

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento de Método Analítico Para Quantificação de
Antineoplásico em Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Fernando Kaneko Prado

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. María Segunda Aurora Prado

Coorientadora: Prof.^a Dra. Eliana Martins Lima

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento de Método Analítico Para Quantificação de
Antineoplásico em Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Fernando Kaneko Prado

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. María Segunda Aurora Prado

Coorientadora: Prof.^a Dra. Eliana Martins Lima

Versão Corrigida

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Márcia Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P896d Prado, Fernando Kaneko
Desenvolvimento de Método Analítico Para
Quantificação de Antineoplásico em Sistemas de
Liberação Controlada de Fármacos / Fernando Kaneko
Prado. - São Paulo, 2019.
59 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Prado, Maria Segunda Aurora

1. nanotecnologia. 2. eletroforese capilar. 3.
sistema de liberação controlada de fármacos. I. T.
II. Prado, Maria Segunda Aurora, orientador.

Fernando Kaneko Prado

Desenvolvimento de Método Analítico Para Quantificação de
Antineoplásico em Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Comissão Julgadora

da

Dissertação para Obtenção do Título de Mestre.

Prof.^a Dra. Maria Segunda Aurora Prado

Orientadora/Presidente

Prof.^a Dra. Thais Leite Nascimento

Prof.^o Dr. Henrique Eisi Toma

Prof.^o Dr. Francisco Rolando Valenzuela Diaz

São Paulo, ____ de _____ de 2019.

Dedico este trabalho ao meu pai Fernando Luis do Prado por seus conselhos e contribuições a mim dedicados durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao senhor Jesus que tornaram este trabalho e minha existência possíveis.

Aos meus pais Fernando Luis do Prado e Luciane Yagui Kaneko Prado, por todos os ensinamentos, conselhos, apoio e carinho durante minha vida.

Aos meus avós paternos Celso Massashi Kaneko e Maura Akiko Yagui Kaneko por todo apoio, incentivo, confiança e estarem sempre ao meu lado durante minha vida.

Aos meus avós paternos Sebastião Luis do Prado e Maria José Porto do Prado por entenderem minha ausência e incentivarem a conclusão desta etapa em minha vida.

Aos meus irmãos Bruno Kaneko Prado e Gabriel Kaneko Prado, pelo incentivo e momentos de descontração quando necessários.

À Prof^a.Dra. María Segunda Aurora Prado, pela orientação, confiança, incentivo a vida acadêmica e suporte em todo este trabalho.

À Prof^a.Dra. Veni Maria Andres Felli, pela credibilidade depositada em mim desde a iniciação científica, apoio e orientação, sendo a primeira professora a acreditar em mim.

À Prof^a.Dra. Eliana Martins Lima pelas sugestões, orientação, suporte técnico e material.

À Prof^a.Dra. Marina Franco Maggi Tavares pelas sugestões, suporte técnico e material.

À Prof^a.Dra. Danielle Guimarães Diniz pelas sugestões, orientação e suporte técnico.

À Prof.Dr. Henrique Eisi Toma pelo suporte técnico e material e aos seus alunos Bruno Bitarães e Fernando.

Ao Diego Marcel Fagundes por me incentivar, apoiar e estar ao meu lado ouvindo meus desabafos nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do período da Iniciação Científica no de Síntese: Jamille Carvalho Rocha, Bruna Roncoleta Dangelo, Ellys, Rosania e Charles.

Aos Amigos do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de Fármacos e Cosméticos: Andrea Sofo, Laura Victoria Español Mariño, Aline de Souza, Claudia Oliveira, Adriana de Vicente França Marcondes, Lourdes Marcela Yataco Lazaro, Octávio Valentim Lourenço, Frank Alonso Gaviliano Fajardo, Amanda Beatriz Barros

e Francielle Regina Silva Dias. Muito obrigado pelos momentos de aprendizado e descontração compartilhados.

Ao amigo do Laboratório de Farmacotécnica: Edilson Marcelo Nazareth Junior.

À Fabiana Vaz Tosta pela amizade, companheirismo, conselhos pessoais e profissionais.

Aos amigos do Farmatec: Ana Paula Bernardes Almeida, Christiane França Martins, Rayane Santa Cruz M. de Queiroz Antonino, Mariana O. Vasconcelos, Ana Luiza R. de Souza, Luis Antonio Dantas Silva, Marcília V. Pavam Gonçalves, Emílio Ramos Cintra, Danillo Fabrini M. Costa Veloso, Jeane R. Santana de Faria, Cesar A. de Araújo Jr, Natalia Grillo Tomé, Thais Leite Nascimento, Iara M. O. Viana, Lilian Cristina R. dos Santos, Edilson Ribeiro de Oliveira Junior, Sarah Rodrigues Fernandes, Relton Romeis de Oliveira, Eleonora Truzzi, Leonardo Gomes Souza e Thiago Miguel Garcia Cardoso. Muito obrigado pelos momentos de aprendizado e descontração compartilhados.

Às alunas Sara Guedes de Carvalho Rocha, Michele Coité e Amanda Porfírio pela confiança e participação no trabalho de vocês.

Às professoras que participaram da banca de seleção Dra. Vladi Olga Consiglieri, Dra. Cristina Helena Reis Serra e Dra. Maria Valéria Robles Velasco por acreditarem no meu potencial e no meu projeto.

Aos conselhos dos professores que participaram da banca de qualificação Dr. Luiz Carlos Martins das Neves e Dr. Henrique Eisi Toma.

Aos funcionários da pós-graduação David Filho, Irineu, Sueli, Alexandre, Sandra e Kelma pela presteza e cordialidade.

A todas as pessoas que não mencionei e que dispensaram a mim o seu tempo e atenção colaborando neste trabalho, muito obrigado.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTINEOPLÁSICO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Nos últimos anos têm crescido cada vez mais o número de pesquisas envolvendo nanotecnologia para obtenção de medicamentos com liberação controlada, pois esses sistemas podem: proteger o fármaco de incompatibilidades tanto biológicas quanto físico-químicas assim como controlar a biodisponibilidade do fármaco. Embora com todas essas vantagens não existem métodos *in vitro* realmente capazes de prever com precisão a liberação dos fármacos por esses sistemas, por esse motivo, é muito importante o desenvolvimento de métodos de liberação *in vitro* para determinar a cinética de liberação desses sistemas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar os métodos de eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar a eficiência de encapsulação do fármaco imatinibe em nanopartículas previamente elaboradas e caracterizadas, assim como estudar sua liberação *in vitro* por CE. As nanopartículas foram desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação. A eletroforese capilar é uma técnica alternativa muito promissora em relação ao HPLC devido ao seu baixo custo, menor tempo de corrida e menos poluente ao meio ambiente. Os métodos de quantificação por CE e HPLC foram desenvolvidos e validados segundo as diretrizes do ICH, Farmacopeia Americana e ANVISA, permitindo desenvolver um estudo de liberação. As nanoesferas desenvolvidas apresentaram diâmetro médio próximo a 150nm, com índice de polidispersão menor que 0,1 e aproximadamente 90% de eficiência de encapsulação. Ambos métodos se mostraram lineares com coeficientes de determinação superiores a 0,99, os métodos se mostraram precisos (%DPR < 2), exatos (101,0±4,2% e 98,0±2,5% para HPLC e CE, respectivamente) e seletivos. O método de CE permitiu desenvolver um método de estudo de liberação independente das membranas de diálise.

Palavras-chave: nanopartículas, imatinibe, eletroforese capilar, estudo de liberação, carreadores de fármacos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF ANTINEOPLASTIC IN DRUG DELIVERY SYSTEMS

In recent years, there has been a growing number of researches involving nanotechnology to obtain controlled release drugs, these systems can: protect the drug against biological and physico-chemical incompatibilities; controlling the bioavailability of the drug. Although with all these advantages there are no in vitro methods really capable of accurately predicting drugs release by such systems, therefore, the development of in vitro release methods to determine the release kinetics of such systems is very important. The objective of the present work was to develop and validate capillary electrophoresis (CE) and HPLC methods to determine the encapsulation efficiency of the imatinib drug in previously elaborated and characterized nanoparticles, as well as to study its release in vitro by CE method. The nanoparticles were synthesized using the nanoprecipitation method and characterized by size, zeta potential, morphology and encapsulation efficiency. Capillary electrophoresis is a very promising alternative to HPLC because of its low cost, less runtime and less polluting environment. The CE and HPLC methods were developed and validated according ICH, American Pharmacopoeia and ANVISA guidelines. Developed nanospheres had an average diameter close to 150nm, with polydispersity index less than 0.1 and approximately 90% encapsulation efficiency. Both methods were linear with determination coefficients higher than 0.99, the methods were precise (%RSD < 2), accurate ($101.0 \pm 4.2\%$ and $98.0 \pm 2.5\%$ for HPLC and CE, respectively) and selective. Capillary electrophoresis method allowed to develop a drug release study independent of dialysis membranes.

Keywords: nanoparticles, imatinib, capillary electrophoresis, release assay, drug carriers.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Quantidade dos Componentes Utilizados na Obtenção das Nanoesferas.....	31
TABELA 2: Condições de Trabalho Empregadas no Método Quantitativo por CLAE.....	34
TABELA 3: Condições Empregadas no Método Quantitativo por CE.....	35
TABELA 4: Caracterização das Nanopartículas quanto ao Diâmetro Médio, Pdl e Potencial Zeta.....	40
TABELA 5: Resultados Utilizados na Curva Analítica do Método de Quantificação de Imatinibe por HPLC.....	44
TABELA 6: Resultados obtidos para cálculo da precisão intra-dia e inter-dia. Método HPLC.....	45
TABELA 7: Resultados Obtidos para Cálculo da Exatidão. Método HPLC.....	45
TABELA 8: Resultados Obtidos para Cálculo do Limite de Detecção do Método HPLC.....	47
TABELA 9: Resultados Obtidos para Cálculo do Limite de Quantificação do Método HPLC.....	47
TABELA 10: Resultados obtidos na Curva Analítica do Imatinibe do CE.....	50
TABELA 11: Resultados estatísticos da curva analítica e limites de detecção e quantificação. Método CE.....	51
TABELA 12: Resultados Obtidos para Precisão e Exatidão do Método CE.....	51
TABELA 13: Resultados obtidos para a Exatidão. Método CE.....	52
TABELA 14: Eficiência de Encapsulação.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação Esquemática de NPs e NEs.....	18
FIGURA 2: Fórmula Estrutural do Imatinibe.....	22
FIGURA 3: Sistema de Eletroforese Capilar.....	24
FIGURA 4: Microscopia Eletrônica de Transmissão das Nanoesferas de Imatinibe Mantidas em Geladeira.....	42
FIGURA 5: Microscopia Eletrônica Transmissão das Nanopartículas Liofilizadas	42
FIGURA 6: Curva analítica do imatinibe, método HPLC.....	43
FIGURA 7: Cromatogramas de Imatinibe 60,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e nanopartículas brancas..	45
FIGURA 8: Curva analítica do imatinibe na faixa de concentração de 20,00 a 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	48
FIGURA 9: Eletroferogramas de Imatinibe e Gencitabina (A); nanopartículas branca (B).....	50
FIGURA 10: Curva de Liberação de Imatinibe pelas Nanoesferas de PCL.....	52

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Limite de detecção.....	35
Equação 2: Limite de quantificação.....	35
Equação 3: Desvio Padrão Relativo.....	36
Equação 4: Cálculo da Exatidão.....	36

LISTA DE ABREVIações

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina Trifosfato

CE – Eletroforese Capilar

cm - centímetro

CM – Concentração Média

CME – Concentração Média Encontrada

CT – Concentração Teórica

ddp – diferença de potencial

DI – Diâmetro Interno

DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico

DP – Desvio Padrão Médio

DPR – Desvio Padrão Relativo

EOF – Fluxo Eletrosmótico

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

FSCE – Eletroforese Capilar em Solução Livre

h – hora(s)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

I – Inclinação da Curva Padrão

ICH – *International Conference on Harmonization*

inj - injeção

kV–quilovolts

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg – miligramas

min - minutos

mL - mililitro

mm – milímetro

NCs – Nanocápsulas

NEs – Nanoesferas

nm - nanômetro

NPs – Nanopartículas Poliméricas

PACA – Poli alquil cianoacrilato

PBCA – Poli (n-Butil cianoacrilato)

PCL – Poli (ε-caprolactona)

PdI – Índice de Polidispersão

pH – potencial Hidrogeniônico

PI – Padrão Interno

pKa – Constante de Dissociação Ácida

PLA – Ácido poli (D,L-ácido láctico)

PLGA – Ácido poli (lactídeo-co-glicosídeo)

PMMA – Polimetacrilato de Metila

ppm – parte por milhão

psi – libra-força por polegada quadrada

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – rotações por minuto

s - segundos

SPAN 60 – Monoestearato de Sorbitano

TWEEN 80 – Polissorbato 80

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta - Visível

WHO - World Health Organization

µg– micrôgrama

µL – microlitro

µm – micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 NANOTECNOLOGIA	19
1.2 IMATINIBE	21
1.3 ELETROFORESE CAPILAR.....	23
1.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 MATERIAL.....	29
3.1.1 FÁRMACOS.....	29
3.1.2 SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	29
3.1.3 EQUIPAMENTOS	29
3.2 MÉTODOS	31
3.2.1 FORMULAÇÕES DAS NANOESFERAS	31
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS NANOPARTÍCULAS	32
3.2.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

O uso da nanotecnologia em pesquisas clínicas e farmacêuticas tem se estabelecido na forma de carreadores de fármacos, dentre eles podemos citar: lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, niossomas, entre outros, eles melhoram a farmacocinética das substâncias, prolongando sua ação e dirigem os fármacos aos sítios de ação, alterando a permeabilidade da substância, reduzindo os efeitos tóxicos, e ainda protegem suas estruturas de interferentes biológicos. Outra grande vantagem deste sistema é possuir tamanhos bastante reduzidos, podendo atravessar barreiras biológicas, o que facilita a terapêutica em muitas patologias (RODOVALHO, 2007).

As nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas coloidais constituídos de polímeros naturais ou sintéticos. A variabilidade de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis têm destacado estes sistemas como promissores carreadores de fármacos. Estas NPs podem ser classificadas em dois grupos: as nanoesferas (NEs) onde o fármaco está disperso, formando um sistema matricial, ou nanocápsulas (NCs) contendo um núcleo lipídico, neste sistema se o fármaco estiver dissolvido neste lipídio forma um sistema reservatório, se o fármaco estiver adsorvido na parede polimérica temos um sistema matricial, portanto neste segundo sistema podemos ter dois tipos diferentes de sistemas carreadores de fármaco, esta diferença está representada na Figura 1. A liberação das nanoesferas pode ser controlada por três mecanismos, ou pela combinação destes: difusão através da matriz polimérica, transporte mediado por água e erosão e hidrólise polimérica (SOFO, 2015; DOTY, *et. all.*, 2017).

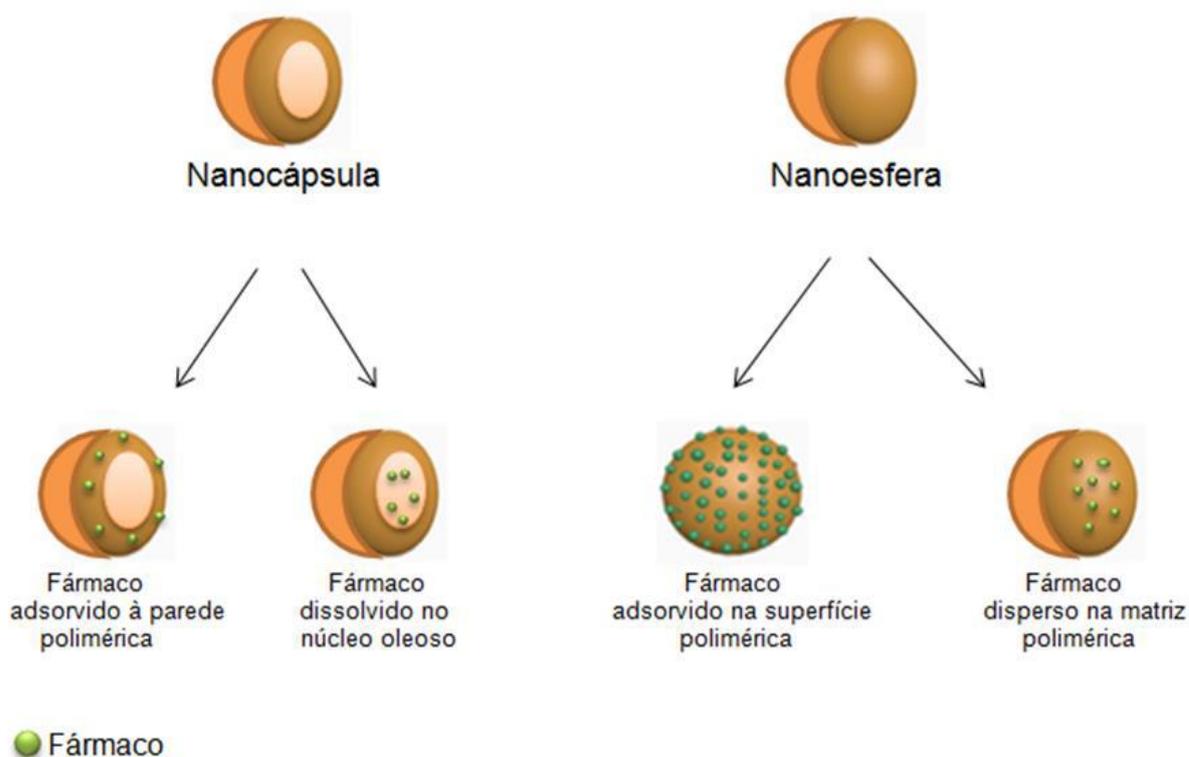


FIGURA 1: Representação esquemática de NPs e NEs (Adaptado de SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003; SOFO, 2015).

Embora com todas essas vantagens não existam métodos *in vitro* realmente capazes de prever com precisão a liberação dos fármacos por esses sistemas, por esse motivo, é muito importante o desenvolvimento de métodos de liberação *in vitro* para determinar a cinética de liberação desses sistemas, uma vez que os fármacos presentes nestes apresentam uma farmacocinética totalmente diferente dos fármacos livres (FU, KAO, 2010) Para tentar solucionar esta questão propusemos desenvolver um estudo de liberação utilizando eletroforese capilar, do inglês capillary electrophoresis (CE), utilizando imatinibe como fármaco modelo encapsulado em nanoesferas.

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica na qual separa compostos iônicos ou ionizáveis sob influência de um campo elétrico, este processo vem sendo muito utilizado desde a década de 1930, principalmente em compostos na área de bioquímica (SANTOS, TAVARES, RUBIM, 2000).

Eletroforese capilar é uma técnica bastante versátil, pois por ela pode se separar desde íons inorgânicos até moléculas de alto peso molecular, contudo algumas amostras requerem um pré-tratamento antes de serem introduzidas no sistema eletroforético. Dentre esses pré-tratamentos destacam-se: a extração, a filtração, a centrifugação e a diluição (MIRANDA, et. al., 2002).

Este estudo desenvolveu uma das formas mais eficientes e modernas dos sistemas de liberação prolongadas de fármacos, nanoesferas. Após esse processo, foi desenvolvido um método de quantificação e liberação(CE), com menor custo, mais rápido e menos prejudicial ao meio ambiente que a usual cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por necessitar menos solventes orgânicos, tornando-se uma excelente alternativa.

1.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia, de acordo com a *Europe Medicines Agency*, compreende no uso e estudo de estruturas menores que $1\mu\text{m}$, aplicando propriedades específicas a cada sistema desenvolvido (COUVREUR; VAUTHIER, 2006).

Nos últimos anos têm crescido cada vez mais o número de pesquisas envolvendo nanotecnologia para obtenção de medicamentos com liberação controlada, pois esses sistemas podem: proteger o fármaco de incompatibilidades tanto biológicas quanto físico-químicas; controlar a biodisponibilidade do fármaco, desta forma o fármaco se apresenta na maior parte do tempo dentro da janela terapêutica; direcionar o fármaco até o local de ação diminuindo efeitos adversos e efeitos colaterais. A aplicação da nanotecnologia para fins de tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos foi denominada “Nanomedicina” pelo National Institute of Health nos EUA (BARBOSA, 2011; YU, et. all., 2017).

A nanotecnologia produz vários sistemas carreadores de fármacos são eles: lipossomas, niossomas, nanopartículas lipídicas, microemulsões, dendrímeros e nanopartículas poliméricas (RODOVALHO, 2007, DUNCAN, 2005).

1.1.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Vários estudos provam que os sistemas de liberação de fármacos de longa duração podem ser não mediados por receptor para vários tipos de tumores, pelo fato de eles poderem circular por tempo prolongado e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada. Locais de infecção, inflamação e tumores possuem uma angiogênese exacerbada, a alta produção de vasos em um curto período de tempo pode produzir vasos porosos, podendo ser chamados de vasos fenestrados (TANGRI, 2011).

1.1.1.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas nanoestruturados compostos de polímeros naturais ou sintéticos, é importante ressaltar que esses polímeros devem ser biodegradáveis e biocompatíveis, e tensoativos com diâmetros entre 10 a 1000 nm. Esta definição engloba uma diversidade de estruturas, contudo as mais utilizadas são as nanoesferas, onde o fármaco fica adsorvido no polímero e deste modo formando um nanosistema matricial; e as nanocápsulas que contém um núcleo oleoso coberto por um invólucro polimérico neste tipo de nanosistema o(s) fármaco(s) é/são dissolvido(s) no núcleo oleoso formando um sistema reservatório, ou ele pode estar adsorvido no invólucro polimérico formando um sistema matricial. O método mais utilizado para síntese destes sistemas é o método da nano precipitação, este método consistem em preparar duas fases: uma orgânica e uma aquosa, após preparar as duas fases vertesse a fase orgânica contendo o polímero sobre a fase aquosa para que eles precipitem formando as nanopartículas, deixa-se esta suspensão sob agitação e aquecimento e retira-se os solventes e a água por rotaevaporação sob pressão reduzida. Os principais polímeros utilizados nestes sistemas são: gelatina, quitosana, polilático (PLA), Ácido poli (lactídeo-co-glicosídeo) (PLGA), Poli (ε-caprolactona)(PCL), Poli alquil

cianoacrilato(PACA),Polimetacrilato de Metila(PMMA), Poli (n-Butil cianoacrilato) (PBCA) (ESPAÑOL MARIÑO, 2015; SCHAFFAZIC *et al.*, 2003; FARAJI, WIPF, 2009).

1.1.1.2 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Por décadas o estudo de liberação de fármacos tem sido um importante assunto discutido, pois com o avanço da nanotecnologia sistemas cada vez mais complexos tem sido desenvolvidos modificando assim a farmacocinética e trazendo inúmeras vantagens, dentre elas, maximizar a bioeficácia, facilitar a aplicabilidade clínica e melhorar do paciente. Liberação de fármacos refere-se ao processo no qual o fármaco migra da sua posição inicial no sistema para a superfície externa do sistema, no caso deste trabalho polímero, e posteriormente para o meio de liberação; embora pareça um processo relativamente simples pode ser afetado por inúmeros fatores, por exemplo, em relação à matriz: composição do material, estrutura, degradação e intumescimento; em relação ao meio de liberação: pH, temperatura, força iônica e enzimas; em relação ao fármaco: estabilidade, solubilidade, carga e interação com a matriz. Em geral, a difusão do fármaco, o intumescimento da matriz e a degradação dos componentes da matriz são sugeridos serem as principais forças motrizes para o transporte do fármaco do sistema para o meio (FU, KAO, 2010; ROESE, BUNJES, 2017).

1.2 IMATINIBE

O imatinibe, desenvolvido para tratar a Leucemia Mielóide Crônica (LMA) na fase Crônica da patologia, foi o primeiro inibidor de alvo molecular de proteinocinases a receber aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA). Seu mecanismo de ação se dá através de sua ligação a um segmento do domínio da cinase que fixa a enzima em um estado não funcional, no qual a proteína é incapaz de se ligar a seu substrato doador de ATP (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Estudos apontam que o imatinibe tem boa absorção oral chegando às concentrações plasmáticas máximas entre 2-4horase sua meia vida vai de 18 a 40 horas (GOODMAN & GILMAN, 2012).

Apesar de ter sido desenvolvido para o tratamento da LMA, o imatinibe (FIGURA 2)pode ser utilizado para tratar outros tipos de patologias, como por exemplo, tumores do estroma gastrointestinal, leucemia mielocítica crônica, síndrome de hipereosinofilia e dermatofribrossarcoma protuberante (GOODMAN & GILMAN, 2012).

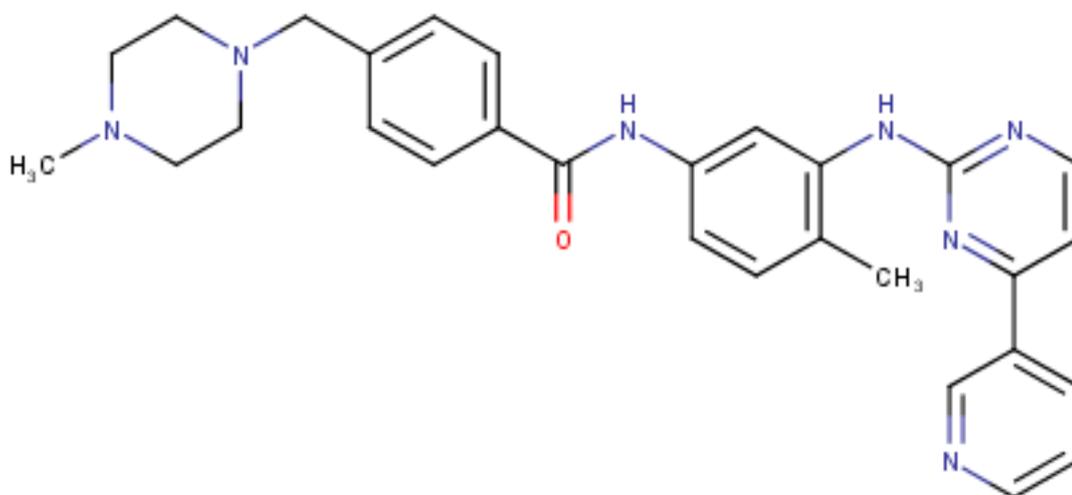


FIGURA 2: Fórmula estrutural do imatinibe.

Quanto suas propriedades físico-químicas o imatinibe possui fórmula molecular $C_{29}H_{31}N_7O$, peso molecular igual a $493,615 \text{ g.mol}^{-1}$, coeficiente de partição $\text{LogP} = 4,38$, seu sal (Mesilato de Imatinibe) possui boa solubilidade em pH menores que 5,5, porém é praticamente insolúvel em pH fisiológico (7,4), possui valores de constante de dissociação ácida pKa variando entre 1,46 e 12,69 (CHEMICALIZE.org, 2019).

1.3 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar é uma técnica que começou a ser desenvolvida na década de 30, mas só começou a se popularizar na década de 80, desde então tornou uma alternativa muito promissora em relação à HPLC e cromatografia à gás (GC) devido ao seu baixo custo, menor tempo de corrida e menos poluente ao meio ambiente (TAVARES, 1996; BAN, YOO, SONG, 2015)

Embora no Brasil esta técnica seja pouco utilizada na Europa mais de 60% das análises são realizadas por CE e nos Estados Unidos (EUA) cerca de 40%. ACE é uma técnica na qual espécies ionizadas ou ionizáveis migram ao longo do capilar quando estas são dissolvidas ou suspensas num eletrólito, através do qual é aplicada uma corrente elétrica (de OLIVEIRA, 2015).

A CE é constituída por um capilar de sílica fundida revestida externamente por uma camada de poliimida, as extremidades desse capilar são ligadas a dois reservatórios contendo uma solução eletrolítica, chama de eletrólito de corrida, nesses reservatórios é aplicada uma tensão através de uma haste de platina, o eletrodo. O analito pode ser introduzido eletrocineticamente (gradiente de potencial), ou hidrodinamicamente (pressão, vácuo ou gravidade). Um detector é conectado ao capilar que fornece os sinais a um sistema gerador dos eletroferogramas. Podemos observar este aparato na Figura 3, (ADELANTADO, et. al., 2016; AURORA-PRADO, et al, 2000; BONATO, 2005; GERVASIO, 2003)

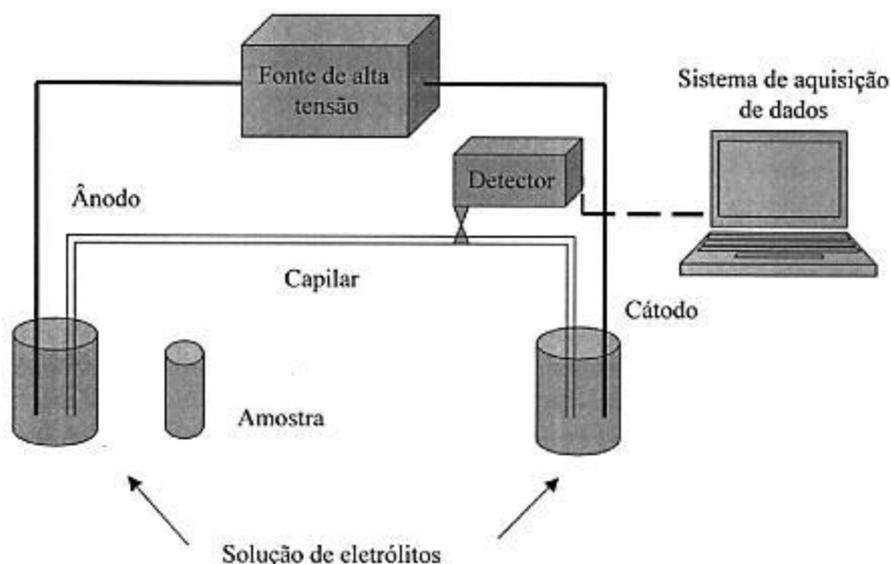


Figura 3: Sistema de Eletroforese Capilar (BONATO, 2005).

Os agrupamentos silanóis do capilar em contato com meio aquoso ficam negativamente carregados. Quando um campo elétrico é imposto às forças elétricas se movimentam unilateralmente em direção ao cátodo. A este movimento denominamos fluxo eletrosmótico normal (EOF) (SPUDEIT, 2012).

Vários sistemas de detecção podem ser utilizados na eletroforese capilar como, por exemplo: absorção no UV-VIS, fluorescência, métodos eletroquímicos, condutividade, espectrometria de massas, entre outras (TAVARES, 1996; VEUTHEY, 2005).

A velocidade de separação das substâncias pela eletroforese capilar é influenciada pela diferença de potencial ($\Delta\phi$) e o pH do eletrólito, pois de acordo com o pK_a do analito ele pode estar carregado eletricamente ou neutro, substâncias neutras não são atraídas, portanto migram com o EOF (ALTRIA, 1996; SILVA, 2007).

A eletroforese capilar em solução livre (FSCE) é um dos modos de separação mais utilizados, pelo sua fácil aplicação a técnica consiste simplesmente em preencher o capilar com o eletrólito e injetar o analito (SILVA, 2007).

1.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação de um método analítico vem a ser um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. A validação de métodos analíticos é de suma importância pois através dela comprova-se a confiabilidade e eficiência do método. No Brasil a validação de métodos analíticos deve seguir as diretrizes da ANVISA, que estabelece os procedimentos para validação de métodos através da resolução RDC nº 166/2017. Para atender esta resolução devem ser certificados os seguintes parâmetros: linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (ANVISA, 2017; GIL, 2010).

1.4.1 LINEARIDADE.

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise. A linearidade é obtida a partir da curva de calibração que representa a resposta em função da concentração (ICH, 2005). A determinação da linearidade exige a análise de no mínimo cinco concentrações diferentes, em triplicata, de soluções-padrão. Os dados obtidos permitem determinar a equação da reta ($Y = bx + a$) e os parâmetros: inclinação (b), ponto de intersecção com o eixo Y (a), coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou calculada por regressão linear (ICH, 2005).

1.4.2 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, no método de análise empregado sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2018).

1.4.3 PRECISÃO

A precisão é o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais, representado pelo desvio padrão relativo (DPR)(ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2018).

Repetitividade

Repetitividade é a variação das análises obtidas por um operador, utilizando um método sem variar o equipamento, ao repetir várias vezes uma grandeza (ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2018).

Precisão Intermediária

Precisão intermediária é a variação das análises obtidas de uma mesma amostra, por operadores diferentes em dias diferentes em equipamentos distintos (ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2018).

1.4.4 ESPECIFICIDADE

A especificidade do método é definida como a capacidade do método de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como impurezas, compostos de degradação ou componentes do veículo (ICH, 2005).

1.4.5 EXATIDÃO

A exatidão representa o grau de concordância com os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, ou seja, é a aptidão da técnica de obter o resultado médio próximo ao real (ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2018).

1.4.6 ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações

nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver nanopartículas contendo imatinibe caracterizá-las físico-quimicamente, desenvolver método analítico por CE para quantificação de imatinibe em nanoesferas e desenvolver um estudo de liberação de fármacos *in vitro* desses sistemas de liberação controlada por CE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolvimento das nanopartículas;

Determinação do diâmetro médio e Índice de polidispersão das nanopartículas;

Determinação do Potencial Zeta das nanopartículas;

Determinação da morfologia das nanopartículas;

Desenvolvimento e validação dos métodos por eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência;

Aplicação dos métodos desenvolvidos para a determinação da eficiência de encapsulação das nanopartículas por CE e HPLC;

Desenvolvimento do método de estudo de liberação das nanopartículas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 PADRÕES

Imatinibe base (Sigma-Aldrich), mesilato de imatinibe (Sigma-Aldrich) e cloridrato de gencitabina (Sigma-Aldrich).

3.1.2 SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES

Clorofórmio grau HPLC, metanol grau HPLC, etanol grau HPLC, acetona grau HPLC, monoestearato de sorbitano (span60), polissorbato 80 (tween 80), água destilada, água Mili-Q, ácidos inorgânicos, bases inorgânicas, sais inorgânicos, acetato de uranila.

3.1.3 EQUIPAMENTOS

Balança analítica, Mettler modelo AB204,

Aparelho de Ultra-Purificação de água MiliQ-PLUS, Milipore®,

Equipamento de Eletroforese Capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, controlador de temperatura e software Karat® V. 8.0 para aquisição e tratamento de dados,

Colunas capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, USA) com diâmetro interno de 50 ou 75µm e comprimento total de 30,2 a 50,2 cm,

Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Agilent Technologies 1200 Infinity Series HPLC equipado com detector UV-VIS e software OpenLAB,

Coluna de CLAE Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (100 x 4,6 mm) 3,5µm,

Balança eletrônica semi analítica, Bel Engineering,

Agitador tipo vórtex AP56 – Phoenix,

Centrífuga 3-18K – Sigma,

Microscópio óptico acoplado a câmera digital CCD – Leica,

Microscópio Eletrônico ThermoFisher Scientific Jeol JEM-2100 equipado com EDS,

Zetasizer nano S – Malvern,

Brookhaven Zeta Plus Analyzer Potential Zeta,

Evaporador rotatório (Büchi), banho-maria com circulação, Marconi,

Banho ultra-sônico com aquecimento modelo 800A,

pHmetro digital modelo PG1800,

Agitador magnético,

Outros comumente usados no lab. de controle físico-químico de qualidade de medicamentos e cosméticos.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 FORMULAÇÕES DAS NANOESFERAS

As nanoesferas foram obtidas pelo método de nanoprecipitação. Neste método foram preparadas duas fases: fase aquosa composta por Polissorbato 80 (tensoativo hidrofílico) e água e fase orgânica composta por Acetona (solvente orgânico), Policaprolactona (polímero), Imatinibe (fármaco) e o Monoestearato de Sorbitano (tensoativo lipofílico). Após solubilização dos componentes, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa, mantidas sob agitação de 1500 rpm e temperatura de 45°C em chapa de agitação magnética e aquecimento por 1 hora. O solvente foi evaporado e o volume final das formulações foram ajustados para 10 mL nas formulações 1, 2 e 3 e 20 mL nas formulações 4 e 5 por evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura de 60°C. A proporção dos componentes foi utilizada de acordo com a Tabela 1, porém nas formulações brancas o Imatinibe (fármaco) não foi utilizado. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

TABELA 1: Quantidade dos Componentes Utilizados na Obtenção das Nanoesferas.

COMPONENTES	FORMULAÇÕES				
	1	2	3	4	5
FASE ORGÂNICA					
Span 60 (Monoestearato de Sorbitano) (mg)	40	60	85	170	170
PCL (Policaprolactona) (mg)	100	100	100	200	100
Imatinibe (mg)	10	10	10	20	20
Acetona (Propanona) (mL)	14	14	14	28	28
FASE AQUOSA					
Tween 80 (Polissorbato 80) (mg)	60	40	35	70	70
Água (mL)	28	28	28	56	56

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

3.2.2.1 DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

As vesículas assumem formas esféricas, e seu diâmetro médio pode ser determinado usando o método de dispersão de luz (DLS) (BAYINDIR, 2010; STAN, 2013; TANGRI, 2011). As suspensões obtidas contendo as nanopartículas foram diluídas em água ultrapura (1:30) e colocadas separadamente em cubetas de plástico e inseridas no aparelho. A leitura foi realizada em temperatura ambiente (25°C). O método foi executado no aparelho Zetasizer® NanoS (Malvern™, UK) (MELO *et al.*, 2010).

3.2.2.2 MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS

Para determinar a morfologia das partículas utilizamos o método de microscopia eletrônica de transmissão, este método consiste em revestir o analito em uma fina camada de acetato de uranila e aplicar um feixe de elétrons fornecendo imagens tridimensionais que podem ser ampliadas na ordem de 300.000 vezes. As amostras foram colocadas numa placa de cobre durante 10 minutos e cobertas com uma solução aquosa de acetato de uranila durante 5 minutos, lavadas duas vezes com água ultrapura, secas em temperatura ambiente e analisadas no microscópio ThermoFisher Scientific Jeol JEM-2100 equipado com EDS (MAMMADOV, 2012).

3.2.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

3.2.3.1 EXTRAÇÃO DO FÁRMACO DAS NANOPARTÍCULAS

Depois de formados os sistemas nanoestruturados, separou-se o fármaco que não foi incorporado aos sistemas, por filtração em filtros de poros de $0,45\mu\text{m}$ e determinou-se a quantidade retida através da ruptura das vesículas utilizando etanol. Quantificou-se o fármaco retido por HPLC (BAYINDIR, 2010; STAN, 2013; TANGRI, 2011).

3.2.3.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAR A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO FÁRMACO PELOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POR HPLC.

Para desenvolvimento e validação da metodologia foi realizado um levantamento bibliográfico e testes de bancada, com o intuito de definir as condições mais adequadas para o método, para isso, foi empregado o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Agilent Technologies 1200 Infinity Series HPLC. Foram empregadas fases móveis contendo ácido trifluoroacético 0,1% (v/v), acetonitrila, metanol, água e tampão acetato de amônio pH 8,5 em diversas proporções, fluxo $0,8 - 1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção de $5 - 30 \mu\text{L}$ e temperatura da coluna $25 - 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

As condições do método desenvolvido são apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2: Condições de Trabalho Empregadas no Método Quantitativo por HPLC.

Parâmetros	Condições
------------	-----------

Coluna	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (100 x 4,6 mm) 3,5um
Temperatura da Coluna	50 °C
Volume de Injeção da Amostra	30 µL
Fluxo	1 mL.min ⁻¹
Fase Móvel	60% de tampão Acetato de Amônio pH 8,5 e 40% de Acetonitrila grau HPLC.
Detecção UV	267 nm

3.2.3.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAR A EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO FÁRMACO PELOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS POR CE.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica por eletroforese capilar foi escolhido o método eletroforese capilar em solução livre (FSCE), pois além de ser o método de CE mais simples este não interferiria na liberação do fármaco. Foram realizados testes preliminares para otimizar o método, para tanto, foi utilizado tampão fosfato de sódio monobásico nas concentrações de 20, 25, 30, 40, 50 e 60 mmol.L⁻¹ pH de 2,5, 3,2, 4,0 e 6,0, voltagem 15, 20, 25 e 30 kV e foram testados os seguintes fármacos como padrão interno: Lidocaína, Diclofenaco Sódico, Diazepam, Sunitinibe, Cloridrato de Metformina, Cloridrato de Gencitabina.

Neste método não foi necessária a extração do fármaco das nanopartículas. As condições otimizadas do método desenvolvido são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3: Condições Empregadas no Método Quantitativo por CE.

Parâmetros	Condições
Material Interno do Capilar	Sílica Fundida
Comprimento do Capilar	20 cm até o detector
Diâmetro Interno do Capilar	75 μm
Pressão da Injeção da Amostra	0,3 psi
Tempo de Injeção da Amostra	5,0 s
Voltagem Aplicada	15 kV
Temperatura Interna do Capilar	25 °C
Temperatura Armazenamento da Amostra	10 °C
Concentrações dos Eletrólitos	60 mmol.L^{-1}
Sais Utilizados nos Eletrólitos	Fosfato de Sódio Monobásico
pH dos Eletrólitos	2,5
Detecção UV	280 nm
Padrão Interno	Cloridrato de Gencitabina

3.2.3.2.1 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Para validar as metodologias analíticas desenvolvidas seguiu-se as directrizes da ANVISA, ICH e Farmacopeia Americana (ANVISA, 2017; ICH, 2005; USP, 2011).

3.2.3.2.1.1 LINEARIDADE

Para o cálculo da linearidade do método por CE, foram preparadas 5 soluções do padrão de imatinibe na faixa de concentração de 20,00 a 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o cloridrato de gencitabina foi usado como padrão Interno na concentração de 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Obteve-se a curva analítica a partir da razão entre as áreas dos picos de imatinibe e cloridrato de gencitabina. Para o método por CLAE, foram preparadas 5 soluções do padrão de

Imatinibe na faixa de concentração de 3,00 a 60,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ICH,2005).Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.3.2.1.2 LIMITES DE DETECÇÃO EQUANTIFICAÇÃO

Os LD e LQ foram, matematicamente, calculados pelo método que se baseia no desvio padrão (DP) do intercepto com o eixo Y de três curvas analíticas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção e na inclinação (I) da curva analítica, descritos nas equação 1 e 2, respectivamente. Para conferência dos resultados realizaram-se análises quantitativas de três amostras em triplicada, cada uma, em concentrações próximas as calculadas(ICH, 2005).

$$LD = \frac{DP \times 3}{I} \quad LQ = \frac{DP \times 10}{I}$$

Equação 1 – Limite de detecção

Equação 2 – Limite de quantificação

3.2.3.2.1.3 PRECISÃO (REPETITIVIDADE e PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)

A repetitividade foi analisada através de amostras em três níveis de concentrações (baixa, média e alta) e em triplicata.

A precisão intermédia foi realizada em dois dias diferentes. A precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo, calculados de acordo com a equação 3 (ICH, 2005).

$$\text{DPR}(\%) = \frac{\text{DP}}{\text{CM}} \times 100$$

Equação 3 – Desvio Padrão Relativo

DPR = Desvio Padrão Relativo DP = Desvio Padrão CM = Concentração Média

3.2.3.2.1.4 EXATIDÃO

Foram analisadas amostras em três níveis de concentrações (baixa, media e alta) em triplicata. A exatidão foi determinada a partir da relação percentual entre a concentração média experimental e a concentração teórica como mostra a equação 4 (ICH, 2005).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100$$

Equação 4 – Cálculo da Exatidão

CME = Concentração Média Encontrada CT = Concentração Teórica

3.2.3.2.1.5 ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

A seletividade do método foi avaliada através da análise da formulação branca (nanopartícula sem o analito) em triplicata, e observar a ausência de picos no mesmo tempo de retenção do analito ou padrão interno (ICH, 2005).

3.2.4 LIOFILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Para liofilização das nanopartículas foi diluído crioprotetor (sacarose) na proporção 10% (p/v) nas suspensões de nanopartículas e essas foram submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido, após esses processos a suspensão congelada foi levada ao liofilizador e aplicada a pressão de vácuo para desidratação da suspensão. Além da sacarose foi testado trealose como crioprotetor, ambos nas concentrações 5, 10 e 15% (p/v).

3.2.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Para estudar a eficiência de encapsulação das nanopartículas por CLAE, primeiramente quantificou-se o fármaco encapsulado, separando o fármaco livre, que é insolúvel na nanosuspensão, para este procedimento uma alíquota de 1 mL da nanosuspensão, foi ultrafiltrada em filtros com poros de 0,45 μm , romperam-se as nanopartículas de uma alíquota de 100 μL do filtrado adicionando-se 900 μL de etanol grau HPLC e mantendo em agitação em vórtex por 1 min., adicionou-se 1 mL de água para precipitação total do polímero, e a suspensão foi levada a uma centrífuga por 5 min. e 5000 rpm de agitação, quantificou-se o fármaco encapsulado através da leitura deste sobrenadante. Para a leitura do fármaco total, romperam-se as nanopartículas adicionando-se 900 μL de etanol grau HPLC em uma alíquota de 100 μL de nanosuspensão e mantendo em agitação em vórtex por 1 min. adicionou-se 1 mL de água para precipitação total do polímero, e a suspensão foi levada a uma centrífuga por 5 min e 5000 rpm de agitação, quantificou-se o fármaco total através da leitura deste sobrenadante

3.2.6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Para estudar a liberação das nanopartículas foi preparado um meio de liberação contendo fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato de sódio) $0,3 \%$ (m/v) pH $7,4 \pm 0,05$ corrigido com NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (LIU, et al., 2011).

As nanopartículas liofilizadas foram reidratadas e uma alíquota de 1 mL de nanosuspensão foi adicionada em 19 mL de meio de liberação em um frasco de 100 mL com tampa (Boeco). Essas suspensões foram mantidas em um equipamento shaker a 37°C de temperatura e agitação de 100 rpm. Foram aliqüotadas amostras nos tempos 0, 2, 3, 5, 6 e 30 horas para o fármaco livre ser quantificado por eletroforese capilar e estudar a liberação do fármaco. Este estudo foi realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das nanopartículas

Os resultados da caracterização das nanopartículas podem ser observados na Tabela 4, embora caracterizadas as nanosuspensões de nanoesferas de PCL contendo imatinibe obtidas através das metodologias de preparo 1, 3 e 4 foram consideradas inviáveis, pois em menos de 1 semana de preparo foram observados precipitados, caracterizando instabilidade do sistema e da metodologia 2 foram observados esses precipitados antes mesmo da caracterização. As nanosuspensões preparadas pelo método 5 foram as únicas que por um período mínimo de 1 mês não formaram precipitados, por esse motivo esta foi a metodologia escolhida para seguirem os estudos.

TABELA4: Caracterização das Nanopartículas quanto ao Diâmetro Médio, Pdl e Potencial Zeta

Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta (mV)
NE PCL Imatinibe método 1	102±2,53	0,11±0,02	-18,83±7,08
NE PCL Imatinibe método 3	126,1±6,37	0,15±0,09	-27,6±6,74
NE PCL Imatinibe método 4	157,2±11,98	0,2±0,05	-19,53±4,28
NE PCL Imatinibe método 5	146,87±4,72	0,089±0,02	-19,03±2,31

Diâmetro dos poros

O diâmetro dos poros desses capilares pode se estender de 100 a 800 nm. Estes sistemas contendo o fármaco têm diâmetros que se estendem de aproximadamente 100 a 160 nm. Portanto, são pequenos o suficiente para extravasar da corrente sanguínea para o espaço intersticial do tumor passando através desses poros.

Índice de polidispersão

O Pdl das nanoesferas obtidas estão abaixo de 0,2 portanto estão uniformes sem uma diferença diâmetro médio significativa (TANGRI, 2011; YU, *et. all.*, 2017).

Potencial zeta.

O polímero utilizado tende a oferecer um potencial zeta negativo para a nanopartícula, pois sua carga é negativa, embora o fármaco utilizado possua carga positiva a quantidade de polímero utilizada foi bem superior, outros componentes que poderiam modificar essa carga seriam os tensoativos, mas os utilizados são tensoativos não iônicos, ou seja, estes não possuem carga, portanto não podem alterar a carga da partícula (KULKAMP, *et al.*, 2009).

Morfologia

A morfologia das nanopartículas pode ser observada nas Figuras 4 e 5, nelas se observava estrutura esférica já esperada para nanoesferas com o diâmetro observado pelo método de dispersão da luz, tanto para a partícula mantida em geladeira quanto para as partículas liofilizadas. Porém é possível observar uma superfície rugosa nas nanopartículas liofilizadas caracterizando a presença do crioprotetor na superfície das nanopartículas.

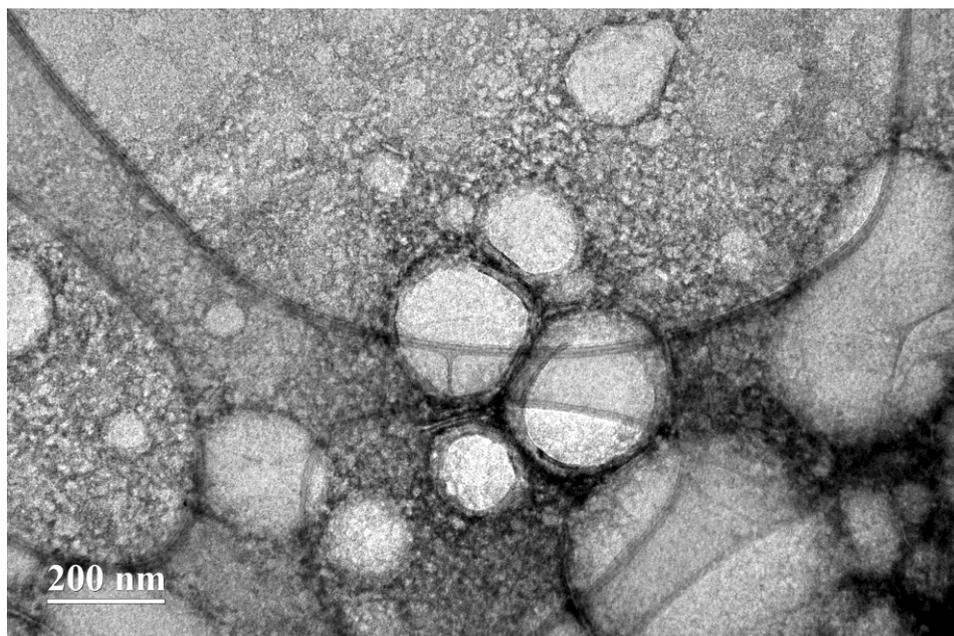


FIGURA 4: Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoesferas de imatinibe mantidas em geladeira. Microscopia de nanopartículas cobertas com solução aquosa de acetato de uranila.

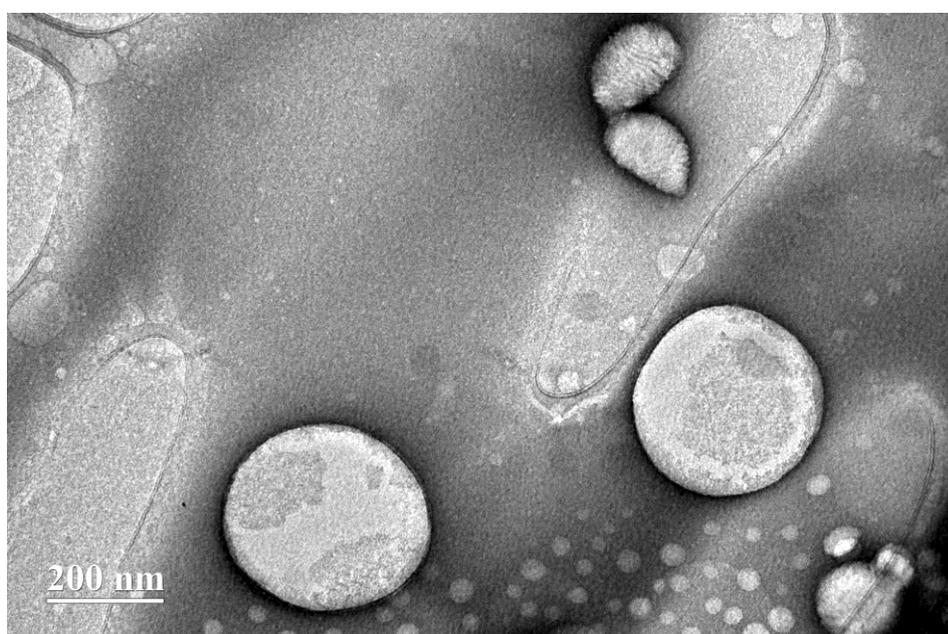


FIGURA 5: Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoesferas de imatinibe liofilizadas. Microscopia de nanopartículas cobertas com solução aquosa de acetato de uranila.

Desenvolvimento do método por HPLC

Para desenvolvimento do método por HPLC iniciaram-se os estudos na tentativa de desenvolver um método sem a presença de sais (tampões) na fase móvel, pois sua utilização necessita de uma lavagem mais complexa e por um tempo maior da coluna. Então os estudos se iniciaram em diversas proporções de água, acetonitrila, metanol e solução de TFA 0,1% (v/v), porém nestes testes os picos se apresentaram muito largos com presença de cauda bem importante, a assimetria desses picos era superior a 2% que é o preconizado pela literatura compendial, esses resultados não se alteraram mesmo alterando-se outras condições, como exemplo, a temperatura da coluna e troca de coluna. Então para solucionar este problema optou-se trabalhar fase móvel contendo concentrações diferentes, em cada fase móvel, de tampão acetato de amônio pH 8,5 e acetonitrila, pois neste pH o fármaco encontra-se totalmente neutro possibilitando uma resolução e assimetria de pico dentro das especificações compendiais, para otimizar este método e torná-lo mais rápido sem perda de eficiência, foram testados fluxos de 0,8 a 1,2 mL.min⁻¹, temperatura da coluna de 25 a 50°C e volume de amostra injetada de 10 a 30 µL. O tempo de retenção do imatinibe foi de 2 min (Fig. 7).

Validação do método HPLC

-Linearidade

Para linearidade do método quantitativo por HPLC obteve-se uma curva analítica (Figura6) com coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 e equação da reta: $y=53,551x-33,726$. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5: Resultados obtidos na curva analítica do método de quantificação de imatinibe por HPLC.

Parâmetros	Dados Estatísticos
Varição das Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	3 - 60
Coeficiente Linear	-33,726
Coeficiente Angular	53,551
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9999
Erro Padrão Estimado	18,277

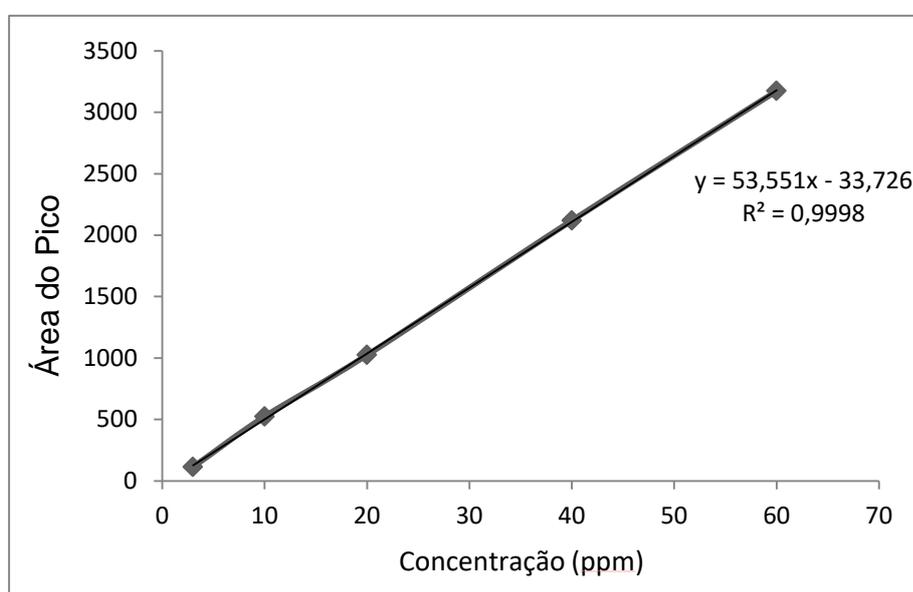


FIGURA 6: Curva analítica do imatinibe, método HPLC. Curva obtida através das áreas dos picos de imatinibe e sua concentração na faixa de 3,00 a 60,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

-Precisão

O método por HPLC se apresentou preciso, pois seus valores de desvio padrão relativo foram menores de 2 % tanto para a precisão intra-dia quanto para a inter-dia (Tabela 6).

TABELA 6: Resultados obtidos para cálculo da precisão intra-dia e inter-dia. Método HPLC.

Dia 1			
Desvio Padrão	Média Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)	Média DPR (%)
0,069		1,44	
0,248	0,240	0,80	1,01
0,404		0,78	
Dia 2			
Desvio Padrão	Média Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)	Média DPR (%)
0,023		0,45	
0,127	0,140	0,41	0,46
0,404		0,53	

-Exatidão (Recuperação)

A recuperação foi de $98,85 \pm 0,04$ % em 3 concentrações diferentes e exatos pois os valores experimentais estão dentro da faixa não apresentam diferenças superiores a 5% da concentração teórica(ICH, 2005) (Tabela 7).

TABELA 7: Resultados obtidos para cálculo da exatidão. Método HPLC.

Conc. Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação
5	4,81	96,20%
30	30,92	103,10%
50	51,93	103,90%

-Seletividade

O método se mostrou ser seletivo, pois ao analisar a formulação da nanopartícula branca, comparada com a nanopartícula carregada com o imatinibe, a formulação branca não apresentou picos no tempo de retenção do Imatinibe (Figura 7).

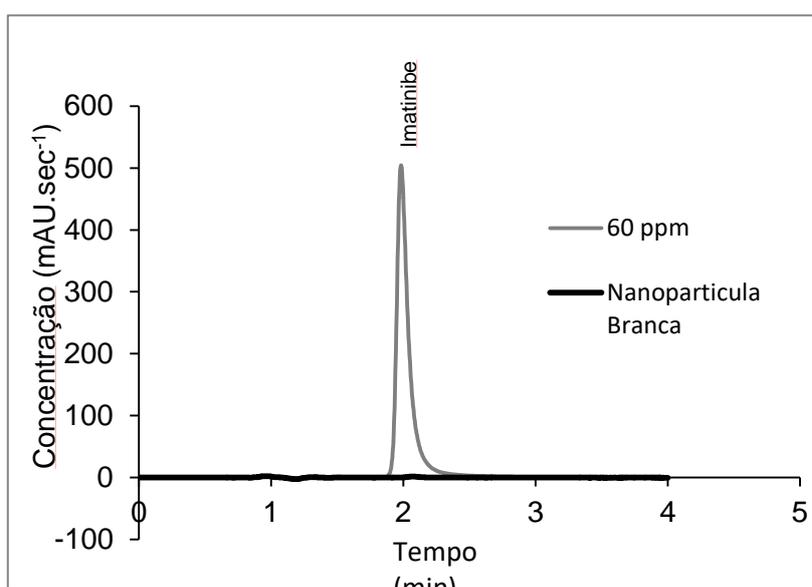


FIGURA 7: Cromatogramas de Imatinibe $60,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ nanopartículas branca e carregada com o imatinibe. Condições: coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (100 x 4,6 mm) 3,5 μm , injeção de $30\mu\text{L}$ de amostra, vazão 1 mL min^{-1} , detector DAD comprimento de onda em 267nm e fase móvel: 60 % tampão acetato de amônio pH 8,5 e 40 % Acetonitrila.

-Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados experimentalmente obtendo-se valores iguais a $0,80$ e $2,96 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabelas 8 e 9).

TABELA 8: Resultados obtidos para cálculo do limite de detecção do imatinibe. MétodoHPLC.

Concentração Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área Picos	Média Área Pico	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)	Concentração Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média da Concentração Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0,2	9,2				0,801	
0,2	9,3	9,433	0,321	3,41	0,803	0,806
0,2	9,8				0,813	

TABELA 9: Resultados obtidos para cálculo do limite de quantificação do imatinibe. MétodoHPLC.

Concentração Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área Picos	Média Área Pico	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)	Concentração Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média da Concentração Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
3	128,1				3,022	
3	124	125,1	2,629	2,10	2,945	2,966
3	123,2				2,930	

DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CE

O desenvolvimento de método quantitativo por CE se iniciou com os pH superiores a 6,0, onde o fármaco se apresenta neutro, porém neste pH o imatinibe é insolúvel, impossibilitando a análise. As análises seguiram com pHs menores, foram testados os pHs 4,5 (Figura8), 3,2 e 2,5, apenas no pH 2,5 o pico do imatinibe apresentou uma melhor resolução e simetria, isso ocorre devido o imatinibe possuir vários grupo ionizáveis, podendo assumir diferentes formas em um mesmo pH, separando os picos durante a análise, foram testados voltagens de 15 - 30kV porém neste equipamento em voltagens superiores a 15kV a corrente se mantinha instável, impossibilitando a análise.

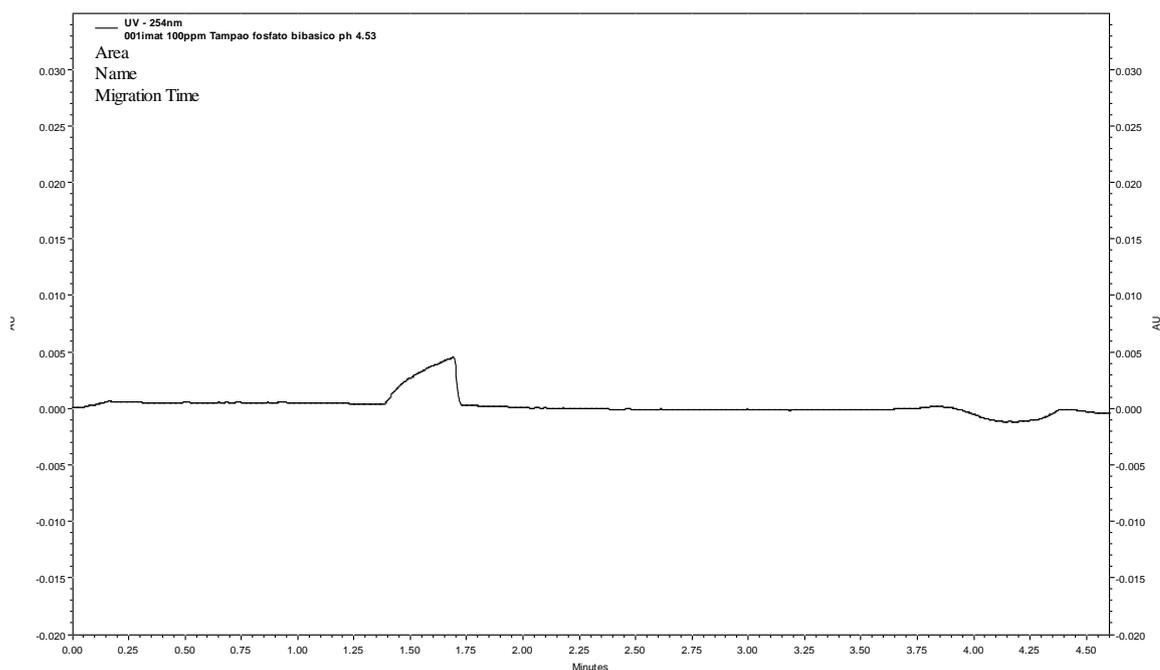


FIGURA8: Eletroferograma de Imatinibe. Condições: Eletrólito 60 mmol.L⁻¹ fosfato de sódio monobásico pH 4,5, tensão 15 kV, capilar 20 cm até o detector e 75 µm d.i., inj. 3,0 psi x 5,0 s, temperatura do Capilar 25 °C e detecção UV em 280nm.

Foram testados diferentes padrões internos e dentre eles a gencitabina foi o que teve boa separação tendo um tempo de retenção 2,1 min., diferente ao imatinibe 1,5min (Figura 9).

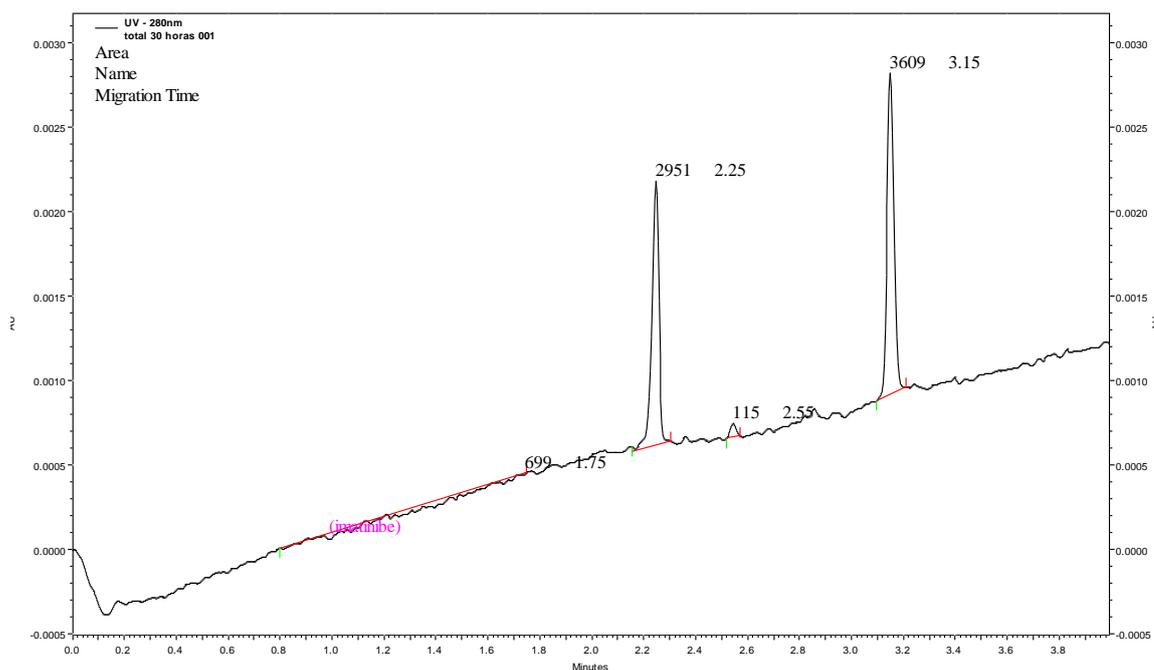


FIGURA 9: Eletroferogramas de Imatinibe e Gencitabina. Condições: Eletrólito 60 mmol.L⁻¹ fosfato de sódio monobásico pH 2,5, tensão 15 kV, capilar 20 cm até o detector e 75 µm d.i., inj. 3,0 psi x 5,0 s, temperatura do Capilar 25 °C e detecção UV em 280nm.

Validação do método por CE

O método desenvolvido foi validado de acordo com a RDC 166/2017 e o ICH, foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação.

Linearidade, limites de detecção e quantificação

Para linearidade obteve-se uma curva analítica (Figura10) com coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 e equação da reta: $y=0,0101x - 0,0398$. Os resultados

podem ser observados nas Tabelas 10 e 11. Os limites de detecção e quantificação podem ser observados na Tabela 11.

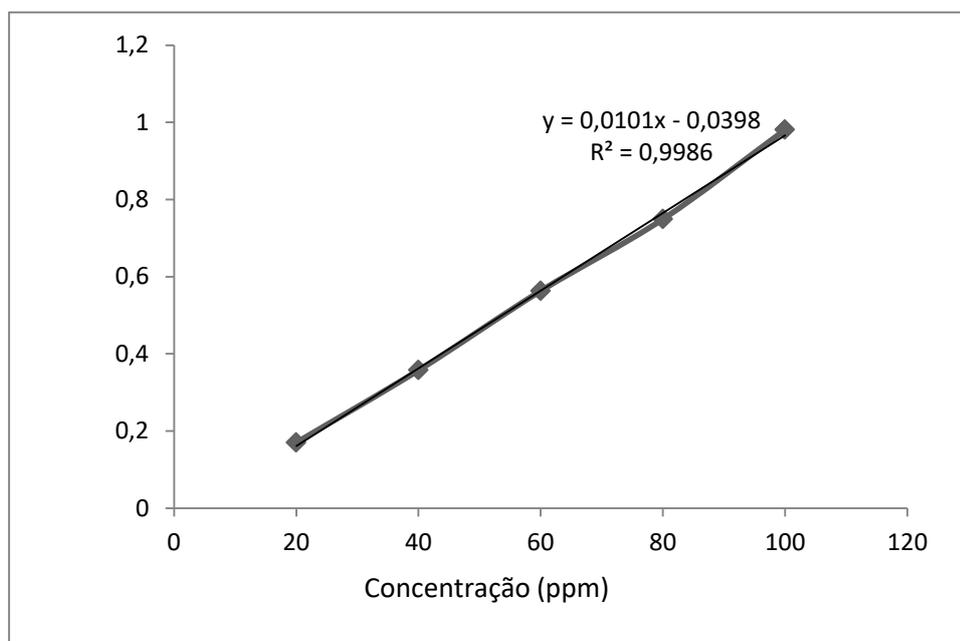


FIGURA 10: Curva analítica do imatinibena faixa de concentração de 20,00 a 100,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Curva obtida através da razão das áreas dos picos de imatinibe e cloridrato de gencitabina (p.i.).

TABELA 10: Resultados obtidos na Curva analítica do imatinibe Método CE.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico do Imatinibe	Área do pico da Gencitabina	Razão das áreas dos Picos
20	3595	21059	0,170
40	8700	24337	0,357
60	12771	22663	0,563
80	20040	26747	0,749
100	22539	22981	0,980

TABELA 11: Resultados estatísticos da curva analítica e limites de detecção e quantificação. Método CE.

Parâmetros	Dados Estatísticos
Varição das Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	20 - 100
Coeficiente Linear	-0,0398
Coeficiente Angular	0,0101
Coeficiente de Correlação (r)	0,9999
Erro Padrão Estimado	0,01357
Limite de Detecção ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,023
Limite de Quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	34,095

Precisão e exatidão

O método foi preciso, pois seus valores de desvio padrão relativo foram menores de 2 % nas 3 concentrações diferentes (Tabela 12) e exatos pois a média dos valores experimentais não apresentam diferenças superiores a 5% da concentração teórica (Tabela 13).

TABELA 12: Resultados obtidos para a Precisão. Método CE.

Desvio Padrão	Média Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)	Média DPR (%)
0,462		2,36	
0,235	0,363	0,62	1,21
0,393		0,65	

TABELA 13: Resultados obtidos para a Exatidão. Método CE.

Conc. Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc. Experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
20	19,58	97,92
40	38,19	95,47
60	60,34	100,56

Seletividade

O método se mostrou seletivo, pois ao analisar a formulação branca, esta não apresentou picos no tempo de retenção do Imatinibe nem da Gencitabina (padrão interno) (FIGURA 11).

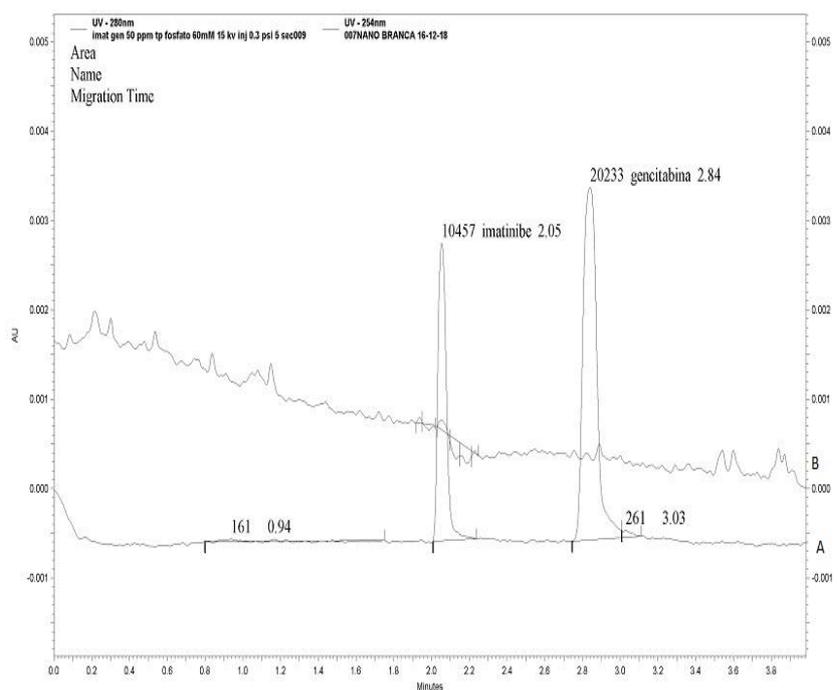


FIGURA 11: Eletroferogramas de Imatinibe e Gencitabina (A); nanopartículas branca (B). Condições: Eletrólito 60 mmol.L^{-1} fosfato de sódio monobásico pH 2,5, tensão 15 kV, capilar 20 cm até o detector e $75 \mu\text{m}$ d.i., inj. 3,0 psi x 5,0 s, temperatura do Capilar $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção UV em 280nm.

EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A quantificação do imatinibe por HPLC foi realizada pelo método direto, pois neste caso, comparamos o fármaco encapsulado com o total na formulação, enquanto que no método por CE foi realizada pelo método indireto, pois este sistema nos permitiu separar o fármaco livre do encapsulado pela própria técnica, sem necessidade de uma separação anterior a análise, diferentemente do método por HPLC. Ambos resultados apresentaram aproximadamente 90% de Eficiência de Encapsulação (Tabela 14).

TABELA 14: Eficiência de Encapsulação.

Formulações	Eficiência de Encapsulação por HPLC (%)	Eficiência de Encapsulação por CE (%)
NE PCL Imatinibe método 1	80,58 ± 2,47	-
NE PCL Imatinibe método 3	74,57 ± 8,55	-
NE PCL Imatinibe método 4	91,4 ± 5,64	-
NE PCL Imatinibe método 5	88,67 ± 3,74	90,38 ± 1,81

-: teste não realizado.

Como o método 5 foi o mais promissor, apenas essas nanopartículas foram quantificadas por CE, como explicado anteriormente.

LIBERAÇÃO DO IMATINIBE POR CE

O método de estudo de liberação *in vitro* utilizado é dependente de diálise para a separação do(s) fármaco(s) liberado(s), pois o HPLC não separa o fármaco liberado do encapsulado, entretanto esses métodos não medem a cinética de liberação do(s) fármaco(s) propriamente dita, mas a cinética de transporte do(s) fármaco(s) que já foram liberados pela membrana de diálise. Sendo assim um método capaz de separar o(s) fármaco(s) liberado(s) das nanopartículas e quantificá-los ao mesmo tempo seria muito mais eficiente (DOTY, *et. all.*, 2017). Para isso, foi proposto desenvolver um método de CE onde este seria capaz de separar o fármaco liberado das nanopartículas, pois a carga do fármaco é diferente da nanopartícula.

Analisando a curva de liberação do imatinibe (Figura 12) não é possível observar a liberação do fármaco, isto pode ser devido a que o tensoativo adicionado no meio de liberação pode ter formado micelas com cargas negativas que solubilizaram o fármaco que estava sendo liberado, o método desenvolvido não foi capaz de detectar o analito, sendo que no pH 2,5 EOF é zero e as micelas tendo carga negativa se direcionaram ao ânodo, pela sua própria mobilidade eletroforética e portanto não foram detectadas.

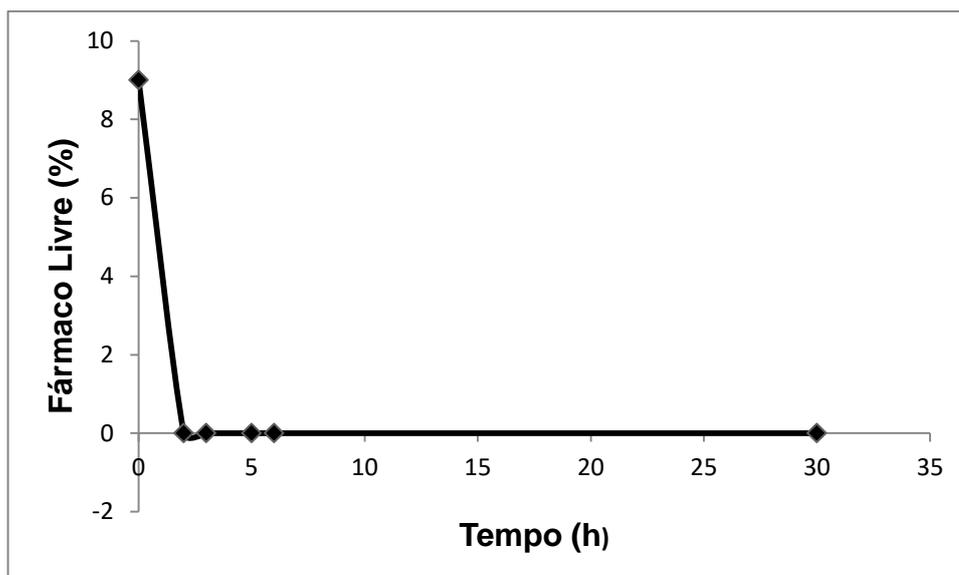


FIGURA 12: Curva de Liberação de Imatinibe pelas Nanoesferas de PCL. Meio de liberação: fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e dodecil sulfato de sódio (lauril sulfato de sódio) $0,3 \text{ \% (m/v)}$ pH $7,4 \pm 0,05$ corrigido com NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, agitação em shaker de 100 rpm e temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para comprovar a captura do fármaco pelas micelas foi coletada uma amostra de 30 horas de liberação e feito o rompimento dessas micelas com um solvente orgânico (etanol grau HPLC), após esse processo o Imatinibe Livre foi calculado e obteve-se uma concentração igual à concentração total de Imatinibe presente na formulação.

5. CONCLUSÃO

Foram desenvolvidas nanoesferas de PCL contendo Imatinibe pelo método de nanosuspensão, como proposto, estas nanoesferas se apresentaram com diâmetro médio de aproximadamente 150 nm e Pdl $0,1$, essas partículas apresentaram potencial zeta negativo, o que era esperado pela utilização deste polímero e tensoativos, também foi observada uma ótima eficiência de encapsulação pelos dois métodos CE e HPLC, aproximadamente 90% .

Os métodos analíticos CE e CLAE foram desenvolvidos e validados, segundo as diretrizes da ANVISA, ICH e USP, o método por CE apresentou algumas vantagens em relação ao CLAE, sendo elas, menor custo, mais ecológico e não necessitar de separação do fármaco livre do encapsulado, sendo assim, este método se torna mais rápido e menos trabalhoso. Embora não obtidos os valores de liberação *in vitro*, a técnica escolhida (CE) para separação e quantificação do fármaco livre provou que pode ser utilizada para este fim sem a utilização de outras técnicas para separar o fármaco livre do encapsulado. Provando que novos estudos podem ser direcionados a esta técnica como uma alternativa aos próximos estudos de liberação de fármacos.

Para a obtenção do estudo de liberação sugere-se que pode ser trocado o tensoativo aniônico do meio de liberação por um tensoativo catiônico (ele acima da concentração micelar crítica) que formaria micelas positivas as quais pela sua própria mobilidade eletroforética se direcionariam no sentido do detector.

6. REFERÊNCIAS

- ADELANTO, C.; et. al. Analysis of silica nanoparticles by capillary electrophoresis coupled to evaporative light scattering detector. **Analytica Chimica Acta**. 923 p 82-88. 2016.
- ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**, v.52, Towota: Human Press, 1996.
- ANVISA, **Resolução- RDC nº 27**, 17 de maio de 2012. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 07 mai. 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017**. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.
- AURORA-PRADO, M. S.; SANTORO, M. I. R. M.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Electroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **RBCF.Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 36, p.97 - 110, 2000.

- BAN, E.; YOO, Y.S.; SONG, E.J. Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis. **Talanta**. 141 p 15-20. 2015.
- BARBOSA, I. A. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas Furtivas Contendo β -Lapachona para Terapia do Câncer**. 73 folhas. Dissertação – Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas. Recife. 2011.
- BAYINDIR, Z.S., & YUKSEL, N. Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. **Journal of pharmaceutical sciences**, 99(4), 2049-2060. 2010.
- BONATO, S.P.; JABOR, V. A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.
- CHEMICALIZE. Imatinibe. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/calculation>. Acessado em 2019.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417-1450, 2006.
- DOTY, A.C. et al. Mechanisms of *in vivo* release of triamcinolone acetonide from PLGA microspheres. **Journal of Controlled Release**. 256 p 19-25 (2017).
- DUNCAN R. Nanomedicine – gets clinical. **Nanotoday**, August 2005.
- da SILVA, J.A.F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, vol. 26, nº1. 2003.
- de OLIVEIRA, E., et. al. Eletroforese: Conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.11, n.22, p.1129-1149. 2015
- ESPAÑOL MARIÑO, L. V. **Aplicação da eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação da dexametasona e diclofenaco em nanosuspensão**. Dissertação de mestrado 130 folhas. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2015
- FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in Cellular Drug Delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962. 2009

- FU, Y.; KAO, W. J. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opin. Drug Delivery** 2010, 7, 429–444.
- GERVASIO, A.P.G. et al. Capillary Electrophoresis coupled to plasma spectrometry: an efficient tool for speciation. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65-74. 2003.
- GIL, E.S. **Controle físico químico de qualidade de medicamentos e cosméticos**. 3ª ed. Pharmabooks, São Paulo, 2010.
- GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 Ed. Rio de Janeiro: McGrallHill, 2012.
- ICH- **International Conference on Harmonization of Technical Requerements for Registration of Pharmaceuticas for human use: Guideline on Validacion of Analytical Procedures Q2 (R1)**, Text and methodology, 2005.
- KÜLKAMP, I.C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2078-2084, 2009.
- Liu J¹, Zhang L, Yang Z, Zhao X. Controlled release of paclitaxel from a self-assembling peptide hydrogel formed in situ and antitumor study in vitro. *Int J Nanomedicine*. 6:2143-53. 2011.
- MELO, N.F.S.; GRILLO, R.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F.; DIAS FILHO, N.L.; PAULA, E.; ARAÚJO, D.R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (l-lactídeo) contendo benzocaína. **Quimica Nova**, v.33, n.1, p.65-69, 2010.
- MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A.P.; GINÉ, M.F. Sistemas Interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, vol. 25, nº3. 2002.
- RODOVALHO, L.F.F. **Estudo da Encapsulação da Isotretinoína nas Formas Livre e Associada a Ciclodextrinas em Niossomas**. Dissertação de mestrado 81 folhas. Universidade Federal de Goiás – Faculdade de Farmácia. 2007.

- ROESE, E.; BUNJES, H. Drug release studies from lipid nanoparticles in physiological media by a new DSC method. **Journal of Controlled Release**. 256 p 92-100.2017.
- SANTOS, M.R.; TAVARES, M.F.M.; RUBIM, J.C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química Nova**, São Paulo, vol. 23 nº5. 2000.
- SCHAFFAZIK, S.R.; 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, n.5, p.726-737, 2003.
- SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v.30, n.3, p.740-744. 2007.
- SOFO, A. **Desenvolvimento de método analítico por eletroforese capilar para quantificação de éster do ácido pirazinóico em nanosuspensão**. Dissertação de mestrado 103 folhas. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2015.
- SPUDEIT D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**. v.4, n.4, p. 287-329, 2012.
- STAN, C.D., et al. Preparation and characterization of niosomes containing metronidazole. **Farmácia**. 61, n. 6, p. 1178-1185, 2013.
- TANGRI, P., & KHURANA, S. Niosomes: formulation and evaluation. **International Journal**, 2229, 7499. 2011.
- TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, vol. 19 nº2. 1996.
- USP-THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 34 ed. National Formulary: NF 29. Rockville, Md: United States Pharmacopeia Convention, 2018.
- VEUTHEY, J.L. Capillary eletroforesis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.381, n.1, p. 93-95, 2005.

•YU, X. et. al. Preparation and characterization of mucosal adhesive and two-step drug releasing cetirizine-chitosan nanoparticle. **Carbohydrate polymers**.173 p 600-609. 2017.