of the doxorubicin and epirubicin epimers, regularly present in DOX samples (Camaggi et al., 1988). The following chromatographic data were calculated from the developed method: number of theoretical plates (N): 97,7; Height of theoretical plate (H): 1,54 mm; Symmetry factor (S): 3.91.

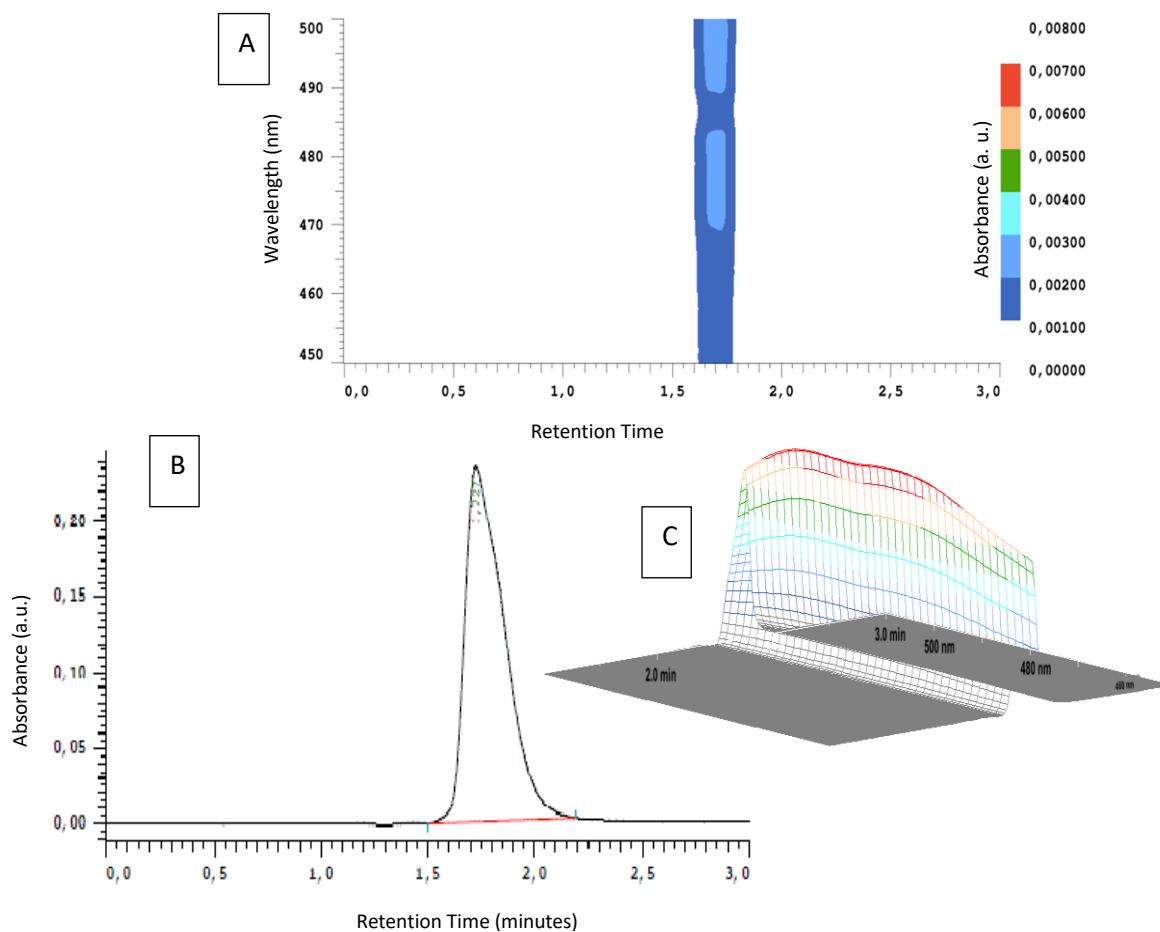


Figure 1. DOXO chromatograms obtained at $180 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, through the HPLC-DAD technique. (A) 2D spectral chromatogram, where the different lengths studied were evaluated (450 to 500 nm). (B) Conventional chromatogram (absorbance versus retention time). (C) 3D spectral chromatogram of DOXO.

The method linearity was determined from the obtainment of a calibration curve based on the following concentrations: 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, and $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. The analyzes were performed ($n=3$), the peak areas were calculated by the software Chromaster System Manage Version 1.1, and the calibration curve was obtained (equation 5). The correlation (r) and determination (r^2) coefficients were calculated in 0.9989 and 0.9978, respectively, which were considered satisfactory, being the method linear in the ranged concentrations studied. Furthermore, the homoscedasticity of the method linearity was confirmed through ANOVA analysis.

$$y = 7366.6 x - 47733 (5)$$

The selectivity evaluation was demonstrated by the analysis of samples constituted by blank FBS and FBS-DOX. The results do not reveal a significant peak regarding the doxorubicin retention time (Figure 2A). On the other hand, the FBS-DOX samples exhibited a characteristic peak of DOX at 1.73 minutes (Figure 2B), allowing a selective analysis of the drug.

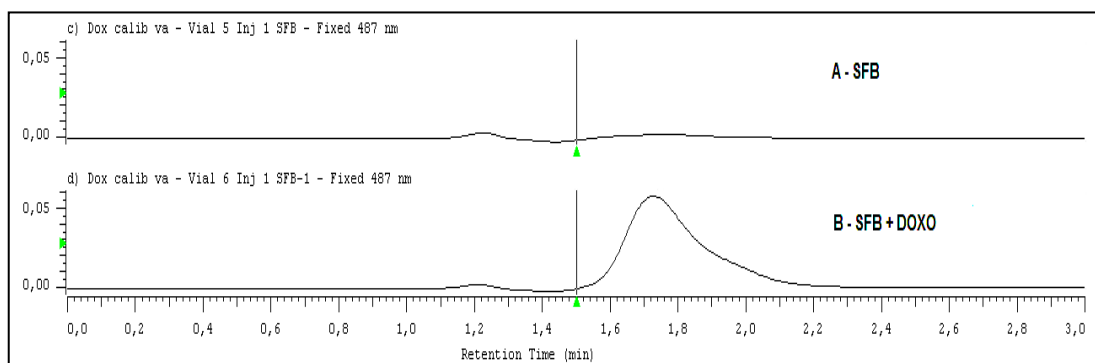


Figure 02: Selectivity evaluation for detection and quantifying of DOX in blood serum samples (Fetal Bovine Serum). Chromatograms were obtained from: (A) the FBS sample and (B) for FBS-DOX sample.

The precision parameter was evaluated in an interval of 0 and 2h (inter-day mode) and different days (intra-day mode). The values of the variation coefficient obtained in the analyzes are available in Table 1. The obtained results are in accordance with the specification established in RDC 166 of the Brazilian health agency (ANVISA), which recommends a coefficient of variation (CV) \leq of 20%.

Table 1. Evaluation of the intra-day and inter-day precision for the DOX quantification through HPLC-DAD (blood serum matrix).

Theoretical concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Time	Average experimental concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) n=3	RSD (%)
20.00	0 h	23.02	3.44
	2 h	22.82	3.23
80.00	0 h	78.79	4.20
	2 h	80.21	4.92
150.00	0 h	146.70	2.05
	2 h	151.45	1.50
200.00	0 h	196.48	3.94
	2 h	192.79	3.28
20.00	1 st day	22.42	2.31
	3 rd day	22.82	3.23
80.00	1 st day	79.14	4.52
	3 rd day	80.21	4.92
150.00	1 st day	149.55	2.75
	3 rd day	151.44	1.49
200.00	1 st day	192.99	0.30
	3 rd day	192.79	3.28

A specific method can be considered precise when the relative standard deviation (RSD) values, comprehending between 0.3 and 4.93 for each studied concentration. Thus, from the obtained results the developed method displayed relevant precision in the tested concentrations.

The analytical method accuracy was evaluated through the sample recovery test, which refers to the ratio between the average experimental concentration and the theoretical concentration. The obtained data reveal, for all analyzes, that the recovery remained between the range of 70 to 120%. Besides, the coefficient of variation values for the three concentrations were less than 20%, allowing to affirm that the analytical method developed is accurate.

The quantification and detection limits were calculated from the standard deviation of nine different experimental measurements of the analytical blank (FBS matrix). The values of $1.00 \pm 0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $0.33 \pm 0.03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ were determined for the quantification and detection limits, respectively.

The robustness of the method was evaluated through the following variables, with respective obtained results:

- (i) Column temperature: the temperatures of 25, 35, and 40 °C were tested and the RSD (%) range between 0.26 to 3,43.
- (ii) Mobile phase concentration (acetate buffer): The concentrations were 0.05, 0.01, and 0.1 mol L⁻¹ were employed. The RSD(%) values ranging from 0.22 to 3,44.
- (iii) Mobile phase pH: different mobile phase pH were tested (4.5, 4.6, and 4.7). The RSD(%) values obtained ranging from 0.32 to 3.42

The data obtained were used to calculate the sample recovery rate and RSD (%). Furthermore, the possible effects caused by changes in the mobile phase concentration, pH, and temperature were used to determine the method's accuracy. The obtained results revealed values ranged from 70 to 120% for the sample recovery and RSD(%) values below 20%. In this sense, the developed method can be considered robust, inside the context studied.

Considering all results obtained in this work, the developed analytical method of CLAE-DAD showed relevant selectivity and specificity for the DOXO quantification in blood serum samples, with precision, accuracy, and robustness values similar to those found by other analytical methods such as CLAE-FL. Besides, the methodology showed important linearity over a wide concentration range. The low limit of quantification obtained was considered adequate for the drug analysis, even in low concentrations.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (PPM-00125-18), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their financial support.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Brana I, Tabernerero J. Cardiotoxicity. *Ann Oncol* 2010;21:vii173–9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq295>.

Brasil. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. 2017.

Camaggi C, Comparsi R, Strocchi E, Testoni F, Pannuti F. HPLC analysis of doxorubicin, epirubicin and fluorescent metabolites in biological fluids. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988;21. <https://doi.org/10.1007/BF00262773>.

Congras A, Caillet N, Torossian N, Quelen C, Daugrois C, Brousset P, et al. Doxorubicin-induced loss of DNA topoisomerase II and DNMT1- dependent suppression of MiR-125b induces chemoresistance in ALK-positive cells. *Oncotarget* 2018;9:14539–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24465>.

El-ghobashy MR, Yehia AM, Helmy AH, Youssef NF. Forced degradation of gliquidone and development of validated stability-indicating HPLC and TLC methods. *Brazilian J Pharm Sci* 2018;54. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000317223>.

Ermer, Joachi; McB. Miller JH. *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. 1st ed. Wiley VCH; 2005.

Franco Y, Vaidya T, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther* 2018;Volume 10:131–41. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S170239>.

Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J Clin Oncol* 2015;33:3029–35. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4895>.

Jain D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *J Nucl Cardiol* 2000;7:53–62. <https://doi.org/10.1067/mnc.2000.103324>.

Kumari H, Huang W-H, Chan MWY. Review on the Role of Epigenetic Modifications in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Front Cardiovasc Med* 2020;7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00056>.

Lao J, Madani J, Puértolas T, Álvarez M, Hernández A, Pazo-Cid R, et al. Liposomal Doxorubicin in the

Treatment of Breast Cancer Patients: A Review. *J Drug Deliv* 2013;2013:1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/456409>.

Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, et al. Female Sex and Higher Drug Dose as Risk Factors for Late Cardiotoxic Effects of Doxorubicin Therapy for Childhood Cancer. *N Engl J Med* 1995;332:1738–44. <https://doi.org/10.1056/NEJM199506293322602>.

Lynch BJ, Guinee DG, Holden JA. Human DNA topoisomerase II- α : A new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1997;28:1180–8. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(97\)90256-2](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(97)90256-2).

Marinello J, Delcuratolo M, Capranico G. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *Int J Mol Sci* 2018;19:3480. <https://doi.org/10.3390/ijms19113480>.

Marson B, Concentino V, Junkert A, Fachi M, Vilhena R, Pontarolo R. VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED ON HPLC METHODS. *Quim Nova* 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170589>.

Miller, J. N.; Miller JC. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 4Th ed. New York, NY: Hall, Prentice; 2000.

Reynolds JG, Geretti E, Hendriks BS, Lee H, Leonard SC, Klinz SG, et al. HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;262:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.04.008>.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 2004;27:771–80. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

Valderrama P, Braga JWB, Poppi RJ. State of the art of figures of merit in multivariate calibration. *Quim Nova* 2009;32:1278–87. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000500034>.

Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res* 2020;126:926–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314681>.

ANEXO II

Propriedade intelectual



09/03/2021

870210022545

18:14



29409161929379446

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 004463 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIFEI - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica **CPF/CNPJ:** 21040001000130

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa **Endereço:**

Avenida BPS, nº1303

Cidade: Itajuba **Estado:** MG

CEP: 37500-903

País: Brasil **Telefone:** (35) 3622-6702

Fax:

Email: nit@unifei.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Processo para detecção e análise de Doxorubicina e substâncias correlatas por meio da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Resumo: O presente pedido de invenção descreve um processo analítico, baseado no emprego da técnica de CLAE, que permite identificar e quantificar o fármaco doxorubicina e substâncias correlatas em soluções aquosas, amostras farmacêuticas e biológicas tais como soro sanguíneo e fluidos corpóreos, mesmo em baixas concentrações (partes por bilhão).

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: DANIEL CRÍSTIAN FERREIRA SOARES

CPF: 01194115632

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Bps, 1303

Cidade: Itajubá

Estado: MG

CEP: 37500-103 **País:** BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: soares@unifei.edu.br

Inventor 2 de 4

Nome: CARLOS HENRIQUE DA SILVEIRA

CPF: 58794549672

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida BPS, nº1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903 **País:** BRASIL

Telefone: (35) 362 21691 **Fax:**

Email: carlos.silveira@unifei.edu.br

Inventor 3 de 4

Nome: FABRÍCIA NUNES DE JESUS GUEDES

CPF: 04519823633

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida BPS, nº1303

Cidade: Itajuba

Estado: MG

CEP: 37500-903 **País:** BRASIL

Telefone: (35) 362 21691 **Fax:**

Email: fabricia.jesus@gmail.com

Inventor 4 de 4

Nome: FELIPE FARINATE LOPES

CPF: 09635324642

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Bps, 1303

Cidade: Itajubá **Estado:** MG

CEP: 37500-103 **País:** BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: felipe.farinate@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	29409161929379446 - PAGA.pdf
Reivindicação	Reivindicação doxorrubicina OK.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio Doxorrubicina OK.pdf
Resumo	Resumo Doxorrubicina OK.pdf
Desenho	FIGURAS Doxorrubicina OK.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

___ SIAFI2021-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
11/02/21 10:46 USUARIO : HEBERT
DATA EMISSAO : 10Fev21 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2021GR800006
UG/GESTAO EMITENTE : 153030 / 15249 - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 153030 GESTAO : 15249
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: FEV21 VENCIMENTO: 09Mar21
DOC. ORIGEM: 153030 / 15249 / 2021NP000257 PROCESSO : 23088.001468/2020
RECURSO : 2
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161929379446
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
FATURA N°15/2021 - NIT - PROT. 23088.003648/2021-53 - NOSSO N° 294091619293794
46 - SERVIÇO: 200 - PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, MODELO DE UTILIDADE, CERTIFIC
LANCADO POR : 09766325600 - HEBERT UG : 153030 10Fev2021 17:47
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E CONTRATOS *Emitido em 11/02/2021*

DESPACHO Nº 305/2021 - CFI (11.38.05.01)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 11/02/2021 10:52)

HEBERT WESLEY PEREIRA ZARONI

FUNÇÃO INDEFINIDA CFI (11.38.05.01)

Matrícula: 2120136

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.unifei.edu.br/documentos/> informando seu número: **305**, ano: **2021**, tipo: **DESPACHO**, data de emissão: **11/02/2021** e o código de verificação: **40724e98d1**

REINVINDICAÇÕES

1. Processo para detecção e quantificação de doxorrubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a. Submeter a amostra à cromatografia líquida em uma coluna de cromatografia líquida acoplada a um detector de arranjo de diodos (DAD), em que a fase ESTACIONÁRIA utilizada é uma coluna de fase reversa C₁₈

b. Eluir a amostra utilizando uma fase móvel, com vazão mínima de 0,1 mL/min. até 3,0 mL/min. À temperatura controlada, preferencialmente empregando o fluxo de 2,0 mL/min. a 25°C

c. Identificar e quantificar a doxorrubicina ou substâncias correlatas em amostras por meio de detecção na região do espectro do ultravioleta (200 a 600 nm, preferencialmente em 487 nm) e elaboração de curva de calibração

d. Quantificar a doxorrubicina ou correlatos na amostra por meio curva de calibração.

2. Processo para detecção e quantificação de doxorrubicina ou correlatos em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas, de acordo com a reivindicação 1 etapa “a”, caracterizado pela fase ESTACIONÁRIA CONSTITUÍDA de coluna de fase reversa C₁₈.

3. Método para detecção e quantificação de doxorrubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas, de acordo com a reivindicação 1 etapa “b”, caracterizado pela fase móvel ser composta por uma mistura entre um solvente orgânico aprótico e um tampão preparado a partir de um sal.

- 4. Método para detecção e quantificação de doxorubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo solvente orgânico aprótico compreender pelo menos um dentre os solventes acetonitrila e acetona ou uma mistura entre acetonitrila e acetona, preferencialmente acetonitrila.**
- 5. Método para detecção e quantificação de doxorubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela proporção de solvente aprótico compreender um intervalo entre 30 e 75%, preferencialmente 50%.**
- 6. Método para detecção e quantificação de doxorubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo sal integrante do tampão deve compreender pelo menos um dentre os sais: acetato de sódio; acetato de POTÁSSIO; FOSFATO DE SÓDIO; FOSFATO DE POTÁSSIO, preferencialmente acetato de sódio, na**
- 7. Método para detecção e quantificação de doxorubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela concentração do sal compreender um intervalo 50 a 250 mmol/L, preferencialmente 100 mmol/L.**
- 8. Método para detecção e quantificação de doxorubicina ou substâncias correlatas em amostras aquosas, farmacêuticas e biológicas de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo pH do tampão compreender um intervalo entre 3,7 e 5,8, preferencialmente 4,6.**

- 9. Uso do processo definidos pelas reivindicações 1 a 8, caracterizado por** ser usado para identificação ou determinação de doxorubicina ou substâncias correlatas durante o desenvolvimento de formulações farmacêuticas baseadas no uso de doxorubicina ou substâncias correlatas, para utilização no tratamento do câncer
- 10. Uso do processo definido pelas reivindicações 1 a 8, caracterizado pela** identificação ou determinação de doxorubicina e substâncias correlatas durante o controle de qualidade DE PRODUÇÃO DE SOLUÇÕES INJETÁVEIS.
- 11. Uso do processo definido pelas reivindicações 1 a 8, caracterizado pela** identificação ou determinação de doxorubicina ou correlatos em amostras de resíduos hospitalares e estações de tratamento de ÁGUA e esgoto para investigar e controlar a contaminação ambiental.
- 12. Uso do processo definido pelas reivindicações 1 a 8, caracterizado pela** identificação e determinação de doxorubicina e correlatos em amostras biológicas diversas.

Processo para detecção e análise de Doxorubicina e substâncias correlatas por meio da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

CAMPO DA INVENÇÃO:

[01] A presente invenção situa-se na ÁREA da química analítica e ou ciências farmacêuticas, sendo caracterizada por um processo inovador que permite a quantificação do FÁRMACO cloridrato de doxorubicina em meio aquoso através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO / TÉCNICA RELACIONADA:

[02] A doxorubicina, ainda nos dias atuais, é um dos agentes QUIMIOTERÁPICOS mais prescritos em todo o mundo contra o câncer, devido a seu amplo espectro de EFICÁCIA terapêutica sob muitos tipos de tumores sólidos. Derivada das bactérias do gênero *Streptomyces peucetius* o antibiótico é pertencente a classe das antraciclinas, que quimicamente consiste em 4 anéis ligados a um amino açúcar. Em uso desde a década de 1960, o FÁRMACO vem sendo utilizado no tratamento de tumores de mama, OVÁRIO, bexiga, tireoide e também osteossarcomas, com relativo sucesso.

[003] Inconvenientes como a relevante cardiotoxicidade vêm motivando o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de liberação controlada como os lipossomas PEGuilados (Caelyx®) e não PEGuilados (Myocet®) que receberam autorização de uso desde os anos de 1996 e 2000, respectivamente da agência americana FDA. Essas novas formulações promoveram uma importante melhoria do perfil toxicológico do FÁRMACO, com preços ainda muito elevados nos dias de hoje, tornando o acesso ao medicamento restrito a uma pequena porção da população. Formulações de doxorubicina baseadas em cloridrato ainda integram quase que a totalidade das formulações farmacêuticas que atualmente estão em uso clínico no Brasil e em muitos países em todo o mundo. Os principais métodos analíticos atualmente utilizados na quantificação do FÁRMACO se

baseiam no uso das técnicas de espectroscopia na região do UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL).

[04] Dadas as características da doxorrubicina, que possui fluorescência intrínseca de 595 nm após excitação a 470 nm, importantes procedimentos na Área da pesquisa e aquisições de imagens, ainda na atualidade, são objeto de intensas investigações em muitos centros no mundo. Existem disponíveis na literatura trabalhos publicados onde protocolos de ANÁLISES de doxorrubicina pelo método de CLAE empregando detector de fluorescência foram desenvolvidos e validados. Entretanto, trabalhos que descrevem procedimentos que empregam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com emprego de detector com arranjos de diodos (CLAE-DAD) são escassos e não apresentam etapas de validação, processo NECESSÁRIO aos estudos laboratoriais, onde são avaliadas se a performance do método proposto e os parâmetros estabelecidos atendem ÀS exigências para a aplicação analítica pretendida. Nesse sentido, a presente invenção se baseia em um conjunto de tarefas inovadoras que permitem o doseamento do cloridrato de doxorrubicina via técnica de CLAE empregando-se o DAD que segue as normas DA RDC N° 166 DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

[05] Figura 1- Cromatogramas de DOXO obtidos na concentração de 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pela técnica de CLAE.

[06] Figura 2 - Curva analítica de calibração da DOXO obtida pela técnica de CLAE na faixa de concentração de 1 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$

[07] Figura 3 - Estudo da seletividade do método para detecção e quantificação de amostra de DOXO em SFB.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:

[08] A presente invenção descreve um processo baseado na técnica de CLAE para detectar e quantificar o FÁRMACO cloridrato de doxorubicina em amostras farmacêuticas e biológicas aquosas, tais como formulações FARMACÊUTICAS, SOLUÇÕES PREPARADAS DO FÁRMACO E soro sanguíneo.

[09] O processo para detecção e quantificação de cloridrato de doxorubicina em amostras farmacêuticas e biológicas compreende as seguintes etapas:

- a. Submeter a amostra À técnica de CLAE em uma coluna de cromatografia líquida reversa tipo C_{18} , em que a fase estacionária utilizada na coluna é caracterizada por partículas de sílica C_{18} .
- b. Eluir a amostra utilizando uma fase móvel, com vazão mínima de 0,1 mL/min até 3,0 mL/min, à temperatura controlada, preferencialmente empregando o fluxo de 2,0 mL/min., a 25°C;
- c. Identificar e quantificar a doxorubicina ou substâncias correlatas em amostras por meio de detecção na região do espectro do ultravioleta (200 a 600 nm, preferencialmente em 487 nm) e elaboração de curva de calibração.

[10] Na etapa “b”, a fase móvel pode ser composta por uma mistura de solvente orgânico aprótico e um tampão preparado a partir de um sal; sendo que o solvente orgânico aprótico pode compreender pelo menos um dentre os solventes: acetonitrila e acetona ou uma mistura entre acetonitrila e acetona, preferencialmente acetonitrila. A proporção de solvente aprótico deve compreender um intervalo entre 30 e 75%, preferencialmente 50%. O sal integrante do tampão deve compreender pelo menos um dentre os sais: acetato de sódio; acetato de POTÁSSIO; fosfato de sódio; fosfato de POTÁSSIO, preferencialmente acetato de sódio, na concentração de 50 a 250 mmol/L, preferencialmente 100 mmol/L. O pH do

tampão preparado a partir de um dos sais descritos ou a mistura deles deve compreender um intervalo entre 3,7 e 5,8, preferencialmente 4,6.

[11] O processo proposto pode ser usado para determinação de doxorubicina ou substâncias correlatas durante o desenvolvimento de formulações farmacêuticas baseadas no uso de doxorubicina ou substâncias correlatas, para utilização no tratamento do câncer; determinação de doxorubicina e substâncias correlatas durante o controle de qualidade de produção de soluções INJETÁVEIS; determinação de doxorubicina ou correlatos em amostras de resíduos hospitalares e estações de tratamento de ÁGUA e esgoto para investigar e controlar a contaminação ambiental, resultante de seu uso; determinação doxorubicina e correlatos em amostras biológicas diversas.

[12] A patente US20150299241A1 descreve a um processo para a preparação de doxorubicina de elevada pureza que envolve processos CROMATOGRÁFICOS baseados no emprego de resina macroporosa e coluna de sílica preparativa. Com essa tecnologia, os proponentes propõem evitar o uso dos métodos convencionais de cristalização e concentração que, segundo os autores, possuem baixa eficiência. Apesar dos proponentes da tecnologia utilizarem a técnica de CLAE para a quantificação da doxorubicina, encontrando o pico característico do FÁRMACO no cromatograma, após 6,7 minutos, não há qualquer detalhamento do processo utilizado para a ANÁLISE, reagentes e solventes empregados e bem como uma descrição pormenorizada do equipamento/detector utilizado.

[13] A patente US7528234B2 detalha um processo para preparação de conjugados de doxorubicina com albumina humana lacto-aminada. Os proponentes da patente utilizaram a técnica de CLAE para o desenvolvimento do conjugado mencionado. Porém, no documento, não há nenhum detalhamento do processo empregado na ANÁLISE de doxorubicina,

reagentes e ou solventes empregados e bem como uma descrição pormenorizada do equipamento/detector utilizado.

[14] A patente EP2350028A1 descreve um método de CLAE para ANÁLISE do FÁRMACO bosentana e substâncias correlatas. A tecnologia descreve de forma pormenorizada todas as condições CROMATOGRÁFICAS que permitem a reprodução da invenção e bem como detalham o equipamento e tipo de detector empregado. Porém, não faz qualquer menção do emprego do processo proposto para ANÁLISE do FÁRMACO doxorubicina ou substâncias correlatas.

[15] A patente WO2011095802A1 descreve um método de CLAE para a ANÁLISE do FÁRMACO sunitinibe e substâncias correlatas. O texto descreve todas as condições CROMATOGRÁFICAS NECESSÁRIAS para a correta ANÁLISE e quantificação do referido FÁRMACO. Descreve também de forma detalhada os reagentes ou solventes utilizados no processo. Porém, no documento não há qualquer menção de que a tecnologia desenvolvida é APLICÁVEL a ANÁLISE DE DOXORRUBICINA E SEUS DERIVADOS.

[16] A patente WO2011061545A1 descreve um método para a ANÁLISE e opcional quantificação do FÁRMACO Vorinostat. O processo CROMATOGRÁFICO empregado é detalhado no texto da invenção. Porém, não há qualquer descrição de que o processo proposto é APLICÁVEL ou adequado À ANÁLISE de doxorubicina ou correlatos.

[17] Diferentemente dos documentos supracitados onde não há qualquer menção de tecnologia de ANÁLISE e quantificação de doxorubicina, a matéria tratada na presente invenção apresenta um processo capaz de quantificar o cloridrato de doxorubicina e derivados em amostras aquosas empregando-se a técnica de CLAE, por meio de uma sequência de etapas específicas. A presente invenção pode ser mais bem compreendida através dos exemplos que se seguem, não limitantes.

[18] EXEMPLO 1 — Desenvolvimento de processo analítico para quantificação de doxorubicina e correlatos via técnica de CLAE:

[19] O processo de quantificação de doxorubicina foi desenvolvido e otimizado empregando-se a recomendações dispostas na RDC-166 da agência nacional de vigilância SANITÁRIA (ANVISA) em que o parâmetro de linearidade do processo foi avaliado.

[20] A linearidade do método foi avaliada a partir da construção da curva de calibração com soluções padrão de doxorubicina nas concentrações de 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada solução foi analisada em triplicata e a curva de calibração foi construída a partir da ÁREA dos picos versus concentração. A linearidade do método proposto foi avaliada usando o coeficiente de correlação (r) e coeficiente de determinação (r^2) da curva de calibração. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a regressão linear. A **Figura 1** mostra os cromatogramas de DOXO obtidos na concentração de 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos a partir do processo proposto, pela técnica de CLAE.

(a) Cromatograma espectral 2D onde o detalhamento dos diferentes comprimentos estudado foi avaliado (450 a 500 nm).

(b) Cromatograma convencional (absorbância versus tempo de retenção).

(c) Cromatograma espectral 3D de DOXO.

[21] A **Figura 2** mostra a curva analítica de calibração da DOXO obtida pela técnica de CLAE na faixa de concentração de 1 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

[22]EXEMPLO 2—Otimização de processo analítico de cloridrato de doxorubicina via técnica de CLAE

[23]Nesse exemplo, observando-se também o disposto na RDC-166 da ANVISA, os seguintes parâmetros do processo proposto foram avaliados:

seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

[24] A seletividade do processo foi avaliada a partir das ANÁLISES de Soro Fetal Bovino (SFB) em pH igual a 7,4, comparando-a À solução com presença de doxorubicina. A **Figura 3** mostra o resultado do estudo da seletividade do método para detecção e quantificação de amostra de cloridrato de doxorubicina em soro fetal bovino (SFB), conforme:

(a) Cromatograma convencional obtido em amostra de SFB.

(b) Cromatograma convencional obtido em amostras de DOXO em SFB.

[25] Foi calculado o coeficiente de variação para cada concentração da amostra analisada e todos os resultados obtidos a partir das condições CROMATOGRÁFICAS foram comparados com resultados de ANÁLISES obtidos em condições normais por meio da exatidão. Os limites de detecção e quantificação foram calculados usando-se as **Equações 1 e 2**, respectivamente. O valor calculado para o limite de quantificação foi de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e se encontra dentro da curva de calibração, conforme recomendado pela ANVISA. O valor calculado para o limite de detecção encontrado foi de 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto, foi possível, pelo método visual, detectar a presença de DOXO em concentração de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

[26] $LD=3,3 \times s/S$ (**Equação 1**)

[27] $LQ=10 \times s/S$ (**Equação 2**)

[28] A precisão do método foi avaliada pela dispersão entre as ANÁLISES repetidas em triplicatas de quatro concentrações diferentes. Para precisão intra-dia e inter-dia, foram feitas três ANÁLISES em intervalos de 2h e 48h, respectivamente. A precisão foi expressa como porcentagem do coeficiente de variação de cada concentração da amostra analisada conforme os dados apresentados na **Tabelas 1 e 2** para a precisão do processo observando os intervalos de tempo intra-dia e inter-dia. Na **Tabela 3** estão apresentados os dados obtidos para a exatidão do processo.

[29] **Tabela 1.** *Precisão intra-dia do método para quantificação da DOXO por CLAE*

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Hora	Concentração experimental Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) n=3	CV (%)
20,00	1	23,02	3,44
	2	22,82	3,23
80,00	1	78,80	4,20
	2	80,21	4,93
150,00	1	146,70	2,05
	2	151,45	1,50
200,00	1	196,48	3,94
	2	192,80	3,28

[30] **Tabela 2.** *Precisão inter-dia do método para quantificação da DOXO por CLAE*

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Dia	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) n=3	CV (%)
20,00	1	22,42	2,32
	2	22,82	3,23
80,00	1	79,142	4,52
	2	80,21	4,93
150,00	1	149,55	2,75
	2	151,45	1,50
200,00	1	192,99	0,30
	2	192,79	3,28

[31] **Tabela 3.** *Exatidão do método para quantificação da DOXO por CLAE*

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	R (%)	CV (%)
10,00	11,44	114,39	3,22
100,00	99,58	99,58	3,46
180,00	180,81	100,45	0,50

*As concentrações experimentais foram calculadas através da subtração de branco analítico.

[32] A avaliação da exatidão do método foi baseada em teste de recuperação, realizado com amostra de tampão fosfato de sódio utilizado como branco em pH igual a 5,8 e concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O percentual de recuperação (%R) foi calculado conforme a **Equação 3**. Em seguida foi calculado o coeficiente de variação, conforme a **Equação 4**, para cada concentração da amostra analisada.

[33] $\%R = C_{em}/C_r \times 100$ (**Equação 3**) Onde: C_{em} é a concentração experimental média; C_r é a concentração real

[034] $CV(\%) = DP/X \times 100$ (**Equação 4**)

[35] O estudo da robustez do processo foi realizado alterando as seguintes VARIÁVEIS: temperatura da coluna, concentração e pH da fase móvel). Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. A **Tabela 4** apresenta os dados obtidos quando variada a concentração da fase móvel. As medidas experimentais foram feitas por CLAE para as seguintes concentrações: 25, 120 e $225 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados revelam que a variação da concentração da fase móvel adotada não interferiu de maneira significativa nos resultados obtidos comprovado pelos baixos coeficientes de variação encontrados.

[36] **Tabela 4.** Variação da concentração da fase móvel para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO através da técnica CLAE

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração da fase móvel (mol L^{-1})	% R	CV (%)
25,00	26,50		105,99	1,62
120,00	119,23	C= 0,100	99,36	3,43
225,00	224,81		99,91	0,45

10/11

25,00	24,69		98,74	2,18
120,00	115,99	C= 0,095	96,66	1,57
225,00	221,86		98,60	0,23
25,00	25,11		100,43	2,62
120,00	115,39	C= 0,098	96,16	3,36
225,00	221,49		98,44	0,45

[37] O pH da fase móvel foi outro parâmetro alterado no estudo da robustez. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5 e indicam que não houve considerável alteração dos resultados em função da variação do pH.

[38] **Tabela 5.** Variação do pH da fase móvel para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO através da técnica de CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental	pH	% R	CV (%)
	média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
25,00	25,68		102,73	1,37
120,00	116,99	4,5	97,49	2,44
225,00	223,54		99,35	0,33
25,00	26,50		105,99	1,62
120,00	119,23	4,6	99,36	3,43
225,00	224,81		99,92	0,45
25,00	25,21		100,85	1,49

120,00	117,51	4,7	97,92	3,41
225,00	224,38		99,72	0,32

[39] A temperatura da coluna foi variada em 25, 28 e 30°C a fim de verificar se haveria influência na robustez do método e os dados compõem a **Tabela 6**. Notou-se que a variação dos valores da temperatura não incidiu nos resultados, o que sinaliza que o método desenvolvido se mostrou robusto.

[40]**Tabela 6**. Variação da temperatura da coluna para investigação da robustez do método para quantificação da DOXO através da técnica de CLAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Temperatura da coluna experimental ($^{\circ}\text{C}$)	% R	CV (%)
25,00	26,50		105,99	1,62
120,00	119,23	25	99,36	3,43
225,00	224,81		99,91	0,45
25,00	27,13		108,53	1,13
120,00	116,38	28	96,99	2,31
225,00	221,10		98,27	0,30
25,00	26,53		106,13	0,91
120,00	115,41	30	96,18	2,42
225,00	220,80		98,13	0,26

RESUMO

Processo para detecção e análise de Doxorrubicina e substâncias correlatas por meio da técnica de Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

O presente pedido de invenção descreve um processo analítico, baseado no emprego da técnica de CLAE, que permite identificar e quantificar o FÁRMACO doxorrubicina e substâncias correlatas em soluções aquosas, amostras farmacêuticas e biológicas tais como soro sanguíneo e fluidos corpóreos, mesmo em baixas concentrações (partes por bilhão).

1/1
FIGURAS

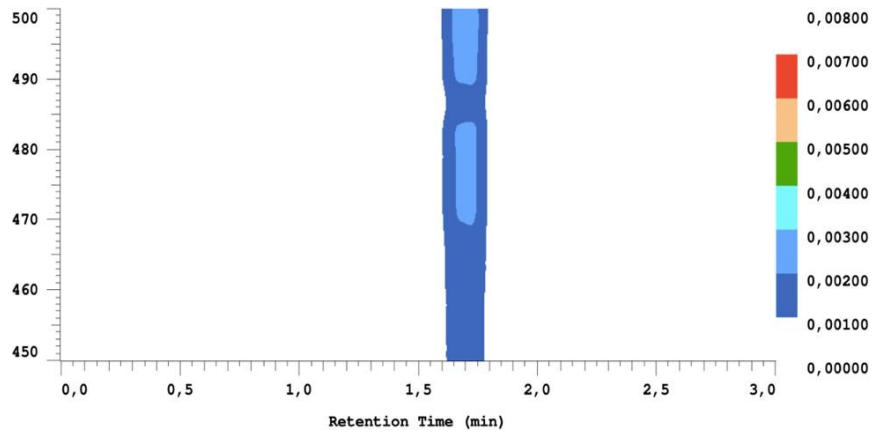


Figura 1 A

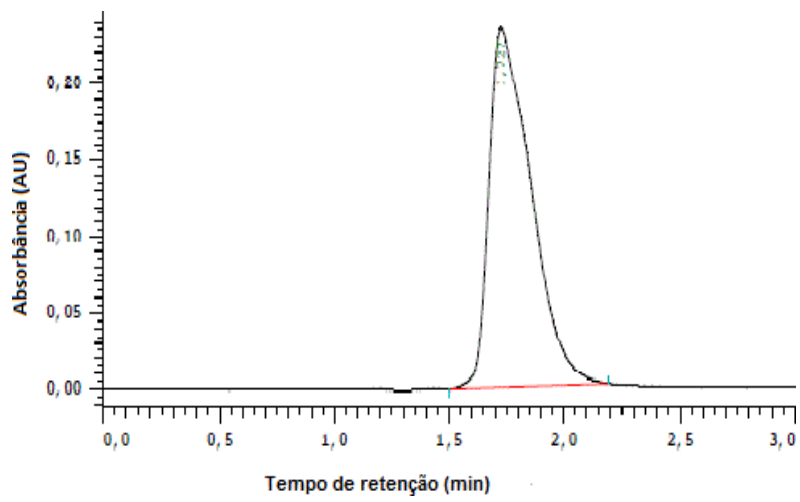


Figura 1 B

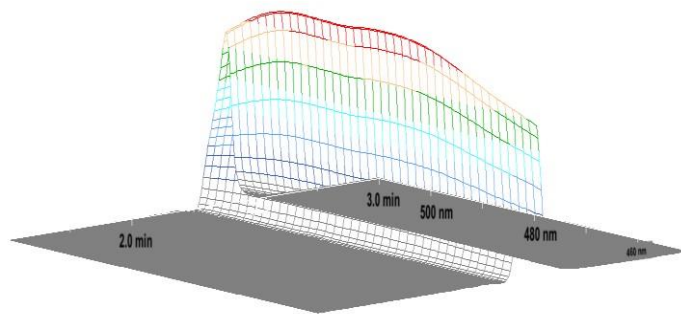


Figura 1 C