

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
PPGQ/UNICENTRO  
DOUTORADO EM QUÍMICA

OSMAR DOS REIS ANTUNES JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA  
NANOESTRUTURADO CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA**

Guarapuava

2017

OSMAR DOS REIS ANTUNES JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA  
NANOESTRUTURADO CONTENDO DISSELENETO DE DIFENILA**

Tese apresentada como requisito Parcial à obtenção de grau de Doutor em Química, Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rubiana Mara Mainardes

Guarapuava

2017

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

S355a Antunes Jr., Osmar dos Reis  
Desenvolvimento e avaliação de um sistema nanoestruturado contendo disseleneto de difenila / Osmar dos Reis Antunes Jr.. -- Guarapuava, 2017  
xvi, 124 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em ampla associação com UEL e UEPG, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017

Orientador: Najeh Maissar Khalil  
Coorientadora: Rubiana Mara Mainardes  
Banca examinadora: Najeh Maissar Khalil, Rubiana M. Mainardes, Paulo Cesar Ghedini, Josiane F. Padilha de Paula, Yohandra Reyes Torres, Maria Lurdes Felsner

Bibliografia

1. Química. 2. Disseleneto de difenila. 3. Nanopartículas poliméricas. 4. Antioxidante. 5. Antitumoral. 6. Toxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540

*Dedico essa tese para pessoas muito especiais na minha vida. Aos meus pais, Osmar e Marlise, e ao meu amor, Emilli, pelo amor e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Nossa Senhora Aparecida e Santo Expedito a quem sou devoto; essa fé muitas vezes me fortaleceu para continuar nesse caminho.

Ao Prof. Dr Najeh Khalil, expresse meu agradecimento pela confiança a mim concedida quando me destes a honra de trabalhar sob sua orientação. Essa caminhada teve início quando o procurei no mês de Outubro de 2013 para uma possível orientação e após algumas conversas acertamos a orientação e o projeto. Hoje quero que saibas que sou muito grato por acreditar no meu potencial, pela paciência e compreensão durante este período, e pelo conhecimento e ensino que pude adquirir ao longo destes anos.

À Unicentro, ao Laboratório de Nanotecnologia, e à CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Camila Kulek, Juci Kulek, Jociani Ascari, Luciana Erzinger Camargo, Daniel Brustolin, Prof<sup>a</sup>. Dra. Tânia Tominaga, Prof<sup>a</sup>. Dra. Rubiana Mainardes, pela colaboração na realização de experimentos e orientação nos artigos. Muito obrigado pelo auxílio e por dividirem comigo seus conhecimentos.

Agradeço aos amigos de laboratório Rossana, Júlio “parça”, Daniel, Eduardo, Larissa, Daniele Pauluk...muito obrigado pelo auxílio, por dividirem comigo suas experiências e, principalmente, pelo carinho que me enriquece e faz toda diferença ao final desse caminho. Agradeço também aos colegas de laboratório que indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

À minha família, que amo tanto e que fez de mim a pessoa que sou hoje. Meu pai, Osmar, e minha mãe, Marlise, à vocês agradeço por todo amor, carinho, e cuidado. Mesmo distante, vivenciaram este período comigo, apoiaram nos momentos de dificuldade, torceram e vibraram a cada conquista, por ouvirem incessantemente sobre meu trabalho. Bastava saber que estavam do outro lado da linha, e que eu poderia contar com amor incondicional. O orgulho que sentem por mim me deu forças para continuar apesar das dificuldades, por isso, à vocês dedico este trabalho. À minha irmã, Camila, e a minha afilhada, Clara, agradeço pelo carinho, o amor, por entenderem minha ausência, e por sempre acreditarem em mim.

À uma pessoa muito, mas muito especial na minha vida, Emilli Antônio, minha amiga, minha companheira, minha eterna namorada, minha esposa, sempre ao meu lado, apoiando e compreendendo, ajudando nos experimentos e dividindo conhecimentos. Meus dias no laboratório que poderiam ser difíceis e tortuosos, tendo a sua presença tornaram-se mais tranquilos e agradáveis, e o melhor...que no final do dia na volta para casa, tínhamos um ao outro, para dividirmos as angústias e problemas vivenciados no laboratório, e sempre uma palavra de carinho, um sorriso, um abraço apertado, fazendo todo o resto se dissipar. Obrigado pelo amor, pela cumplicidade, pelas inúmeras conversas sobre meu trabalho e pela ajuda. Enfim, obrigado por fazer parte da minha vida, te amo muito!

*“Deus é forte, Ele é grande, e quando Ele quer não tem quem não queira”.*

Ayrton Senna

## RESUMO

ANTUNES JUNIOR, Osmar dos Reis. **Desenvolvimento e Avaliação de um Sistema Nanoestruturado contendo Disseleneto de Difenila**. 2017. 124f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava.

O disseleneto de difenila,  $(\text{PhSe})_2$ , é um organocomposto de selênio simples, conhecido pelos seus efeitos farmacológicos e toxicológicos, porém, sua aplicação clínica é limitada devido a sua baixa solubilidade aquosa, que resulta em baixa biodisponibilidade, restringindo sua eficácia. Para superar essas limitações, o presente trabalho desenvolveu nanopartículas poliméricas (Nps) contendo  $(\text{PhSe})_2$  através do método de emulsificação-*evaporação do solvente*. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector de arranjo de diodo (DAD) foi o método analítico utilizado para quantificação do  $(\text{PhSe})_2$  presente nas nanopartículas. A validação do método foi realizada de acordo com as normatizações vigentes, a fase móvel consistiu em metanol e água acidificada (90:10, v/v), fluxo de 1 mL/min, com detecção em 240 nm. As nanopartículas de poli(ácido láctico) (PLA) contendo  $(\text{PhSe})_2$  foram obtidas com êxito, apresentaram formato esférico e uma eficiência de encapsulação e tamanho médio próximo a 90% e 220 nm, respectivamente. O potencial zeta da formulação foi de -23 mV, valor que teoricamente garante estabilidade físico-química das partículas. As análises de infravermelho, difração de Raios X, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria demonstraram que o processo de nanoencapsulação promoveu amorfização do fármaco e interação do  $(\text{PhSe})_2$  com a matriz polimérica. O estudo de estabilidade mostrou que as Nps em suspensão não apresentaram estabilidade nos 7 dias de ensaio, enquanto que as Nps liofilizadas foram estáveis durante os 3 meses de estudo tanto em temperatura ambiente, quanto refrigeradas e congeladas. O estudo de liberação *in vitro* mostrou que ao final das 192 h cerca de 61% do  $(\text{PhSe})_2$  encapsulado foi liberado, e que essa liberação aconteceu através de 2 constantes, uma rápida e outra lenta, sugerindo uma cinética de segunda ordem. Através do ensaio antioxidante foi possível observar que o processo de nanoencapsulação não alterou o potencial antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$ , uma vez que após 48 h de ensaio as nanopartículas apresentaram capacidade inibitória semelhante ao  $(\text{PhSe})_2$  livre. No ensaio de citotoxicidade frente as hemácias, as Nps- $(\text{PhSe})_2$  demonstraram menor toxicidade sobre os eritrócitos que o  $(\text{PhSe})_2$  livre. Por fim as Nps foram testadas frente as linhagens tumorais (B16-F10 e HEP-2), e os resultados obtidos

foram promissores, visto que as nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  mantiveram a propriedade antitumoral do composto. Sendo assim, as nanopartículas de PLA demonstraram ser carreadores potenciais para o  $(\text{PhSe})_2$ , com características físico-químicas adequadas, menor citotoxicidade sobre células normais e manutenção da atividade antioxidante e antitumoral.

**Palavras chaves:** disseleneto de difenila, nanopartículas poliméricas, antioxidante, antitumoral, toxicidade.

## ABSTRACT

ANTUNES JUNIOR, Osmar dos Reis. **Development and Evaluation of a Nanostructured System containing Diphenyl Diselenide**. 2017. 124f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava.

The diphenyl diselenide, (PhSe)<sub>2</sub>, is a simple selenium organocompound known for its pharmacological and toxicological effects, however, its clinical application is limited by its low aqueous solubility, which results in low bioavailability, restricting its efficacy. To overcome these limitations, this study developed polymeric nanoparticles (Nps) containing (PhSe)<sub>2</sub> by the method of emulsification-solvent evaporation. The high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode detector (PDA) was analytical method used for quantification of (PhSe)<sub>2</sub> present in the nanoparticles. The method was validated according to current norms, mobile phase consisted of methanol and acidified water (90:10, v/v), flow 1 mL/min with detection at 240 nm. Nanoparticles of poly (lactic acid) (PLA) containing (PhSe)<sub>2</sub> were successfully obtained, showed spherical shape and an encapsulation efficiency and mean size close to 90%, and 220 nm, respectively. The zeta potential of the formulation was -23 mV, a value that theoretically ensures physicochemical stability of the particles. The infrared analysis, X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and thermogravimetric showed that the nanoencapsulation process promoted drug amorphation and interaction of (PhSe)<sub>2</sub> with the polymeric matrix. The stability study shows that Nps in suspension did not show stability in the 7 days test, whereas the lyophilized Nps were stable over the 3month study both at room temperature, the chilled and frozen. The *in vitro* release study showed that the end of the 192 h about 61% of (PhSe)<sub>2</sub> encapsulated was released and that this release occurred by two constants, a fast and other slowly, suggesting a second order kinetics. Through the antioxidant assay was possible to observe that the process of nanoencapsulation did not alter the antioxidant potential of (PhSe)<sub>2</sub>, since after 48 hours the nanoparticles showed inhibitory capacity similar to (PhSe)<sub>2</sub> free. In the erythrocyte cytotoxicity assay, Nps-(PhSe)<sub>2</sub> showed lower toxicity on erythrocyte than free (PhSe)<sub>2</sub>. Finally the NPs were tested against the tumor lines (B16-F10 and HEP-2), and the results obtained were promising, since the nanoparticles of (PhSe)<sub>2</sub> maintained the antitumor property of the compound. Thus, the PLA nanoparticles demonstrated to be potential

carriers for (PhSe)<sub>2</sub>, with adequate physicochemical characteristics, lower cytotoxicity on normal cells and maintenance of antioxidant and antitumor activity.

**Key words:** diphenyl diselenide, polymeric nanoparticles, antioxidant, antitumor, toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1.</b> Características dos polímeros.....  | 31 |
| <b>Figura 1.</b> Estrutura química do (PhSe) <sub>2</sub> .....  | 25 |
| <b>Figura 2.</b> Representação esquemática de um lipossoma .....   | 28 |
| <b>Figura 3.</b> Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas .....   | 30 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura química do poli (ácido láctico) (PLA) .....   | 33 |
| <b>Figura 5.</b> Imagem ilustrativa do método de emulsificação- evaporação do solvente.....  | 34 |
| <b>Figura 6.</b> Cromatograma representativo (absorbância (AU) em função do tempo (min)) do (PhSe) <sub>2</sub> em metanol. Fase móvel metanol: água acidificada (90:10), fluxo de 1mL.min <sup>-1</sup> ; detecção no comprimento de onda de 240 nm, temperatura da coluna de 25 °C, volume de injeção de 40 µL .....   | 56 |
| <b>Figura 7.</b> Comparação dos cromatogramas, em A observa-se amostras do (PhSe) <sub>2</sub> proveniente do sobrenadante de nanopartículas. Em B, análise do cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas vazias. Fase móvel: Metanol:água acidificada (90:10, v/v), 240 nm.....  | 58 |
| <b>Figura 8.</b> Comparação dos cromatogramas de amostras de (PhSe) <sub>2</sub> frente ao potencial interferente PBS-5% tween 80, meio receptor no teste de liberação <i>in vitro</i> . Em (A) análise do cromatograma do tampão contendo (PhSe) <sub>2</sub> , diluído em metanol. Em (B), observa-se o cromatograma de uma amostra de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH=7,4, contendo 5% de tween 80, diluída em metanol. Fase móvel: Metanol:água acidificada (90:10, v/v), 240 nm ..... | 58 |
| <b>Figura 9.</b> Curva analítica do (PhSe) <sub>2</sub> , fase móvel metanol:água acidificada (90:10, v/v) em 240 nm. O <i>slope</i> da curva ( <i>b</i> ), o desvio padrão do intercepto em y ( $\sigma$ ) e o coeficiente de correlação ( <i>r</i> ) são relatados ( <i>n</i> = 3).....  | 59 |
| <b>Figura 10.</b> Curva analítica para o LD e LQ (área do pico versus concentração de (PhSe) <sub>2</sub> . O <i>slope</i> da curva ( <i>b</i> ), o desvio padrão do intercepto em y ( $\sigma$ ) e o coeficiente de correlação ( <i>r</i> ) são relatados ( <i>n</i> = 3) .....   | 62 |
| <b>Figura 11.</b> Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> . Diâmetro médio de 219,1 nm e índice de polidispersão de 0,095, perfil monomodal .....  | 64 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 12.</b> Potencial zeta das Nps-PLA vazias (-26,8± 4,3) .....   | 67 |
| <b>Figura 13.</b> Potencial zeta das Nps-PLA-(PhSe) <sub>2</sub> (-24,4± 2,1) .....  | 67 |
| <b>Figura 14.</b> Potencial zeta das Nps-PLA-(PhSe) <sub>2</sub> após liofilização (-23,6± 3,64).....  | 68 |
| <b>Figura 15.</b> Espectros na região do infravermelho: a) PLA, b) (PhSe) <sub>2</sub> , c) Nanopartículas de PLA vazias, d) Nanopartículas de PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub> .....  | 70 |
| <b>Figura 16.</b> Difractogramas obtidos por DRX: a) PLA, b) (PhSe) <sub>2</sub> , c) Nanopartículas PLA vazias, d) Nanopartículas PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub> .....  | 72 |
| <b>Figura 17.</b> Curvas de DSC e DTG: a) (PhSe) <sub>2</sub> , b) Nanopartícula PLA vazias, c) Nanopartículas PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub> .....  | 73 |
| <b>Figura 18.</b> Microscopia eletrônica de Varredura das nanopartículas de PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub> , aumento de 30000 vezes .....  | 76 |
| <b>Figura 19.</b> Cromatogramas que mostram os resultados no teste de estabilidade para o padrão de (PhSe) <sub>2</sub> em tampão fosfato pH 7,4, em função do tempo .....   | 77 |
| <b>Figura 20.</b> Diâmetro médio das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> (suspensão) em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.....   | 79 |
| <b>Figura 21.</b> Índice de polidispersão das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> (suspensão) em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.....  | 80 |
| <b>Figura 22.</b> Potencial zeta das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> (suspensão) em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3 .....  | 81 |
| <b>Figura 23.</b> Diâmetro médio das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> liofilizadas em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.....  | 83 |
| <b>Figura 24.</b> Índice de polidispersão das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> liofilizadas em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.....   | 83 |
| <b>Figura 25.</b> Potencial zeta das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> liofilizadas em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3 .....   | 84 |
| <b>Figura 26.</b> Porcentagem de liberação cumulativa <i>in vitro</i> de nanopartículas do (PhSe) <sub>2</sub> em solução de PBS tween 80 a 5% (50 mM, pH=7,4 à 37 °C) .....   | 86 |
| <b>Figura 27.</b> Porcentagem de hemólise produzida pelo controle positivo (CP), tampão, etanol, nanopartículas de PLA (Np-PLA), Disseleneto de Difenila (PhSe) <sub>2</sub> (25, 50 e 100 µg.mL <sup>-1</sup> ) e nanopartículas de PLA contendo Disseleneto de Difenila (Np-PLA-(PhSe) <sub>2</sub> ) (25, 50 e e 100 µg.mL <sup>-1</sup> ) em a) 4 horas; b) 8 horas; c) 24 horas; d) 48 horas; e) 72 horas ..... | 93 |
| <b>Figura 28.</b> Atividade hemolítica pela diferença de coloração do sobrenadante após a centrifugação .....  | 94 |

**Figura 29.** Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> encapsulado e não encapsulado sobre a linhagem B16-F10, em a) 24 h, b) 48 h e c)72 h ..... 96

**Figura 30.** Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> encapsulado e não encapsulado sobre a linhagem HEp-2, em a) 24 h, b) 48 h e c)72 h..... ..97

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Condições cromatográficas utilizadas para validação do método analítico em CLAE.....   | 55 |
| <b>Tabela 2.</b> Sistema de adequação do método de CLAE.....  | 57 |
| <b>Tabela 3.</b> Ensaio de precisão para a análise do (PhSe) <sub>2</sub> .....   | 60 |
| <b>Tabela 4.</b> Porcentagem de recuperação e DPR obtido a partir da análise de exatidão..  | 61 |
| <b>Tabela 5.</b> Taxa de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações na fase móvel e fluxo, n=3 .....   | 63 |
| <b>Tabela 6.</b> Potencial zeta das nanopartículas de PLA na ausência e presença de (PhSe) <sub>2</sub> e nanopartículas contendo (PhSe) <sub>2</sub> após liofilização n=3, expressos em média ± DP..... | 66 |
| <b>Tabela 7.</b> Resultados do teste de estabilidade para os padrões de (PhSe) <sub>2</sub> em tampão fosfato pH 7,4 .....  | 76 |
| <b>Tabela 8.</b> Análise da cinética de liberação do (PhSe) <sub>2</sub> a partir das nanopartículas de PLA em tampão PBS- tween 80 a 5% (50 mM, pH=7,4).....   | 87 |
| <b>Tabela 9.</b> Porcentagem de Inibição do Ácido Hipocloroso pelo (PhSe) <sub>2</sub> (livre e nanoencapsulado) em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4) ( $\lambda$ =650 nm) .....                             | 90 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                         |   |
|-------------------------|---|
| (PhSe) <sub>2</sub>     | Disseleneto de Difenila                                     |
| ANOVA                   | Análise de variância  |
| ANVISA                  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                    |
| B16-F10                 | Melanoma Murino   |
| CLAE                    | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                    |
| CMC                     | Concentração micelar crítica                                |
| CO <sub>2</sub>         | Dióxido de Carbono  |
| DAD                     | Detector de Arranjo de Diodo                                |
| DCM                     | Diclorometano   |
| DP                      | Desvio Padrão   |
| DPR                     | Desvio Padrão Relativo                                      |
| DRX                     | Difratometria de Raios X                                    |
| DSC                     | Calorimetria Exploratória Diferencial                       |
| EC                      | Etil Celulose   |
| EE                      | Eficiência de encapsulação                                  |
| EPR                     | Efeito de permeabilidade e retenção aumentada               |
| FDA                     | <i>Food and Drug Administration</i>                         |
| HEp-2,                  | Carcinoma laríngeo humano                                   |
| ICH                     | <i>International Conference on Harmonisation</i>            |
| IP                      | Índice de polidispersão                                     |
| IV                      | Espectroscopia da Região do Infravermelho                   |
| LD                      | Limite de Detecção  |
| LQ                      | Limite de Quantificação                                     |
| MEV-FEG                 | Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de Campo    |
| MET                     | Microscopia Eletrônica de Transmissão                       |
| MTT                     | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio |
| Nps                     | Nanopartículas poliméricas                                  |
| Nps-(Phse) <sub>2</sub> | Nanopartículas de PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub>          |
| O/A                     | Óleo em água  |

|              |  |
|--------------|--|
| OS           | Organocompostos de selênio                               |
| PB           | Tampão Fosfato   |
| PBS          | Tampão Fosfato Salino                                    |
| PBS TWEEN 1% | Solução tampão fosfato de sódio contendo 1 % de tween 80 |
| PCL          | Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)                         |
| PDA          | <i>Photodiode detector array</i>                         |
| PHB          | Poli ( $\beta$ -hidroxibutirato)                         |
| PLA          | Ácido (poli-láctico)                                     |
| PLGA         | Ácido poli (láctico-co-glicólico)                        |
| PVA          | Poli (álcool vinílico)                                   |
| <i>R</i>     | Coefficiente de correlação                               |
| Rpm          | Rotação por minuto                                       |
| TG           | Termogravimetria   |
| TMB          | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina                            |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....</b>                                       | <b>22</b> |
| 2.1. Selênio .....  | 22        |
| 2.1.1. Atividade Biológica.....   | 22        |
| 2.1.2. Absorção e excreção.....   | 23        |
| 2.1.3. Disseleneto de Difenila (PhSe) <sub>2</sub> .....                        | 24        |
| 2.2. Nanotecnologia Farmacêutica.....   | 26        |
| 2.2.1 Nanopartículas Poliméricas (Nps).....                                     | 29        |
| 2.2.2. Métodos de Obtenção das Nps .....  | 33        |
| 2.2.2.1. Emulsificação-Evaporação do Solvente .....                             | 34        |
| 2.3. Caracterização Físico-Química.....   | 36        |
| 2.3.1 Avaliação Morfológica.....  | 36        |
| 2.3.2. Tamanho das Partículas.....  | 37        |
| 2.3.3. Potencial Zeta.....  | 37        |
| 2.3.4. Difractometria de Raios X (DRX) .....                                    | 38        |
| 2.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) ..... | 39        |
| 2.3.6. Espectroscopia da Região do Infravermelho (IV).....                      | 40        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | <b>41</b> |
| 3.1. Objetivo Geral.....  | 41        |
| 3.2. Objetivos Específicos .....  | 41        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>42</b> |
| 4.1. Substâncias e Reagentes .....  | 42        |
| 4.1.1. Fármaco.....   | 42        |
| 4.1.2. Validação do método analítico .....                                      | 42        |
| 4.1.3. Produção das nanopartículas .....  | 42        |
| 4.1.4. Avaliação da atividade antioxidante .....                                | 42        |
| 4.1.5. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas.....                      | 42        |
| 4.1.6. Outros reagentes e solventes .....                                       | 43        |
| 4.2. Equipamentos e Acessórios .....  | 43        |
| 4.3. Metodologia.....   | 44        |
| 4.3.1. Desenho experimental .....   | 44        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.2. Desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação do (PhSe) <sub>2</sub> presente nas nanopartículas.....      | 45        |
| 4.3.2.1. Adequação do sistema cromatográfico desenvolvido .....  | 45        |
| 4.3.3. Obtenção das Nanopartículas .....   | 46        |
| 4.3.4. Caracterização Físico-Química das Nanopartículas.....   | 46        |
| 4.3.4.1. Determinação do Diâmetro Médio e Índice de Polidispersão .....  | 46        |
| 4.3.4.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação .....  | 47        |
| 4.3.4.3. Potencial Zeta .....  | 47        |
| 4.3.4.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (IV) .....  | 47        |
| 4.3.4.5. Difração de Raios X (DRX) .....   | 48        |
| 4.3.4.6. Análise Térmica.....  | 48        |
| 4.3.4.7. Microscopia de Varredura Eletrônica com emissão de Campo (MEV-FEG) .....  | 48        |
| 4.3.5. Estudo de Estabilidade .....  | 48        |
| 4.3.5.1. Avaliação da Estabilidade do (PhSe) <sub>2</sub> frente ao Tampão Fosfato pH 7,448  |           |
| 4.3.5.2. Avaliação da Estabilidade das Nanopartículas-(PhSe) <sub>2</sub> em suspensão...  | 49        |
| 4.3.5.3. Avaliação da Estabilidade das Nanopartículas-(PhSe) <sub>2</sub> liofilizadas.....  | 49        |
| 4.3.6. Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....   | 50        |
| 4.3.6.1. Estudo da Solubilidade .....  | 50        |
| 4.3.6.2. Perfil de Liberação <i>in vitro</i> .....   | 50        |
| 4.3.7. Aplicabilidade das Nanopartículas <i>in vitro</i> .....   | 51        |
| 4.3.7.1. Avaliação da Atividade Antioxidante das Nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> frente ao ácido hipocloroso (HOCl).....           | 51        |
| 4.3.7.2. Avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> sobre as hemácias .....                                   | 52        |
| 4.3.7.3. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub> sobre linhagem tumoral B16-F10 e HEP-2 ..... | 53        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>55</b> |
| 5.1. Validação do método analítico para quantificação do (PhSe) <sub>2</sub> nas nanopartículas .....                                    | 55        |
| 5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico .....  | 55        |
| 5.1.2. System suitability .....  | 56        |
| 5.1.3. Validação do método.....  | 57        |
| 5.1.3.1. Seletividade .....  | 57        |
| 5.1.3.2. Linearidade .....   | 58        |
| 5.1.3.3. Precisão.....   | 59        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.1.3.4. Exatidão .....  | 60         |
| 5.1.3.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....  | 61         |
| 5.1.3.6. Robustez .....  | 62         |
| 5.2. Obtenção de nanopartículas contendo (PhSe) <sub>2</sub> .....   | 63         |
| 5.3. Caracterização Físico-Química das nanopartículas .....  | 64         |
| 5.3.1. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão.....   | 64         |
| 5.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação .....  | 65         |
| 5.3.3. Potencial Zeta.....   | 66         |
| 5.3.4. Espectroscopia de Absorção na Região Do Infravermelho.....  | 68         |
| 5.3.5. Difração de Raios X (DRX) .....   | 70         |
| 5.3.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) .....   | 73         |
| 5.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura .....   | 75         |
| 5.4. Estudo de Estabilidade.....   | 76         |
| 5.4.1. Avaliação da Estabilidade do (PhSe) <sub>2</sub> frente ao Tampão Fosfato pH 7,4.....   | 76         |
| 5.4.2. Avaliação da estabilidade das nanopartículas - (PhSe) <sub>2</sub> em suspensão .....   | 77         |
| 5.4.3. Avaliação da estabilidade das nanopartículas - (PhSe) <sub>2</sub> liofilizadas.....  | 82         |
| 5.5. Estudo de Liberação <i>in vitro</i> .....   | 85         |
| 5.5.1. Estudo da solubilidade .....  | 85         |
| 5.5.2. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....   | 85         |
| 5.6. Aplicabilidade das Nanopartículas .....   | 89         |
| 5.6.1 Estudo do potencial antioxidante das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> frente ao HOCl .....                                  | 89         |
| 5.6.2. Atividade Hemolítica das nanopartículas de (PhSe) <sub>2</sub> sobre as hemácias. ....  | 91         |
| 5.6.3. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo (PhSe) <sub>2</sub> sobre linhagem tumoral B16-F10 e HEp-2 ..... | 94         |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>102</b> |
| <b>ANEXO A.....</b>  | <b>121</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O selênio é um elemento que possui diversas funções no organismo humano e seus baixos níveis podem levar ao desenvolvimento de algumas patologias, tais como câncer, artrite, esclerose, doença cardiovascular, doenças virais, cirrose e diabetes (NAVARRO-ALARCÓN e LÓPEZ-MARTINEZ, 2000). Entretanto, elevadas doses de selênio podem ser citotóxicas, uma vez que possuem a habilidade de oxidar grupos – SH e gerar radicais livres (BARBOSA et al., 2008; NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004).

O selênio possui atividade redox e um papel fundamental no organismo por fazer parte do sítio ativo de diversas enzimas, portanto níveis intermediários de selênio são essenciais para diversas funções celulares. Moléculas contendo selênio, como por exemplo, o disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>, podem atuar melhor como nucleófilos e, portanto, antioxidantes mais efetivos, do que os próprios antioxidantes clássicos (ARTEEL e SIES, 2001). Por isso, compostos de selênio estão sendo apontados como possíveis estratégias terapêuticas para uma grande variedade de doenças (PARNHAM e GRAF, 1991; ZENG e COMBS, 2008; SANMARTIN et al., 2011; KHULLAR et al., 2010).

O (PhSe)<sub>2</sub> é um organocomposto de selênio simples, estável e amplamente utilizado como intermediário em sínteses orgânicas (NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004). Diversos estudos têm focado nos efeitos farmacológicos e toxicológicos do (PhSe)<sub>2</sub> em diferentes modelos, destacando sua atividade antinociceptiva (SAVEGNAGO et al., 2007), ansiolítica (SAVEGNAGO et al., 2008), antioxidante (MEOTTI et al., 2004; NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004; PRIGOL et al., 2009 a), antiúlcera (SAVEGNAGO, et al., 2006), neuroprotetora (GHISLENI et al., 2008) e hipoglicemiante (KADE et al., 2009; BARBOSA et al., 2006). Porém, o (PhSe)<sub>2</sub> é um composto altamente lipofílico, e essa lipofilicidade resulta em uma baixa biodisponibilidade (PRIGOL et al., 2010), e conseqüentemente, em uma eficácia reduzida. Entretanto, apesar dos variados efeitos farmacológicos, o composto mostrou-se tóxico quando administrado em doses elevadas (DE BEM et al., 2006).

A nanotecnologia possui o objetivo de desenvolver novos sistemas funcionais em escala nanométrica (inferiores a 1 µm), melhorando ou criando novas características físico-químicas ou biológicas (SAFARI e ZARNEGAR, 2014). As pesquisas incluindo a nanotecnologia estão envolvidas no avanço de áreas como engenharia, química, física, robótica, biologia, medicina e entre outras, sendo que a maior área de concentração (68%)

está relacionada aos medicamentos (SAFARI e ZARNEGAR, 2014; MARTINS et al., 2014).

A nanotecnologia farmacêutica é uma interessante estratégia para aumentar a biodisponibilidade de moléculas lipofílicas, uma vez que as características físico-químicas das nanopartículas afetam a biodistribuição e biodisponibilidade do fármaco. A utilização desses sistemas nanoestruturados permite ainda um controle muito maior da velocidade com que o ativo é liberado, fazendo com que as concentrações não atinjam limites tóxicos (SOPPIMATH et al., 2001; HEURTAULT et al., 2003). De maneira geral, a nanoencapsulação busca uma liberação controlada, um direcionamento do fármaco para determinados grupos de células, e o carreamento de quantidades adequadas de fármaco para o local desejado, reduzindo os efeitos colaterais e tóxicos sobre outros tecidos, o que auxilia na adesão do tratamento pelos pacientes (ARAKI, 2007; SAFARI e ZARNEGAR, 2014).

Os dispositivos nanométricos utilizados para vetorizar fármacos podem ser: nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, lipossomas, complexos lipídicos, dentre outros (JAIN, HIRST e O'SOLLIVAN, 2012). As nanopartículas poliméricas destacam-se dos demais devido aos seus potenciais terapêuticos e por sua maior estabilidade, tanto em fluídos biológicos quanto durante o armazenamento (BARRAT, 2000; BARRAT, 2003; GUTERRES, ALVES e POHLMANN, 2007). Podem ser definidas como sistemas carreadores de fármacos compostas de polímeros e copolímeros biodegradáveis ou bioestáveis, que apresentam um tamanho inferior a 1000 nm (DILNAWAZ, 2010). Os polímeros empregados para obtenção dessas nanopartículas, podem ser naturais (KAYSER, LEMKE e HERNÁNDEZ-TREJO, 2005; NAHAR et al., 2008), ou sintéticos como o PLA (ácido polilático) e o PLGA (ácido poli lactico-co glicólico), que são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso humano (JAIN, 2000; THOMAS e BURG, 2004; KUMARI, YADAV e YADAV, 2010).

Os métodos utilizados para a preparação das nanopartículas poliméricas podem ser divididos em duas classes principais: métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (LEGRAND et al., 1999). A polimerização *in situ* tem como desvantagem, apresentar moléculas residuais que possam causar toxicidade, sendo então preferível os métodos que utilizam os polímeros pré-formados (REIS, NEUFELD e VEIGA, 2006), como por exemplo a emulsificação/evaporação do solvente. Esta técnica foi a primeira a ser descrita e ainda é

a mais utilizada (VANDERHOFF, EL ASSER e UGELSTAD, 1979), pois possui a vantagem de realizar a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos, pela emulsão dupla água-em-óleo-em-água (A/O/A), quanto de fármacos hidrofóbicos, por meio da emulsão simples óleo-em-água (O/A) (HANS e LOWMAN, 2002; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

A obtenção de nanopartículas requer uma extensa caracterização físico-química e determinação do teor do composto dentro das nanopartículas. Este segundo parâmetro deve ser devidamente verificado porque a droga deve ser encapsulada de maneira eficiente, a fim de atingir seu objetivo terapêutico. Para isso, é necessário um método de quantificação validado e adequado para as nanopartículas em questão.

Diante dessas considerações, o presente estudo propõe o desenvolvimento tecnológico e a caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas contendo  $(\text{PhSe})_2$ , visando a manutenção das suas propriedades farmacológicas, bem como a redução da sua toxicidade.

## 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1. Selênio

O selênio (Se) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jakob Berzelius. Esse elemento químico é pertencente à família dos calcogênios, grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{2-}$ ). Elementos como oxigênio (O), Telúrio (Te) e o Polônio (Po) completam essa família (RAMADAN et al., 1989). O Se compartilha propriedades físicas e químicas com o elemento enxofre (S) em sistemas biológicos. Porém, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre Se e S constituem a base de seus papéis biológicos específicos (STADTMAN, 1980).

Por apresentar atividade redox, o selênio é capaz de reduzir peróxidos de hidrogênio, hidroperóxidos de lipídeos e fosfolipídeos, através da glutathione peroxidase dependente de selênio. Sendo assim, esta função auxilia na integridade da membrana, protege a produção de prostaciclina e reduz a probabilidade de propagação do dano oxidativo das biomoléculas como lipídeos, lipoproteínas e DNA que estão associados ao aumento do risco de doenças como aterosclerose e câncer (RAYMAN, 2000).

#### 2.1.1. Atividade Biológica

O Selênio, elemento traço essencial, teve sua importância nutricional demonstrada somente em 1957 (SCHWARTZ, CALVIN e FOLTZ, 1957). Antes disso, o único interesse biológico prático para o selênio era o fato de que elevados níveis deste elemento causavam toxicidade (LEVANDER e BURK, 1994). Atualmente ainda se leva em consideração esse problema, uma vez que estudos com altas doses de Se demonstraram citotoxicidade, devido à habilidade desse elemento de oxidar grupos-SH e gerar radicais livres (BARBOSA et al, 2008, NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004).

Por outro lado, estudos têm revelado que baixos níveis de Se podem levar a predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, artrite, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (NAVARRO-ALARCÓN e LÓPEZ-MARTINEZ, 2000). Portanto, a suplementação com Se, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. Para humanos, a junta de alimentação e nutrição da academia de ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200  $\mu\text{g}$ , a qual é considerada segura e saudável para adultos. A

suplementação com Se demonstrou ser capaz de proteger células endoteliais da injúria oxidativa (THOMAS et al., 1993), além disso, sabe-se que existe uma correlação inversa entre o risco de doenças cardiovasculares e o Se (HUTTUNEN, 1997). Dados da literatura sugerem que o Se pode ser um potente modulador da síntese de prostaciclina e do metabolismo das lipoproteínas, sugerindo seu potencial antiaterogênico (MEYDANI, 1992; QU et al., 2000; HUANG et al., 2002). Dhingra e Bansal (2006) mostraram ainda que a suplementação diminuiu os níveis séricos de colesterol total e da apolipoproteína B-100 em ratos. O Se pode ser encontrado em diversos alimentos, tais como: castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (DUMONT, VANHAECKE e CORNELIS, 2006).

O Se apresenta um grande número de funções biológicas, sendo mais importante como antioxidante. Sabe-se que o selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutatona peroxidase (WINGLER e BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999), tioredoxina redutase (HOLMGREN, 1985), 5'-deiodinase (BEHNE e KYRIAKOPOULOS, 1990) e selenoproteína P (URSINI et al., 1999), sendo que a atividade redox do Se tem importância fundamental para o sítio catalítico enzimático. Além disso, vários relatos demonstram que os compostos de Se mimetizam a atividade dessa enzima (WINGLER e BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

#### 2.1.2. Absorção e excreção

O selênio nos mamíferos é rapidamente absorvido no duodeno seguido pelo jejuno e íleo, além disso, pode ser absorvido também por tecidos cutâneos e inalação, principalmente em casos de intoxicação (WHANGER et al., 1976). Após a absorção, os maiores níveis de selênio estão localizados nos eritrócitos, baço, coração, unha e esmalte dos dentes (MARTIN e GERLACK, 1972). Na intoxicação crônica em animais, o selênio deposita-se principalmente nos rins e fígado, seguido pelo pâncreas, baço e pulmões (WILBER, 1980).

A excreção pode ocorrer por três vias: urina, fezes e ar expirado (SUZUKI, SOMEKAWA e SUZUKI, 2006). A excreção urinária do Se pode auxiliar em casos de intoxicações ou de exposição a altos níveis deste elemento (VALENTINE, KANG e SPIVEY, 1978). Suzuki e colaboradores (2006) demonstraram que dentro dos níveis normais de selênio, ou seja, não tóxicos, a principal forma encontrada na urina é como

seleno-açúcar, já nos caso de doses tóxicas de selênio, o marcador biológico encontrado na urina é o trimetilselenônio.

### 2.1.3. Disseleneto de Difenila (PhSe)<sub>2</sub>

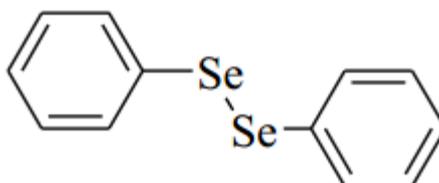
Os compostos orgânicos que possuem um elemento calcogênio em sua estrutura são chamados de organocalcogênios. Tais compostos são amplamente utilizados na indústria química, tanto como reagentes, como intermediários de reação em processos de síntese orgânica (PAULMIER, 1986). Desde a década de 30, os organocalcogênios vêm sendo estudados em função da descoberta de suas aplicações sintéticas (COMASSETO, 1983) e de suas propriedades farmacológicas, bem como suas propriedades toxicológicas (KANDA, ENGMAN e COTGREAVE, 1999; PARNHAM e GRAF, 1991; NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004).

A descoberta de que moléculas contendo selênio apresentam um grande número de funções biológicas além de poderem ser melhores nucleófilos, e portanto, melhores antioxidante do que os antioxidantes clássicos, aumentou o interesse na síntese de novos organocompostos de selênio (OS) que possuam atividade biológica e aplicações farmacológicas com o mínimo de toxicidade e efeitos adversos (ARTEEL e SIES, 2001). Compostos de Se estão sendo apontados como possíveis estratégias terapêuticas para uma grande variedade de patologias como doenças virais, artrite, hipertensão, dislipidemias, dentre outras (PARNHAM e GRAF, 1991; YOSHIZUMI et al., 2002, 2004; NOGUEIRA, ZENI e ROCHA, 2004; XU et al., 2010). O fato de que os compostos orgânicos de selênio são menos tóxicos em comparação com as espécies de selênio inorgânicas (NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004) faz com que compostos como o disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>, torne-se alvo dessas pesquisas.

O (PhSe)<sub>2</sub>, cuja estrutura está representada na Figura 1, é um OS simples, estável e amplamente utilizado como intermediário em sínteses orgânicas, conhecido também por mimetizar ação da glutathione peroxidase em sistemas biológicos (WIRTH, 2000; NOGUEIRA e ROCHA, 2010). O (PhSe)<sub>2</sub> demonstrou ser mais ativo como mimético da glutathione peroxidase e menos tóxico em roedores que o ebselen, um outro organocomposto do selênio (NOGUEIRA et al., 2003; MEOTTI et al., 2004). Por este composto ser um bom candidato em propostas terapêuticas, muitos estudos têm focado

nos efeitos toxicológicos e farmacológicos do  $(\text{PhSe})_2$  em diferentes modelos biológicos (ROSA et al., 2007).

**Figura 1.** Estrutura química do  $(\text{PhSe})_2$ .



Fonte: (ROSA et al., 2010).

De fato, estudos em animais de laboratório demonstraram que esse composto apresenta propriedades antiúlcera (SAVEGNAGO, et al, 2006), anti-inflamatória, antinociceptiva (SAVEGNAGO et al, 2007), antidepressiva (SAVEGNAGO et al, 2008) e ansiolítica (SAVEGNAGO et al, 2008). O  $(\text{PhSe})_2$  pode ainda reduzir os níveis de glicose sanguínea em ratos tratados com estreptozotocina quando comparado com ratos diabéticos não tratados (KADE et al., 2009; BARBOSA et al., 2006), pode retardar o desenvolvimento de câncer (BARBOSA et al., 2008) e apresentar atividade complexante em animais expostos ao cádmio (SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2004; BORGES et al., 2008; LUCHESE, PINTON e NOGUEIRA, 2009). A literatura sugere ainda, que pelo fato do  $(\text{PhSe})_2$  possuir atividade semelhante à da glutathione peroxidase, este composto pode ser útil na terapia antioxidante contra o estresse oxidativo (MEOTTI et al., 2004; NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004; PRIGOL et al., 2009a). Além disso, apresentam atividade antiaterogênica, (DE BEM et al., 2008; DE BEM et al., 2009), antígeno tóxica, antimutagênica (ROSA et al., 2007) e antisecretora (SAVEGNAGO, et al., 2006; INEU et al., 2008). Propriedades hepatoprotetora e neuroprotetora também foram demonstradas por este composto (BORGES et al., 2005; BORGES et al., 2006; BORGES et al., 2008; NOGUEIRA, BORGES e SOUZA, 2009; GHISLENI et al, 2003; GHISLENI et al, 2008).

Apesar de  $(\text{PhSe})_2$  desempenhar uma variedade de efeitos farmacológicos, altas doses têm demonstrado danos ao sistema nervoso central de camundongos, causando diminuição da transmissão glutamatérgica, bem como toxicidade hepática e renal (MEOTTI et al., 2004; PRIGOL et al., 2008), com efeitos mais tóxicos quando administrado por via intraperitoneal do que subcutânea (MEOTTI et al., 2004). O

mecanismo proposto para explicar a toxicidade de compostos de selênio, envolve a oxidação de grupos – SH de moléculas biologicamente ativas (NOGUEIRA, ZENI e ROCHA et al., 2004).

A farmacocinética do  $(\text{PhSe})_2$  foi estudada por Prigol e colaboradores (2009 b), demonstrando que o pico plasmático após a administração oral ( $500 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) foi de 30 minutos e a concentração plasmática máxima foi de  $13,13 \mu\text{g.ml}^{-1}$  para ratos e  $10,11 \mu\text{g.ml}^{-1}$  para camundongos, decaindo continuamente e permanecendo detectável por até 8 horas após sua administração. Prigol estudou modelos cinéticos *in vitro* e constatou que o princípio ativo em questão apresenta baixa solubilidade aquosa ( $0,98 \mu\text{M}$ ) e que o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (capaz de predizer a habilidade do composto em transpor membranas) é bastante elevado (3,14) indicando que o composto apresenta rápida absorção pelo trato intestinal e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, devido a essa alta lipofilicidade (PRIGOL et al., 2010). O alto grau de lipofilicidade pode ainda explicar a rápida disponibilidade na corrente sanguínea, além da rápida queda nos níveis do  $(\text{PhSe})_2$ . Por isso as concentrações do  $(\text{PhSe})_2$  encontradas na circulação são muito mais baixas quando comparadas à dose administrada, logo sua eficácia também é prejudicada (PRIGOL et al., 2010).

Por esta razão, a utilização da nanotecnologia é uma excelente opção para aumentar a biodisponibilidade de moléculas lipofílicas, uma vez que as características físico-químicas das nanopartículas influenciam a farmacocinética da droga, e afetam a sua biodistribuição e biodisponibilidade. A utilização desses sistemas nanoestruturados permite ainda um controle muito maior da velocidade com que o ativo é liberado, fazendo com que as concentrações dos ativos não atinjam limites tóxicos (SOPPIMATH et al., 2001; HEURTAULT et al., 2003).

## **2.2. Nanotecnologia Farmacêutica**

A nanotecnologia é um dos campos mais promissores e inovadores na área científica, que tem por objetivo manipular a matéria em nanômetros (nm) (unidade de medida que corresponde à bilionésima ( $10^{-9}$ ) parte do metro), para criar estruturas com uma organização molecular diferenciada. O princípio dessa ciência é que os componentes em escala manométrica (inferiores a  $1\mu\text{m}$ ) podem apresentar propriedades químicas,

físico-químicas e comportamentais diferenciadas daquelas conhecidas em escalas maiores (PINA et al., 2006, SOPPIMATH et al., 2001).

O conceito de nanotecnologia foi introduzido em 1960, por Richard Feynman e a partir disso começou a ganhar destaque em diversas áreas. Quando aplicada a área da medicina e farmácia, é possível destacar algumas das diversas aplicações da nanotecnologia, como: biossensores para uso diagnóstico (JAIN, 2005), vacinas (PEEK, MIDDAUGH e BERKLAND, 2008), material genético (PARVEEN, MISRA e SAHOO, 2012), proteínas (JAHANSHAHI e BABAEI, 2008), cosméticos (MIHRANYAN, FERRAZ e STROMME, 2012), implantes, próteses (LIU e WEBSTER, 2007) e veiculação de fármacos (BARRAT, 2000; KUMARI, YADAV e YADAV, 2010; PARVEEN, et al., 2011).

A veiculação de fármacos a partir de nanocarreadores vem sendo implantada na tentativa de eliminar os inconvenientes encontrados pela terapia convencional que, em muitos casos, limitam o alcance significativo do fármaco ao seu sítio de ação. De uma maneira geral a nanoencapsulação busca a criação de estratégias que proporcionem direcionamento do ativo para as células alvo, um maior controle da liberação de fármacos, e menor toxicidade para os demais tecidos, a fim de melhorar seu índice terapêutico (SCHAFFAZICK et al., 2003; NAIR et al., 2010).

Em relação às formulações convencionais, os sistemas de nanocarreadores apresentam inúmeras vantagens, tais como:

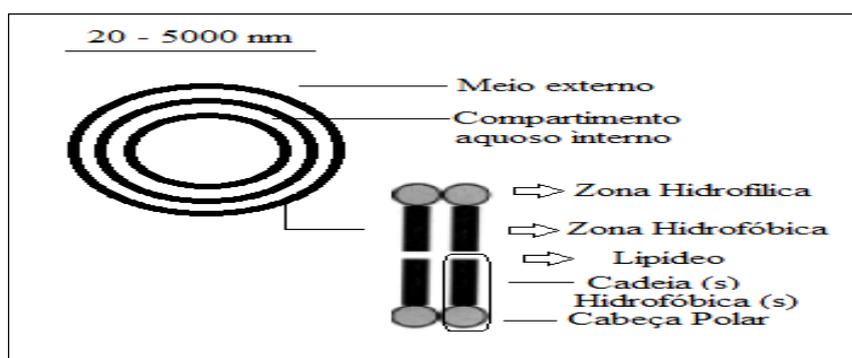
- Maior eficácia terapêutica,
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação,
- Direcionamento a alvos específicos,
- Liberação progressiva e controlada do fármaco,
- Incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, aumentando consequentemente a biodisponibilidade de substâncias fracamente solúveis (BAMRUNGSAP et al., 2012),
- Minimização dos efeitos colaterais, limitações e as inconveniências do tratamento do câncer, visto que a técnica aumenta consideravelmente a concentração do fármaco encapsulado nos tumores sólidos (FERRARI, 2005; LIECHTY e PEPPAS, 2012).

Dentre as principais estratégias vetoriais, incluem-se as nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas, complexos lipídicos dentre outros (MAINARDES, GREMIÃO e EVANGELISTA, 2006). A escolha do dispositivo a ser usado no carregamento do fármaco depende da ação desejada e da compatibilidade físico-química.

As nanoemulsões são sistemas transparentes ou translúcidos semelhantes às nanocápsulas, porém sem a presença do polímero em sua formulação (TADROS et al., 2004). Estes compostos apresentam como vantagem maior capacidade de solubilização, rápido início de ação, segurança toxicológica e a possibilidade de produção em larga escala (PARVENN et al., 2011).

Os lipossomas, representados na Figura 2, são constituídos de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas que circundam o núcleo aquoso interno usado para o encapsulamento de drogas, podem ser classificados em lipossomas unilamelares ou multilamelares. Estes compostos são biodegradáveis e biocompatíveis, dada a sua estrutura existe a possibilidade de incorporarem tanto fármacos lipossolúveis, quanto hidrossolúveis, ficando os primeiros inseridos ou adsorvidos à membrana e os segundos no compartimento aquoso. Não apresentam toxicidade e não são invasivos (BARRAT, 2003; CUKIERMAN e KHAN, 2010).

**Figura 2.** Representação esquemática de um lipossoma.



Fonte: (Adaptado de CUKIERMAN e KHAN, 2010).

Os lipossomas apresentam vantagens em relação aos sistemas convencionais por aumentarem a eficácia dos fármacos e reduzirem seus efeitos tóxicos. Atualmente, já existem formulações sendo comercializadas contendo lipossomas para o tratamento de câncer e infecções fúngicas sistêmicas (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES,

2007). Estudos mostram que lipossomas de aproximadamente 100 nm de diâmetro podem ser ótimos para entrega de quimioterápicos para tumores (CUKIERMAN e KHAN, 2010).

Tanto as nanopartículas lipídicas sólidas como os vetores lipídicos nanoestruturados são sistemas de veiculação baseados em matrizes lipídicas e sólidas à temperatura corporal, de tamanhos inferiores a 500 nm (MÄDER e MEHNERT, 2001). Os lipídeos mais utilizados para essas formulações são os que apresentam forma cilíndrica como, por exemplo, fosfatidilcolinas, fosfatidileserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline que tendem a formar uma bicamada mais estável em solução aquosa. Existem, no entanto, limitações naturais a estes sistemas. Estes só são capazes de apresentar uma boa eficácia de encapsulação para compostos ou fármacos lipofílicos, solúveis na matriz lipídica (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007).

As nanopartículas poliméricas (nanocápsulas ou nanoesferas) por sua vez apresentam vantagens em relação aos demais carreadores principalmente devido a sua maior estabilidade em fluídos biológicos e também durante o armazenamento (BARRAT, 2000; BARRAT, 2003). Por ser um dos dispositivos nanométricos mais explorados, focaremos o estudo nesta classe.

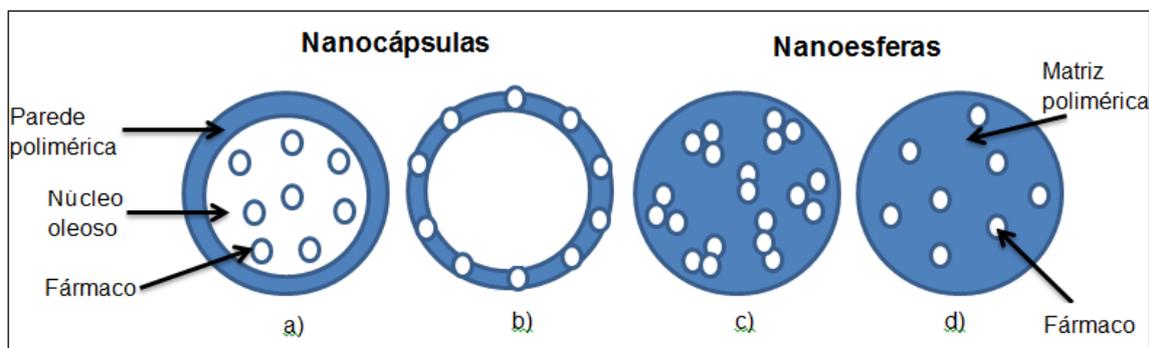
### 2.2.1 Nanopartículas Poliméricas (Nps)

A utilização de polímeros para a encapsulação dos ativos é uma opção para mascarar as propriedades físico-químicas da substância, e melhorar sua interação com membranas, bem como o transporte através delas. Já que, após a associação, a distribuição biológica da nanopartícula passa a depender das características físico-químicas do carreador e não mais das propriedades do fármaco (COUVREUR et al, 2002).

Dependendo do método de preparação podem obter-se nanocápsulas ou nanoesferas, estas diferem entre si na composição e organização estrutural, que pode ser observado na Figura 3. As nanocápsulas constituem sistemas do tipo reservatório onde é possível identificar um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso sendo que o ativo pode estar dissolvido neste núcleo ou adsorvido ao polímero. Já as nanoesferas, estas não possuem óleo em sua composição, portanto, não é possível identificar um núcleo diferenciado. Nela, o fármaco encontra-se homoganeamente

disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

**Figura 3.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: (SCHAFFAZICK et al., 2003).

As Nps apresentam vantagens adicionais comparados aos outros sistemas nanométricos, pois possibilitam o carregamento de grande quantidade de fármaco, possuem grande estabilidade, proporcionam maior controle sobre a cinética de liberação do fármaco, permitem facilmente as modificações superficiais, podem ser obtidas por inúmeros métodos e ainda, propiciam segurança adicional, uma vez que polímeros apresentam uma longa história de segura utilização *in vivo* (SOPPIMATH et al., 2001; OLIVIER, 2005; PATEL et al., 2012; KAYSER, LEMKE e HERNÁNDEZ-TREJO, 2005).

Esses sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial possibilitando uma liberação homogênea e, na maioria das vezes, controlada do fármaco. Esta característica somada ao fato de usarem-se materiais biodegradáveis durante a preparação faz com que a liberação sustentada do ativo no local possa durar dias ou até mesmo semanas (SOPPIMATH et al., 2001; BARRAT, 2000; BARRAT, 2003). Em razão de uma possível vetorização para órgãos, tecidos ou células específicas também apresentam como vantagem uma diminuição de efeitos adversos (SCHAFFAZICK et al., 2003; GUTERRES, ALVES e POHLMANN, 2007).

Devido ao pequeno diâmetro, as Nps apresentam uma versatilidade quanto à forma de administração, quando comparada com as micropartículas. As micropartículas poliméricas com diâmetro maior que 1  $\mu\text{m}$  não podem ser administradas por uma rota geral e devem ser implantadas próximas ao sítio de ação pretendido. Por outro lado,

partículas nanométricas são capazes de serem administradas pela via parenteral sendo capazes de liberar o ativo no local de ação distante do ponto da administração (SOPPIMATH et al., 2001; SINGH e LILLARD, 2009).

Quanto aos polímeros utilizados para obtenção das Nps, estes em geral são constituídos, por mais de 50 monômeros, e ao se agregarem em um padrão regular, formam um reservatório ou matriz onde o fármaco estará inserido. Os polímeros que são utilizados na nanotecnologia farmacêutica a fim de carrear fármacos devem apresentar algumas características em especiais, tanto químicas, quanto mecânicas e biológicas, como apresentado no Quadro 1 (ANGELOVA e HUNKELER, 1999; SAFARI e ZARNEGAR, 2014).

**Quadro 1.** Características dos polímeros usados em nanotecnologia farmacêutica.

|           |  |
|-----------|--|
| Química   | Ausência de incompatibilidade entre polímero e fármaco;<br>Solubilidade em vários solventes;<br>Vida útil economicamente aceitável;  |
| Biológica | Ser biodegradável (via enzimática, química ou microbiana);<br>Proteger o fármaco <i>in vivo</i> contra possíveis degradações;<br>Levar a substância contida em seu interior até o alvo desejado;<br>Facilitar a penetração celular do fármaco;<br>Liberar o fármaco de maneira controlada, prolongando sua ação; |
| Mecânica  | Versatilidade estrutural de aplicação;<br>Apresentar capacidade de ser moldado e/ou deformado;<br>Resistência mecânica para atender às necessidades de aplicações;   |

Fonte: (ANGELOVA e HUNKELER, 1999; SAFARI e ZARNEGAR, 2014).

A biodegradabilidade de um polímero é uma característica muito importante, pois previne a toxicidade crônica após a administração, principalmente endovenosa. Esses materiais devem ser degradados em cadeias de baixa massa molecular e após a liberação do fármaco, devem ser metabolizados e eliminados ou absorvidos pelo organismo (NAIR et al., 2010). A biocompatibilidade com os tecidos do organismo é considerada também uma característica importante, pois, quando um nanomaterial interage com o organismo não pode induzir resposta tóxica, imunogênica, trombogênica e/ou carcinogênica (NAAHIDI et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros naturais tais como colágeno, gelatina, albumina sérica bovina e albumina sérica humana ou a partir de polímeros sintéticos os quais se destacam o ácido (poli-láctico) (PLA), ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), seguido por outros menos utilizados como etil celulose (EC), poli ( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB) e acetato de celulose (SOPPIMATH et al., 2001). Os polímeros naturais têm sido muito estudados, mas devido à sua baixa pureza, dificuldade de reprodução de lotes e alto custo, seu uso tem sido limitado (JAIN, HIRST e O'SULLIVAN, 2012), e têm se preferido utilizar polímeros sintéticos que apresentam boa degradabilidade e compatibilidade, além de pureza superior.

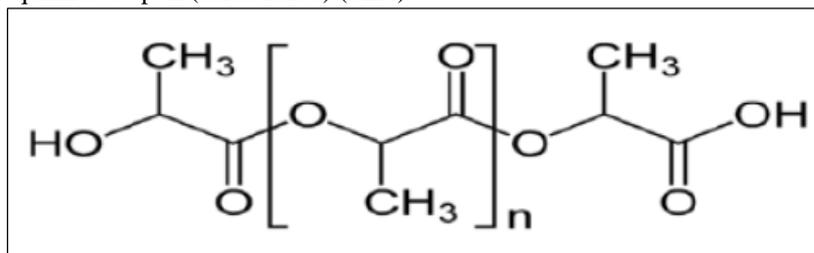
A escolha do tipo de polímero a ser utilizado deve ser feita de maneira criteriosa e específica, uma vez que este influenciará na cinética de liberação, estabilidade do fármaco bem como biocompatibilidade (ANDERSON e SHIVE, 1997). O PLA ou PLGA são poliésteres alifáticos aprovados pelo FDA para uso humano (JAIN, 2000; THOMAS e BURG, 2004), devido excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, possuem ainda ótima capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos (ESSA, RABANEL e HILDGEN, 2010).

Na Figura 4 está representada a estrutura química do PLA, que é o polímero de escolha para aplicação na área médica e farmacêutica, devido suas boas características e menor custo quando comparado a outros polímeros sintéticos. É obtido por meio da polimerização do ácido láctico e apresenta dois isômeros opticamente ativos, o dextrógiro e levógiro (D e L) ou uma mistura racêmica dos mesmos. Seu produto de degradação é o ácido láctico gerado a partir do rompimento da porção terminal da cadeia polimérica. Dessa forma, nas células o ácido láctico é convertido em piruvato pela lactato desidrogenase presente no coração, músculos e fígado, sendo eliminado via ciclo de

Krebs, principalmente pelos pulmões e rins, na forma de dióxido de carbono e água (BRANNON-PEPPAS, 1995; JAIN, 2000).

Nanopartículas de PLA têm sido principalmente elaboradas por métodos da emulsificação-evaporação do solvente, nanoprecipitação, *salting out* e difusão do solvente (NECKEL e LEMOS, 2005; KUMARI YADAV & YADAV, 2010).

**Figura 4.** Estrutura química do poli (ácido láctico) (PLA).



Fonte: (ESSA, RABANEL E HILDGEN, 2010).

#### 2.2.2. Métodos de Obtenção das Nps

Os métodos descritos na literatura para preparação das nanopartículas poliméricas podem ser divididos em duas classes principais: métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila), no qual os polímeros são formados simultaneamente às nanopartículas ou métodos baseados na precipitação de polímeros pré-formados (PLA, PLGA) (LEGRAND et al., 1999). A polimerização *in situ* tem como desvantagem, apresentar moléculas residuais (monômeros, oligômeros) que possam causar toxicidade. Portanto, métodos que obtém Nps a partir dos polímeros pré-formados são os mais comumente utilizados (REIS, NEUFELD e VEIGA, 2006).

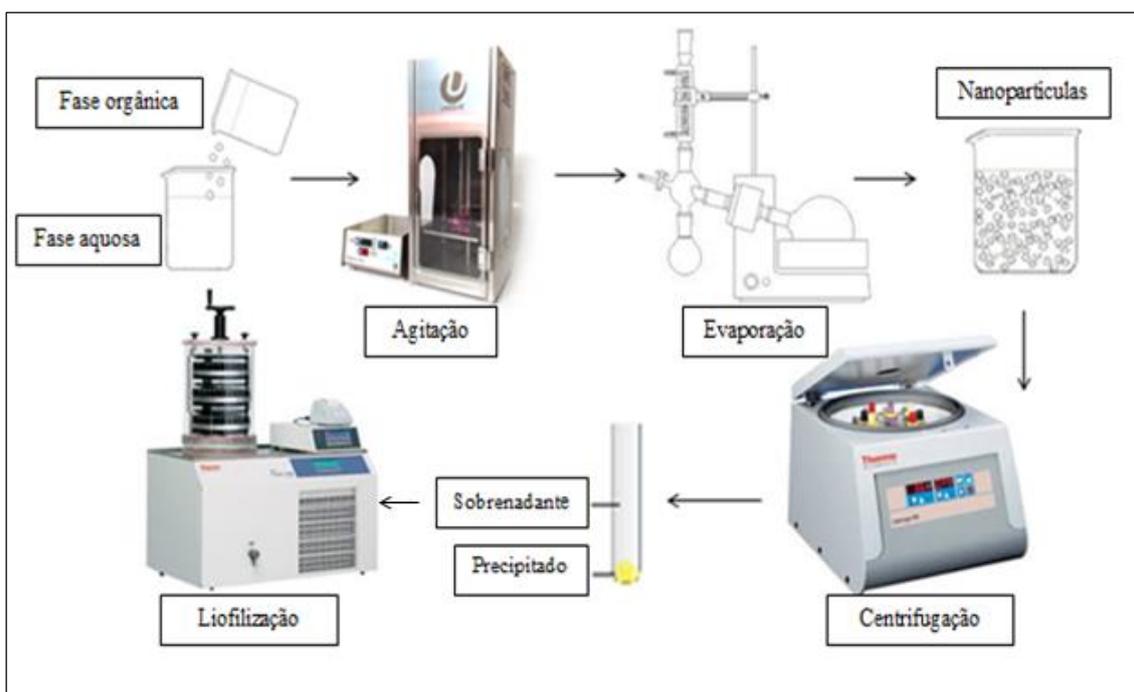
Características como tamanho, índice de polidispersão das nanopartículas e eficiência de encapsulação são advindas do método de preparação escolhido (FREITAS, MERKLE e GANDER, 2005). Em regra, a escolha de um método de preparação é determinada principalmente pelas características de solubilidade do princípio ativo (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009; SILVA et al., 2010). A técnica ideal para a preparação de Nps deve atender critérios básicos como: a estabilidade química e atividade biológica do fármaco deve ser mantidas durante o processo; e eficiência de encapsulação e o rendimento deve ser altos o suficiente para produção em massa; o tamanho médio das partículas deve ser compatível com a via de administração desejada; o perfil de liberação deve ser reprodutível e ainda a formulação precisa apresentar um baixo índice de polidispersão e ser ressuspensa facilmente em água (PARK, YE e PARK, 2005).

Um dos métodos que utiliza polímeros pré-formados é a emulsificação-  
evaporação do solvente. Esta foi a primeira técnica descrita para obtenção de  
nanopartículas e ainda é amplamente utilizada (VANDERHOFF, EL ASSER e  
UGELSTAD, 1979) devido apresentar uma grande vantagem, que é a capacidade de  
encapsular tanto fármacos hidrofílicos, pela emulsão dupla água-em-óleo-em-água  
(A/O/A), quanto fármacos hidrofóbicos, por meio da emulsão simples óleo-em-água  
(O/A) (HANS e LOWMAN, 2002; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

### 2.2.2.1. Emulsificação-Evaporação do Solvente

A Figura 5 demonstra o método denominado emulsificação-  
evaporação do solvente (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

**Figura 5.** Imagem ilustrativa do método de emulsificação-  
evaporação do solvente.



Fonte: O autor (2017).

Primeiramente, prepara-se uma fase orgânica, constituída por um solvente  
orgânico apolar no qual é dissolvido o polímero e incluído o princípio ativo. Prepara-se  
também uma fase aquosa, que contém um tensoativo do tipo O/A, como, por exemplo, o  
álcool polivinílico (PVA) (SILVA et al., 2010). A fase orgânica é então vertida na fase  
aquosa e aplica-se uma alta energia para homogeneização de modo formar a emulsão. A

agitação da emulsão é a etapa determinante para a obtenção das nanoesferas e deve ser realizada antes da precipitação do polímero, de modo a serem obtidas gotículas de fase interna de dimensões coloidais. Em seguida, promove-se a remoção do solvente orgânico, através da evaporação com elevação da temperatura sob pressões reduzidas ou agitação, levando a formação das nanoesferas sólidas devido à diminuição da solubilidade do polímero no solvente orgânico e sua consequente precipitação. Logo após, as nanopartículas são separadas por ultracentrifugação, lavadas com água deionizada e, por fim, liofilizadas (DESGOUILLES et al., 2003).

Para que o transporte de um carreador contendo fármaco seja eficiente através da circulação sanguínea, aconselha-se que essas estruturas não ultrapassem 300 nm de diâmetro (GUPTA e KOMPELLA, 2006). Dessa maneira, é imprescindível levar em consideração os inúmeros fatores que podem alterar o tamanho dessas nanopartículas, quando utiliza-se o método da emulsificação-evaporação do solvente:

- Concentração de polímero: A viscosidade da fase orgânica é proporcional a concentração do polímero, portanto, concentrações elevadas do polímero, resultam em nanopartículas com maiores tamanhos, devido à maior dificuldade de dispersão da fase interna na fase externa (ARAUJO et al., 2009).

- Natureza e concentração de tensoativo: em relação ao PVA, o tamanho das partículas tende a diminuir com aumento da concentração de PVA até sua concentração micelar crítica (CMC) (GANEVA et al., 2008);

- Taxa de agitação: é necessário submeter à emulsão a uma tensão de cisalhamento elevada para se obter gotículas com dimensões inferiores a 1  $\mu\text{m}$  (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998);

- Tipo e quantidade dos solventes: Para uma distribuição homogênea e partículas com tamanho reduzido, deve se utilizar preferencialmente um pequeno volume de solvente orgânico apolar, que possa se difundir facilmente através da fase aquosa, permitindo a precipitação do polímero e consequentemente a formação das Nps (KANAKUBO, ITO e MURAKAMI, 2010; XU et al., 2010).

A literatura apresenta inúmeros trabalhos avaliando atividades farmacológicas e toxicológicas do  $(\text{PhSe})_2$ , entretanto, até o momento somente Giordani e colaboradores, estudaram a associação do  $(\text{PhSe})_2$  com a nanotecnologia, obtendo nesse caso, nanocápsulas com diferentes tipos de óleos. Sendo assim, a nanoencapsulação do  $(\text{PhSe})_2$  com o polímero PLA apesar de nunca explorada, parece ser muito promissora, tornando-

se uma alternativa para melhorar os efeitos terapêuticos, reduzir os efeitos citotóxicos, e conseqüentemente, diminuir seus efeitos colaterais.

### **2.3. Caracterização Físico-Química**

As nanopartículas são obtidas como suspensões coloidais aquosas, entretanto, durante o tempo de armazenamento pode ocorrer à formação de agregados no meio, gerando precipitados, aliado a isso, pode existir problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco. A estabilidade limitada em função do tempo torna-se um obstáculo para a aplicabilidade industrial destas suspensões, dessa forma, a compreensão do comportamento físico-químico das nanopartículas poliméricas pode fornecer importantes informações em relação à estabilidade destes compostos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A partir das informações obtidas pela caracterização físico-química podem-se propor modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, sendo dependente da composição quali-quantitativa das formulações (SCHAFFAZICK et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003). A avaliação morfológica, distribuição de tamanho de partícula, determinação do potencial zeta, análise das interações moleculares entre o fármaco e o carreador, distinção entre sistemas/materiais cristalinos e/ou amorfos são exemplos desta caracterização.

#### **2.3.1 Avaliação Morfológica**

Para a avaliação morfológica, têm sido empregadas as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET), que fornecem informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. O MET permite ainda a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, e a determinação da espessura da parede no caso de nanocápsulas (SCHAFFAZICK et al., 2003; ROLLOT et al., 1986; MOSQUEIRA et al., 2000), a criofratura também tem auxiliado nessa diferenciação (FRETA et al., 1995). Outra técnica empregada é a microscopia de força atômica que fornece informações com alta resolução em três dimensões, sendo capaz de fornecer detalhes de superfície em nível atômico.

### 2.3.2. Tamanho das Partículas

O tamanho das partículas é um fator importante a ser avaliado, já que influencia diversos parâmetros como: perfil de liberação; estabilidade das formulações; distribuição *in vivo* como depuração, pois partículas maiores que 200 nm estão mais suscetíveis à eliminação pelo baço enquanto que partículas menores são eliminadas através do sistema de filtração pelo rim; e captação celular, já que as partículas menores que 500 nm são normalmente internalizadas por endocitose e acredita-se que partículas maiores que 500 nm são captadas por fagocitose (YOO, DOSHI e MITRAGOTRI, 2011; SINGH e LILLARD, 2009)

Normalmente as nanopartículas poliméricas apresentam diâmetros médios em torno de 100 a 300 nm, no entanto partículas com tamanhos ainda menores podem ser obtidas (GOVENDER et al., 2000). São diversos os fatores que podem afetar o diâmetro das nanopartículas, tais como natureza e concentração do polímero, polaridade do solvente, método de preparação, a natureza e a relação entre as fases interna e externa, além da natureza e concentração do surfactante (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

O tamanho das nanopartículas pode ser determinado por microscopias, ou também por um equipamento que emprega a técnica de espalhamento dinâmico de luz. Nesta técnica, um raio luminoso atravessa uma dispersão coloidal e atinge as nanopartículas que estão em movimento browniano, ocorrendo o espalhamento da luz em todas as direções, sem perda ou ganho de energia. Quanto maiores são as partículas, mais lentamente se movem, sendo também menor a velocidade das flutuações da luz dispersada, o equipamento relaciona então a quantidade de luz espalhada com o tamanho das partículas (XU, 2008).

### 2.3.3. Potencial Zeta

A determinação do potencial zeta é utilizada para caracterizar as propriedades de superfície das nanopartículas (SINGH e LILLARD, 2009; SOPPIMATH et al., 2001), pois ele reflete o potencial das cargas superficiais das partículas e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante. Isso ocorre em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al, 2003; SINGH e LILLARD, 2009).

Dessa forma, o valor do potencial zeta irá depender principalmente da natureza química do polímero e do agente estabilizante. Por exemplo, quando nanocápsulas são preparadas com polímeros de poliéster ou derivados de metacrilato usando estabilizante não iônico, o valor desta determinação será negativo devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero. Do mesmo modo, valores positivos serão obtidos quando polímeros catiônicos forem usados (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

A carga superficial pode influenciar significativamente a estabilidade de uma partícula em suspensão. De modo geral, valores de potencial zeta próximos a  $\pm 30$  mV predizem boa estabilidade coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões entre nanopartículas adjacentes (SCHAFFAZICK et al., 2003; ANDRADE et. al., 2008; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010).

O potencial zeta não pode ser medido diretamente, por isso é calculado através do rastreamento do movimento de partículas carregadas em um campo de tensão, chamada mobilidade eletroforética. Na prática, a suspensão coloidal diluída é introduzida em uma cubeta com dois eletrodos e é aplicado um potencial elétrico. As partículas com carga elétrica líquida irão se mover na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado.

#### 2.3.4. Difractometria de Raios X (DRX)

Os raios X são gerados quando um elétron gerado no cátodo de um tubo catódico, colide com um alvo metálico (ânodo). A difração de raios X é uma técnica não-destrutiva, que revela informações sobre a estrutura cristalográfica de materiais naturais e sintéticos, sendo que materiais cristalinos são capazes de difratar os raios X de maneira característica, dependendo de seu arranjo cristalino (DONG e BOYD, 2011).

As substâncias cristalinas são moléculas que possuem uma disposição de ordem definida, dependente de energia para desarranjar sua estrutura, sendo que quanto mais fortes forem as forças de atração de uma estrutura cristalina, maior será seu ponto de fusão. Já os sólidos amorfos não apresentam essa característica de organização, e também não apresentam as mesmas características do ponto fusão, uma vez que sua organização não necessita da mesma energia que os cristais para desarranjar sua estrutura (VLACK, 1970).

A conformação na qual uma substância sólida se encontra é um aspecto importante e implica nas demais características, como por exemplo na solubilidade e velocidade de dissolução (DHIRENDRA et al., 2009). A DRX é uma técnica indispensável para caracterizar nanopartículas, uma vez que é capaz de distinguir o material entre cristalino e amorfo, sendo que as substâncias cristalinas apresentam picos bem definidos, enquanto que os compostos amorfos apresentam-se de forma contrária, sem os picos definidos (DHIRENDRA et al., 2009).

### 2.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

As técnicas de análise térmica são extremamente utilizadas para caracterizar substâncias farmacêuticas sólidas. A termogravimetria (TG) é muito usada na análise de processos de dessolvatação, decomposição de substâncias e também em estudos de estabilidade. Ela mede a variação de massa em função da temperatura aplicada sendo restrita às transições que envolvem tanto ganho quanto perda de massa (BRITAIN, 1999).

A DSC é aplicada para investigações de mudanças termodinâmicas que ocorram durante o aquecimento da substância (BARKAI et al., 1990). A técnica mede a diferença de energia fornecida à substância de interesse e uma substância referência, termicamente inerte em função da temperatura (IONASHIRO e GIOLITO, 1980; GIOLITO e IONASHIRO, 1988). As medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos em relação a mudanças físicas e químicas que envolvem processos exotérmicos e endotérmicos ou mudanças de massa (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002).

Dessa forma as técnicas de análise térmica estão inseridas na lista de ensaios realizados para verificar as características físico-químicas das nanopartículas, sendo empregada para auxiliar em análises que demonstrem as possíveis interações intermoleculares e também amorfização do fármaco, causada pela nanoencapsulação do ativo em questão. As observações para tal fim são realizadas por meio de análises de deslocamentos, redução significativa ou desaparecimento de pico na curva de DSC, quando comparados aos perfis dos compostos individualmente (FORD e MANN, 2012; CALVO et al., 1996).

### 2.3.6. Espectroscopia da Região do Infravermelho (IV)

A radiação infravermelha está compreendida no espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas, sendo que a porção mais útil para análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas, está situada entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . A espectroscopia de absorção na região do IV permite a identificação dos grupos funcionais de compostos, a técnica faz com que átomos e grupos de átomos destes compostos, tais como -CH, -NH e -OH vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalente que os ligam. Os espectros de infravermelho são representados de modo que a porcentagem de transmitância aparece como uma função do número de onda, que é o inverso do comprimento de onda (GULLORY, 1999; REICH, 2005).

Para nanopartículas a metodologia do IV permite realizar a caracterização de polímeros e fármaco, através da detecção dos grupos funcionais, e ainda auxilia na identificação de possíveis interações moleculares entre fármaco e polímero, pela comparação de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas no espectro característico da amostra (LOPES e FASCIO, 2004).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

O trabalho teve como objetivo o desenvolvimento das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$ , além da caracterização e a avaliação da atividade antioxidante e citotóxica.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por CLAE/PDA para análise quantitativa do  $(\text{PhSe})_2$  em nanopartículas de PLA, assim como no meio de dissolução utilizado no ensaio de liberação *in vitro*;
- Desenvolvimento das nanopartículas poliméricas contendo  $(\text{PhSe})_2$ , utilizando o método de simples emulsificação-evaporação do solvente;
- Determinação da eficiência de encapsulação do  $(\text{PhSe})_2$  nas nanopartículas, por meio do método de CLAE/PDA desenvolvido;
- Caracterização dos sistemas obtidos quanto aos seus aspectos físico-químicos: diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, interação entre fármaco e polímero (Espectroscopia na Região do Infravermelho, Difração de Raios X, Calorimetria Exploratória Diferencial, Termogravimetria) e morfologia das partículas (Microscopia Eletrônica de Varredura);
- Análise da estabilidade das nanopartículas liofilizadas e em suspensão, frente a diferentes temperaturas de armazenamento;
- Determinação do perfil de liberação *in vitro* e da cinética de liberação do  $(\text{PhSe})_2$  a partir das nanopartículas de PLA;
- Estudo da atividade antioxidante *in vitro* oriundo do fármaco nanoencapsulado, pelo método de inativação do HOCl;
- Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  sobre hemácias;
- Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  sobre células tumorais B16-F10 e HEp-2.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Substâncias e Reagentes

#### 4.1.1. Fármaco

- Disseleneto de Difenila ( $\geq 90\%$ , Sigma - Aldrich Chemistry);

#### 4.1.2. Validação do método analítico

- Água ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18,2 M $\Omega$ /cm);
- Ácido acético 99,9% (Vetec- Química fina) (J.T. Baker);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker);

#### 4.1.3. Produção das nanopartículas

- Poli (álcool vinílico) – PVA (Sigma Aldrich USA);
- Diclorometano (Fmaia);
- Poli (L-ácido láctico) - PLA (Sigma Aldrich USA) (85,000 – 160,000 Da);
- D(+) Sacarose P.A. (Vetec Química Fina);

#### 4.1.4. Avaliação da atividade antioxidante

- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina – TMB (Sigma Aldrich USA);
- Dimetilformamida 99,8% (Dinâmica –Química Contemporânea);
- Iodeto de potássio (Vetec- Química fina);
- Ácido acético 99,9% (Vetec- Química fina);
- NaOH (Biotec®);
- NaOCl (comercial);

#### 4.1.5. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas

- Álcool isopropílico (Fmaia, Brasil);
- Azul de Trypan (Sigma-Aldrich);

- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazóliodrich);
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich);
- Etanol 95% (Fmaia);
- Glicose (Sigma-Aldrich);
- Meio de cultura Iscov's modificado de Dulbecco (Sigma-Aldrich);
- Penicilina (Sigma-Aldrich);
- Soro fetal bovino (Gibco);
- Tripsina (Gibco, EUA);

#### 4.1.6. Outros reagentes e solventes

- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec®);
- Fosfato de potássio dibásico P.A. (Biotec®);
- Tween 80 (CRQ- Cromato produtos químicos);

#### 4.2. Equipamentos e Acessórios

- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) – Waters® Alliance acoplado à um detector de Arranjo de Fotodiodo (PDA) e coluna fase reversa C18 (125mm X 4mm) de tamanho de partícula 5 µm – Xterra Waters®;
- Aparelho de Infravermelho Nicolet IR200 FT-IR (Thermo Scientific, EUA);
- Autoclave vertical AV Plus – Phoenix;
- Balança analítica M214A – Tecnal®;
- Bomba a vácuo – Tecnal - Mod. TE 058;
- Calorímetro - TA Instruments® - Mod. SDT Q600;
- Capela de fluxo laminar vertical – Veco;
- Capela para exaustão de gases – Lucadema;
- Desruptor de células ultrasônico – Unique;
- Difratômetro de Raios X Bruker – Mod. D2 PHASER;
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz (Light Scattering) - Brookhaven 90 Plus;
- Equipamento para análise do potencial zeta – ZetaSizer ZS, Malvern;
- Estufa de CO<sub>2</sub> - Quimis®;

- Evaporador rotatório Tecnal® – Mod. TE 120;
- Incubadora de Bancada com Agitação Orbital Quimis – Q816M22;
- Leitor de microplacas Spectra Max 190 – Molecular Devices;
- Liofilizador – Terroni;
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 µm e PTFE 0,45 µm) – Millipore;
- Microscópio de varredura eletrônico com emissão de campo (MEV-FEG) - MIRA3 LM, Tescan Orsay Holding, Czech Republic;
- Microscópio invertido - Bel Photonics;
- Osmose reversa laboratorial – Vexer Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA;
- Pipetas monocanal – Labmate;
- Sistema de ultrapurificação de água – MilliQ Gradiente Millipore®;
- Ultra centrífuga refrigerada Hermle - Z36HK1;

### 4.3. Metodologia

#### 4.3.1. Desenho experimental

O projeto teve início pelo desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodo (DAD), com o intuito de se obter uma ferramenta confiável e reprodutível para o processo de caracterização das nanopartículas. Linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados.

As Nps de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub> foram obtidas pela técnica de emulsificação evaporação do solvente e posteriormente caracterizadas por estudos de diâmetro médio e índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, espectroscopia de infravermelho, difração de Raios X, potencial zeta, análise térmica e microscópica eletrônica de varredura.

Em seguida a estabilidade do sistema obtido foi avaliada, bem como o perfil de liberação do (PhSe)<sub>2</sub>. O potencial farmacológico das Nps foi analisado *in vitro* por meio da atividade antioxidante (HOCl), atividade hemolítica e citotoxicidade sobre as células B16-F10 e HEP-2.

#### 4.3.2. Desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação do (PhSe)<sub>2</sub> presente nas nanopartículas

Com o objetivo de padronizar um método de quantificação do (PhSe)<sub>2</sub> presente no sobrenadante obtido através da ultracentrifugação da dispersão de nanopartículas e no meio receptor utilizado no ensaio de liberação *in vitro*, foi desenvolvida uma metodologia analítica pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – Waters® Alliance acoplado a um detector de arranjo de diodo(DAD) e coluna de fase reversa C18 (125 mm X 4mm) de tamanho de partícula 5 µm – Lichrospher®.

Primeiramente, foram definidos os parâmetros cromatográficos como: composição e fluxo da fase móvel, comprimento de onda e o tipo de eluição. Os padrões utilizados foram preparados em metanol a partir de uma solução padrão de (PhSe)<sub>2</sub> na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. O método foi validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) segundo as normas da *International Conference on Harmonization*(ICH, 2005) e da resolução R.E. 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

O LD e LQ foram estabelecidos utilizando os valores da inclinação da curva (*b*) e o desvio-padrão do intercepto com eixo y( $\sigma$ ), de acordo com as seguintes equações, conforme recomenda o ICH e a ANVISA (ANVISA, 2003; ICH, 2005):

$$LD = \sigma/b \times 3,3 \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \sigma/b \times 10 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:  $\sigma$  = desvio padrão médio do intercepto y e b = inclinação da curva analítica.

##### 4.3.2.1. Adequação do sistema cromatográfico desenvolvido

A adequabilidade do sistema foi avaliada por análise de seis replicatas dos padrões (50 µg.mL<sup>-1</sup>). Os parâmetros de adequação do sistema foram estudados para verificar o desempenho do mesmo. Fatores tais como o número de pratos teóricos e o fator de cauda foram levados em consideração.

### 4.3.3. Obtenção das Nanopartículas

A técnica utilizada para a obtenção das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2(\text{NP}'\text{s}-(\text{PhSe})_2)$  foi a emulsificação-evaporação do solvente, pelo método de emulsão simples óleo em água (O/A) (VANDERHOFF, EL ASSER e UGELSTAD, 1979; REIS, NEUFELD e VEIGA, 2006).

A fase orgânica foi composta por 50 mg de PLA solubilizados em 1 mL de diclorometano, e 10 mg de  $(\text{PhSe})_2$  também solubilizados em 1 mL de DCM, constituindo a fase orgânica da emulsão, que foi vertida em fase aquosa composta por 10 mL de PVA 1% sob sonicação à temperatura ambiente durante 5 minutos à 50 Hz, obtendo-se uma emulsão O/A. O solvente orgânico foi removido com o auxílio do evaporador rotatório, acoplado a bomba a vácuo, à pressão negativa, por 15 min à 37°C. As partículas foram então recuperadas por 2 processos de ultracentrifugação (14000 rpm, 30 min e 20 min, 4°C) e lavadas com água para remover o tensoativo. As nanopartículas vazias (sem  $(\text{PhSe})_2$ ) foram produzidas da mesma forma, com exceção da adição de  $(\text{PhSe})_2$ .

O sobrenadante obtido foi reservado para posterior análise por CLAE, e as nanopartículas foram dispersas no crioprotetor sacarose a 5 % (m/v, aproximadamente 200  $\mu\text{L}$ ). A nanosuspensão resultante foi subsequentemente resfriada até -18°C e liofilizada para posteriormente realizar os ensaios. Somente as nanopartículas utilizadas para estudo de estabilidade permaneceram em suspensão aquosa.

### 4.3.4. Caracterização Físico-Química das Nanopartículas

#### 4.3.4.1. Determinação do Diâmetro Médio e Índice de Polidispersão

A espectroscopia de correlação de fótons ou também conhecida como Espalhamento de Luz Dinâmico foi a técnica utilizada para a determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão (IP) das Nps. Foram preparadas diluições das suspensões das nanopartículas em água purificada (1:100) e acondicionadas em uma cubeta com tampa. As análises foram realizadas com ângulo de espalhamento de 90°, à temperatura ambiente e comprimento de onda do laser de 660 nm. Todos os lotes foram analisados em triplicata. Os resultados do diâmetro médio e do índice de polidispersão foram expressos como média e desvio padrão, com  $n = 10$  amostras.

#### 4.3.4.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação (EE) foi realizada pelo método indireto, o qual quantifica quanto de  $(\text{PhSe})_2$  ficou livre no sobrenadante resultante do processo de ultracentrifugação/lavagem, pelo método validado por CLAE. Uma alíquota do sobrenadante contendo o fármaco livre, foi diluída em metanol (1:10), filtrada em membrana de poro 0,22  $\mu\text{m}$  e injetada no sistema cromatográfico. As análises foram realizadas em triplicata. Através deste método quantificou-se a concentração de  $(\text{PhSe})_2$  não incorporada às nanopartículas. Na sequência, a EE% foi determinada através da equação 3:

$$\text{EE\%} = (\text{PhSe})_{2\text{inicial}} - (\text{PhSe})_{2\text{quantificado}} / (\text{PhSe})_{2\text{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Os resultados da EE% foram expressos como média e desvio padrão, considerando  $n = 10$  amostras.

#### 4.3.4.3. Potencial Zeta

Uma alíquota da suspensão das nanopartículas foi diluída em KCl 1mM (1:100) e acondicionada em célula eletroforética, sendo então o potencial zeta determinado por meio do aparelho ZetaSizer. As análises foram realizadas a 25 °C em ângulo de 90°, onde se estabeleceu um potencial de  $\pm 150$  mV. Os valores determinados de potencial zeta foram expressos como média e desvio padrão. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.3.4.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (IV)

Para esta caracterização espectroscópica, as amostras foram compactadas com brometo de potássio (KBr), e por meio da compressão em prensa hidráulica foram obtidas pastilhas, as quais foram submetidas à análise no espectrofotômetro no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  foram analisados e comparados frente aos espectros obtidos do polímero, do fármaco e das nanopartículas vazias (sem o  $(\text{PhSe})_2$ ).

#### 4.3.4.5. Difração de Raios X (DRX)

Informações sobre a cristalinidade das amostras foram adquiridas através de um difratômetro de Raios X, que utiliza radiação de  $K\alpha$  do Cu,  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , com corrente de 10 mA e tensão de 30 kV à temperatura ambiente. As amostras foram acondicionadas em um suporte de vidro e digitalizadas a partir de 5 a  $60^\circ$  em um ângulo de  $2\theta$ . Foram realizadas análises de amostra do  $(\text{PhSe})_2$  livre, do polímero PLA e da nanopartícula com e sem o  $(\text{PhSe})_2$ .

#### 4.3.4.6. Análise Térmica

Para análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) foram preparadas amostras do  $(\text{PhSe})_2$  livre e das nanopartículas com e sem o  $(\text{PhSe})_2$ . As amostras foram pesadas em cadinho de alumínio (10 mg), seladas e submetidas a aquecimento sob atmosfera de nitrogênio, com variação de 30 a  $450^\circ\text{C}$ , em uma razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e vazão de gás de arraste de  $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A célula de DSC foi previamente calibrada no eixo de temperatura utilizando padrões de zinco, oxalato de cálcio e safira.

#### 4.3.4.7. Microscopia de Varredura Eletrônica com emissão de Campo (MEV-FEG)

A caracterização morfológica das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo utilizando uma tensão de aceleração de 15,0 kV. Para análise, uma alíquota das nanopartículas contendo  $(\text{PhSe})_2$  foi depositada sobre o porta amostra (*stubs*) e levada a estufa para secagem completa. Os filmes obtidos foram recobertos com uma fina camada de ouro por meio de um metalizador (10 mA, 2 min). As micrografias foram obtidas com aumento de 30.000 vezes.

#### 4.3.5. Estudo de Estabilidade

##### 4.3.5.1. Avaliação da Estabilidade do $(\text{PhSe})_2$ frente ao Tampão Fosfato pH 7,4

Para detectar qualquer tipo de degradação, ou perda da estabilidade da droga, é necessário que seja feito o teste de estabilidade. A fim de analisar o comportamento do  $(\text{PhSe})_2$  frente ao tampão fosfato pH 7,4, meio utilizado para futuros ensaios, foi

preparado uma solução de  $(\text{PhSe})_2$  ( $50 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ) em tampão fosfato pH 7,4, a qual foi mantida em agitação constante (150 rpm) e temperatura de  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após 0, 1, 2, 4, 8 e 24 h, as alíquotas foram retiradas, diluídas em metanol (1:5) e analisadas em CLAE pelo método desenvolvido. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

#### 4.3.5.2. Avaliação da Estabilidade das Nanopartículas- $(\text{PhSe})_2$ em suspensão

A avaliação da estabilidade física das nanopartículas poliméricas sob diferentes temperaturas de armazenamento, é muito importante. Para este ensaio as Nps foram ressuspensas em água purificada, imediatamente após o último ciclo de centrifugação, e em seguida aliqotadas e armazenadas à temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), refrigeradas a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  e congeladas a  $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

As amostras foram caracterizadas após o preparo e em intervalos predeterminados durante 7 dias. Nesses tempos, retirou-se uma alíquota da suspensão e foram realizadas análises macroscópicas da formulação, além de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta. O estudo foi realizado em triplicata. As comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA, com pós teste de Tukey para comparação múltipla de médias. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  (Software STATISTICA 7.0).

#### 4.3.5.3. Avaliação da Estabilidade das Nanopartículas- $(\text{PhSe})_2$ liofilizadas

As nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  foram primeiramente congeladas a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas e liofilizadas a  $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  sob pressão de 2 Pa por um período de 24 horas, o crioprotetor usado foi sacarose 5%. O equipamento utilizado na liofilização forneceu boa estabilidade de temperatura no condensador e pressão baixa, cujos requisitos são importantes durante o processo (HATLEY e FRANKS, 1991). Após o procedimento de liofilização, as nanopartículas foram acondicionadas em dessecador à temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), refrigeradas a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  e congeladas a  $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nos tempos predeterminados (1, 2, 3, 4, 7 30, 60 e 90 dias) uma alíquota das nanopartículas foi ressuspensa em água ultrapurificada e examinada quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta, a fim de garantir que esses parâmetros não sofreram alterações durante o procedimento. As análises foram realizadas em triplicata e as comparações estatísticas

foram realizadas pela ANOVA, com pós teste de Tukey de comparação múltipla de médias. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

#### 4.3.6. Estudo de liberação *in vitro*

##### 4.3.6.1. Estudo da Solubilidade

Afim de garantir que não ocorra saturação do meio receptor durante o estudo de liberação, o ensaio deve ser conduzido em condições sink. Para isso, a solubilidade do  $(\text{PhSe})_2$  nos possíveis receptores foi previamente avaliada.

Os experimentos para determinar a solubilidade de fármacos segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) devem ser conduzidos utilizando-se excesso de fármaco em diversos tampões. Portanto, foram preparadas soluções saturadas de  $(\text{PhSe})_2$  em um volume definido (10 mL) de: (a) PBS TWEEN 80 1% pH 7,4; (b) PBS TWEEN 80 5% pH 7,4; (c) PBS TWEEN 80 10% pH 7,4. Essas suspensões foram mantidas sob agitação (150 rpm) à temperatura de  $37 \pm 1$  °C, durante um período prolongado (48 h) para que o equilíbrio pudesse ser atingido. Após esse período, as suspensões foram centrifugadas (15500 rpm, 30 min), filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ) e diluídas em metanol (STAVCHANSKY e PADE 1998; LARA, 2008). A concentração do  $(\text{PhSe})_2$  solúvel no líquido receptor foi determinada por CLAE. Este procedimento foi realizado em triplicata.

##### 4.3.6.2. Perfil de Liberação *in vitro*

O perfil de liberação do  $(\text{PhSe})_2$  a partir das Nps foi determinado através do método de agitação em shaker, com posterior ultracentrifugação (CASA et al., 2015). Amostras contendo 480  $\mu\text{g}$  de  $(\text{PhSe})_2$  encapsulado foram diluídas em 12 mL de solução tampão PBS 50mM, pH=7,4 com tween 80 a 5%. As dispersões de nanopartículas foram incubadas em agitador do tipo shaker a 37 °C, sob agitação constante de 150 rpm. Nos tempos predeterminados (2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 h) as dispersões foram ultracentrifugadas durante 15 min a 15500 rpm, 4 °C. O precipitado foi novamente ressuspenso em tampão e retornado à agitação, enquanto que os sobrenadantes foram coletados e analisados por CLAE. Com os resultados obtidos, foi possível obter a curva do percentual cumulativo de fármaco liberado em função do tempo.

A fim de ganhar a introspecção no mecanismo de liberação das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$ , os dados da liberação foram analisados de acordo com os modelos de ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, Higuchi, e também o expoente  $n$  de liberação segundo o modelo Peppas (RITGER e PEPPAS, 1987), por meio do software MicroMath Scientist®.

#### 4.3.7. Aplicabilidade das Nanopartículas *in vitro*

##### 4.3.7.1. Avaliação da Atividade Antioxidante das Nanopartículas de $(\text{PhSe})_2$ frente ao ácido hipocloroso (HOCl)

O potencial antioxidante do sistema nanoestruturado foi analisado por meio do estudo de inibição do HOCl, que foi preparado a partir de uma solução de hipoclorito de sódio em água pH 12, imediatamente antes da utilização. A concentração de hipoclorito foi determinada espectrofotometricamente a 292 nm antes de sua utilização ( $\epsilon_{292\text{nm}} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (MORRIS, 1996). O revelador, TMB (3,3',5,5' - tetrametilbenzidina), foi solubilizado em dimetilformamida ( $0,014 \text{ mol.L}^{-1}$ ), seguido da adição de iodeto de potássio ( $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

Amostras do  $(\text{PhSe})_2$  livre ou nanoencapsulado e nanopartículas vazias em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foram adicionadas a tampão fosfato (50 mM pH 7,4) e por fim HOCl (50  $\mu\text{M}$ ) obtendo um volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Após 15 min de incubação a 37 °C e 150 rpm foi adicionado à reação 20  $\mu\text{l}$  da solução reveladora (DYPBUKT et al., 2005). Após 5 minutos, a absorbância foi medida a 650 nm em um leitor de microplacas. Uma solução tampão na presença do HOCl foi utilizado como controle, e o flavonoide quercetina foi utilizado como antioxidante padrão (ANTÔNIO, KHALIL e MAINARDES, 2016).

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do HOCl /  $\text{OCl}^-$ , de acordo com a equação 4.

$$\% \text{ de inibição} = (\text{Abs controle} - \text{Abs teste}) / \text{Abs controle} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Este mesmo procedimento foi realizado após 0, 24, 48 e 72 h de incubação das diluições a 37 °C e 150 rpm. Os dados foram analisados com teste  $t$ , e diferenças foram

consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  (Software STATISTICA 7.0).

#### 4.3.7.2. Avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas de $(\text{PhSe})_2$ sobre as hemácias

Para avaliação de citotoxicidade frente as hemácias humanas, desenvolveu-se um protocolo experimental que foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual do Centro-Oeste, sob registro nº 1.174.406/2015 (Anexo A).

Primeiramente, 10 mL de sangue foram coletados de três indivíduos voluntários saudáveis adultos, o sangue coletado foi adicionado em tubo contendo 10  $\mu\text{L}$  de heparina sódica e centrifugado por 10 min a 2500 rpm, o plasma e a camada de leucócitos foram então descartados. As hemácias foram lavadas, por três vezes, com solução de tampão PBS 10 mM, pH 7,4. Ao final da terceira lavagem foram ressuspensas em PBS 10 mM, pH 7,4 acrescidos de glicose ( $1,08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e os antibióticos penicilina ( $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e estreptomicina ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), afim de acertar o volume globular para 2% (CRUZ SILVA et al., 2000).

Para o estudo, foram utilizadas diferentes concentrações do  $(\text{PhSe})_2$  livre e nanoencapsulado (25, 50 e  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) incubadas com a suspensão de hemácias a 2%, por 4, 8, 24, 48 e 72 h, a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , sob constante homogeneização. Foram realizados controles com água destilada, PBS 10 mM (pH 7,4), etanol e nanopartículas de PLA vazias. Após os tempos predeterminados, as soluções foram centrifugadas a 2500 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos.

A citotoxicidade foi avaliada pela quantidade de hemoglobina liberada, que foi quantificada no sobrenadante por meio da medida da absorbância em 540 nm, no leitor de microplacas (CRUZ SILVA et al., 2001). A análise foi efetuada em triplicata e os dados foram exibidos em percentual de hemólise, o qual foi calculado de acordo com a equação 5:

$$\% \text{ Hemólise} = (\text{Abs amostra} / \text{Abscontrole positivo}) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde, o controle positivo no estudo correspondeu à amostra incubada com água destilada, o qual apresentou 100% de hemólise.

Comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA de um fator, com teste Tukey de comparação múltipla de médias, com 95% de confiança. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  (Software STATISTICA 7.0).

#### 4.3.7.3. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo $(\text{PhSe})_2$ sobre linhagem tumoral B16-F10 e HEP-2

A toxicidade celular foi avaliada pelo método de MTT, descrito por Denizot e Lang (1986) com algumas modificações. Para os ensaios foram utilizadas células da linhagem B16-F10 e HEP-2, melanoma murinho e carcinoma laríngeo humano, respectivamente. Essas células foram mantidas em garrafas de poliestireno em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's, suplementado com 10% de soro fetal bovino,  $100 \text{ U.mL}^{-1}$  de penicilina e  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida, contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Repiques semanais foram realizados até atingir a densidade de confluência, sempre mantendo-se uma concentração de  $2 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$ .

A viabilidade celular foi analisada pelo método de exclusão do Azul de Tripán 0,4% (HARRISON e RAE, 1997), com contagem em câmara de Neubauer. O azul de tripan é um corante que é incorporado seletivamente pelas células com integridade de membrana danificada, ou seja as células mortas. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da equação 6:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{n}^\circ \text{ células não coradas} / \text{n}^\circ \text{ total de células}) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Para o ensaio citotóxico, foram semeadas  $1 \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$  em placas de 96 poços, e incubadas por 24 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , para adesão celular. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e adicionado um novo meio contendo as diluições seriadas da solução do fármaco livre e das dispersões de nanopartículas. As concentrações finais utilizadas de  $(\text{PhSe})_2$  livre e nanoencapsulado foram de 2,5; 5; 15; 30;  $60 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  para linhagem B16-F10 e 30; 45; 60; 75;  $90 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  para linhagem HEP-2. Os controles utilizados foram: meio Iscove's, metanol e nanopartículas de PLA vazias. Os tempos de análise foram 24, 48 e 72 h. Após os tempos de incubação, o meio foi retirado e adicionado  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de MTT ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio), e incubado por mais 3 h. A técnica empregada do MTT baseia-se na sua redução, sendo

que o MTT é um corante amarelo que ao ser reduzido por células com integridade mitocondrial se transforma em um composto azul, a formazana, a qual pode ser determinada espectroscopicamente após solubilização em etanol absoluto (DENIZOT e LANG, 1986). Passado as três horas de incubação, o MTT foi retirado e adicionado 50 µl de etanol, para diluição dos cristais e 150 µl de uma mistura de PBS pH 7,4 com álcool isopropílico na proporção 1:2. A absorbância proveniente foi lida em leitor de placas nos comprimentos de onda de 570 nm e 630 nm.

A leitura dos poços foi realizada em dois comprimentos de onda, para posterior subtração para obtenção do valor real, visto que a formazana possui absorção em 570 nm e as células viáveis presentes nos poços causam uma turvação observada em 630 nm. A viabilidade celular foi obtida usando a equação 7 (MENEZES et al., 2007):

Viabilidade (%):  $(\text{Absamostra} / \text{Abscontrole}) \times 100$

Equação 7

Comparações estatísticas foram realizadas pela ANOVA de um fator, com 95% de confiança, com teste de Tukey de comparação múltipla de médias. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  (Software STATISTICA 7.0).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Validação do método analítico para quantificação do (PhSe)<sub>2</sub> nas nanopartículas

#### 5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico

Testes iniciais foram realizados utilizando-se como fase móvel misturas de metanol e água, ambos acidificados com 0,5% de ácido acético, com base no método existente para a quantificação de (PhSe)<sub>2</sub> (PRIGOL et al., 2012). Várias proporções foram testadas, porém apresentaram deformações no perfil cromatográfico como picos largos e irregulares. Isso ocorre devido a menor interação do analito com a fase estacionária devido sua forma estrutural. Assim, quando mantida somente a água acidificada 0,5% e adicionado metanol puro na fase móvel favorece que o analito fique retido na fase estacionária, observou-se melhora na apresentação dos picos. Inicialmente a detecção foi realizada em quatro comprimentos de onda, 230, 240, 243 e 245nm, porém foi observado que no comprimento de onda de 240 nm os picos obtidos eram mais simétricos e mais intensos, portanto este foi escolhido para prosseguir com as posteriores análises.

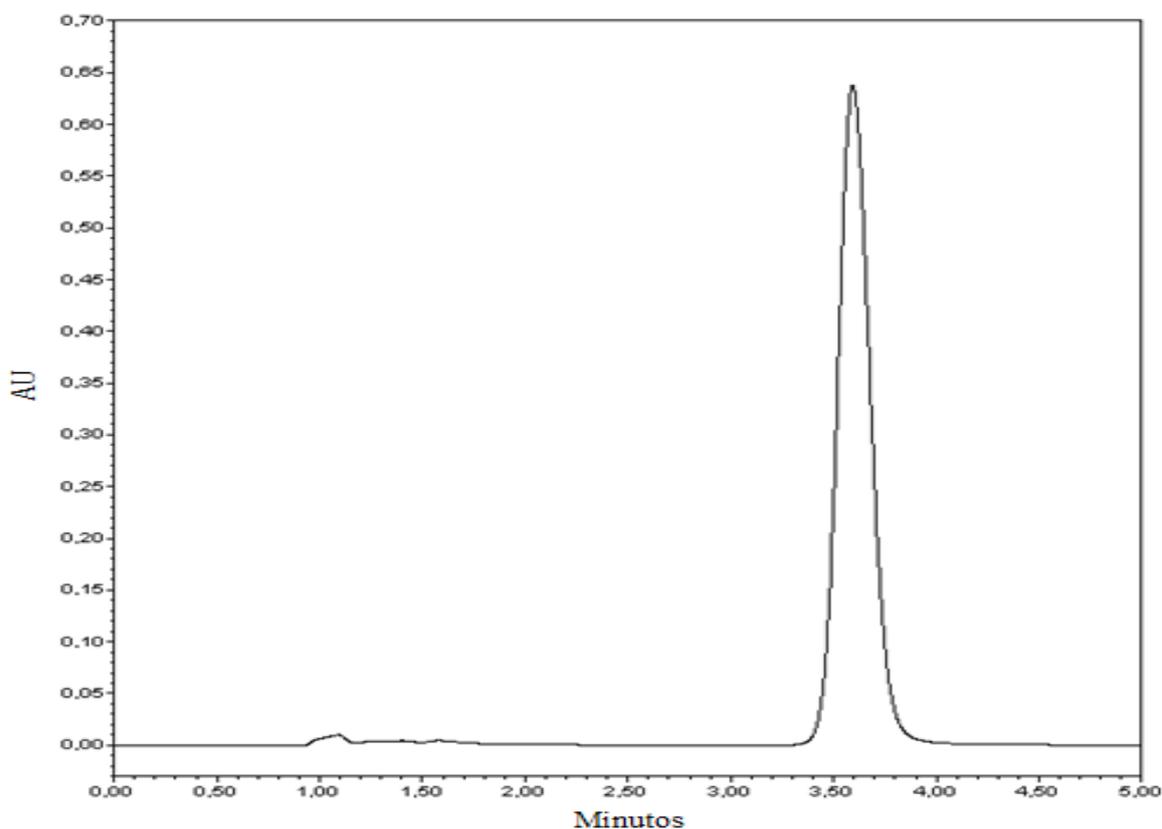
Dentre as diversas variações tanto nas proporções e na vazão de fase móvel quanto no volume de injeção, o melhor pico, em termos de largura e simetria, foi obtido nas seguintes condições (Tabela 1):

**Tabela 1.** Condições cromatográficas utilizadas para validação do método analítico em CLAE.

| <b>Parâmetros</b>     |  |
|-----------------------|--|
| Fase móvel            | Metanol: água acidificada 0,5% (90:10, v/v)                              |
| Vazão da fase móvel   | 1,0 mL.min <sup>-1</sup>   |
| Tipo de eluição       | Isocrática   |
| Detector              | DAD  |
| Coluna                | Fase reversa C18 (125mm x 4mm) tamanho de partícula 5µm – Xterra Waters. |
| Temperatura da Coluna | 25° C  |
| Comprimento de onda   | 240 nm   |
| Volume de injeção     | 40 µL  |
| Tempo de retenção     | 3,7 minutos  |

A fase móvel estipulada mostrou-se eficaz na quantificação de  $(\text{PhSe})_2$ , uma vez que resultou em picos simétricos e praticamente sem ruídos de base, conforme demonstra a Figura 6, além de apresentar um tempo de corrida cromatográfica reduzido (5 min), o que permite a análise de um grande número de amostras num curto período de tempo, bem como reduzir os custos de solvente e de danos para o ambiente.

**Figura 6.** Cromatograma representativo (absorbância (AU) em função do tempo (min)) do  $(\text{PhSe})_2$  em metanol. Fase móvel metanol: água acidificada (90:10), fluxo de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detecção no comprimento de onda de 240 nm, temperatura da coluna de  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , volume de injeção de  $40\text{ }\mu\text{L}$ .



#### 5.1.2. Adequabilidade do sistema (*System suitability*)

A adequação do sistema foi avaliada através da análise da simetria do pico e do número de pratos teóricos da coluna durante a análise da solução de  $(\text{PhSe})_2$  em seis repetições. O método validado produziu um número de pratos teóricos superior a 2000, e um fator de cauda inferior a 2. Os resultados de adequação do sistema estão resumidos na Tabela 2, e demonstram que os parâmetros analisados estão de acordo com os critérios de aceitação recomendados na literatura (SUTARIYA, WEHRUNG e GELDENHUYS, 2012; HUSSEN, SHENOY, KRISHNA, 2013).

**Tabela 2.** Sistema de adequação do método de CLAE.

| <b>Parâmetros Cromatográficos</b> | <b>Resultados*</b> | <b>Critério Aceitação</b> |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Fator de cauda (T)                | 1,02 ± 0,051       | T < 2                     |
| Números de pratos teóricos (N)    | 2216,72 ± 60,05    | N > 2000                  |

\*Apresentado valor como média ± desvio padrão (n = 6)

### 5.1.3. Validação do método

#### 5.1.3.1. Seletividade

Alguns constituintes da formulação, ou de outros ensaios que necessitem posterior quantificação do (PhSe)<sub>2</sub>, podem ser interferentes no momento da leitura, uma vez que podem surgir picos indesejáveis no mesmo tempo de retenção do (PhSe)<sub>2</sub>. Para eliminar qualquer dúvida sobre possíveis interferências, foi realizada uma análise da seletividade do método analítico desenvolvido.

Um provável interferente na quantificação indireta de (PhSe)<sub>2</sub> a partir das nanopartículas é o tensoativo PVA, uma vez que este permanece no sobrenadante após a etapa de centrifugação no desenvolvimento das partículas. Para avaliar esse efeito, nanopartículas vazias (nanopartículas não carregadas com o (PhSe)<sub>2</sub>) foram preparadas como descrito na seção 4.3.3 e o sobrenadante obtido após centrifugação foi diluído em metanol, e analisado pelo método de CLAE descrito.

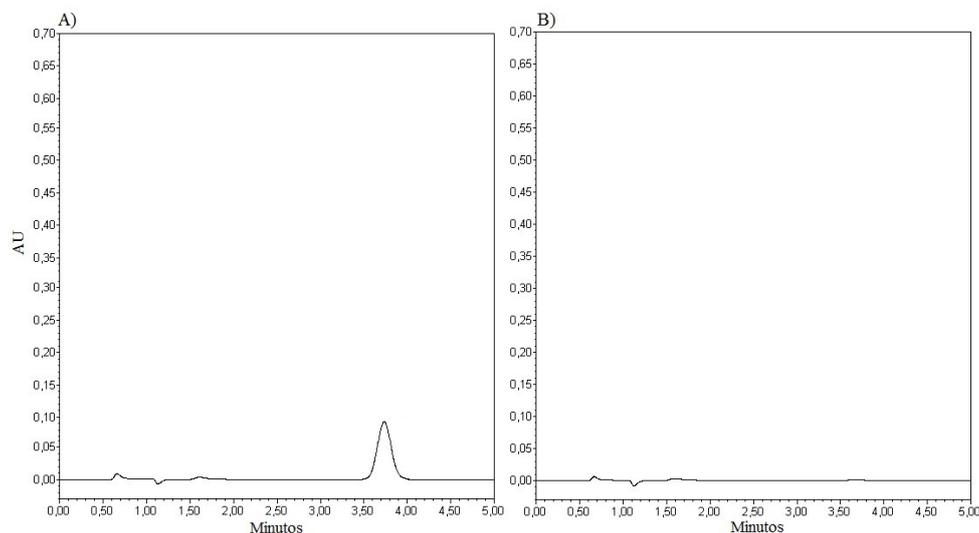
Na Figura 7(A) o cromatograma do sobrenadante das nanopartículas contendo (PhSe)<sub>2</sub>, mostrou o pico referente ao (PhSe)<sub>2</sub> em aproximadamente 3,7 min, o que está de acordo com o obtido para o padrão (Figura 6). Na Figura 7(B) não foram encontrados picos neste mesmo tempo de retenção no cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas vazias, o que indica que não houve interferência na quantificação do (PhSe)<sub>2</sub> a partir dos constituintes da formulação.

Outro possível interferente na quantificação do (PhSe)<sub>2</sub>, é o tampão fosfato de sódio (PBS, 50 mM, pH 7,4) tween 80 a 5%, utilizado nos ensaios de liberação *in vitro*. Na tentativa de avaliar essa possível interferência, uma amostra contendo apenas o PBS com tween 80 foi analisada, afim de visualizar o cromatograma referente ao tampão de forma isolada. E em seguida foi realizada a leitura do tampão contendo (PhSe)<sub>2</sub>.

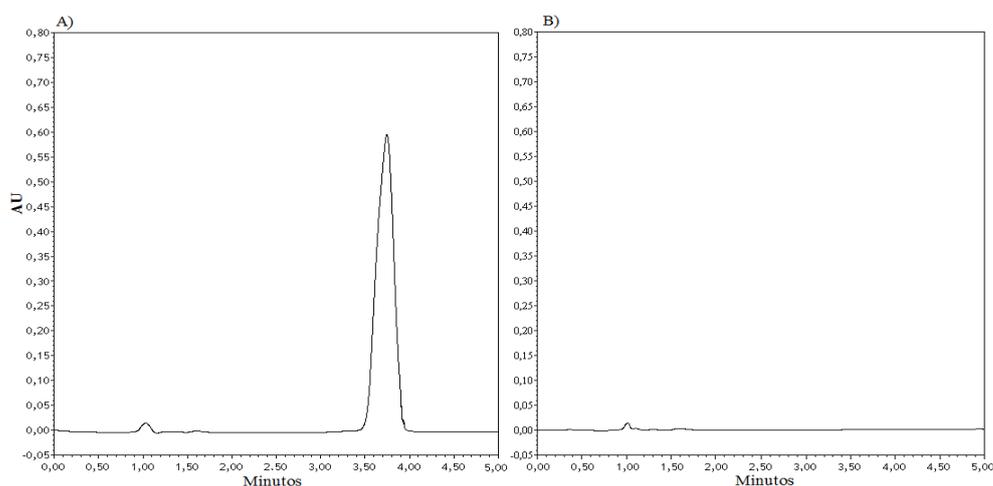
No cromatograma resultante do tampão contendo (PhSe)<sub>2</sub>, Figura 8 (A), pode-se observar o pico referente ao (PhSe)<sub>2</sub> em aproximadamente 3,7 min. Enquanto que no

cromatograma do tampão sem  $(\text{PhSe})_2$ , nenhum pico pode ser observado na Figura 8 (B). Dessa maneira pode-se afirmar que ambos os testes garantiram a seletividade do método.

**Figura 7.** Comparação dos cromatogramas: em A observa-se amostras do  $(\text{PhSe})_2$  proveniente do sobrenadante de nanopartículas. Em B, análise do cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas vazias. Fase móvel: Metanol:água acidificada (90:10, v/v), 240 nm.



**Figura 8.** Comparação dos cromatogramas de amostras de  $(\text{PhSe})_2$  frente ao potencial interferente PBS-5% tween 80, meio receptor no teste de liberação *in vitro*. Em (A) análise do cromatograma do tampão contendo  $(\text{PhSe})_2$ , diluído em metanol. Em (B), observa-se o cromatograma de uma amostra de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH=7,4, contendo 5% de tween 80, diluída em metanol. Fase móvel: Metanol:água acidificada (90:10, v/v), 240 nm.



### 5.1.3.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada em sete níveis de concentração (10 a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como pode ser observado na Figura 9, por meio da técnica de regressão linear e do cálculo

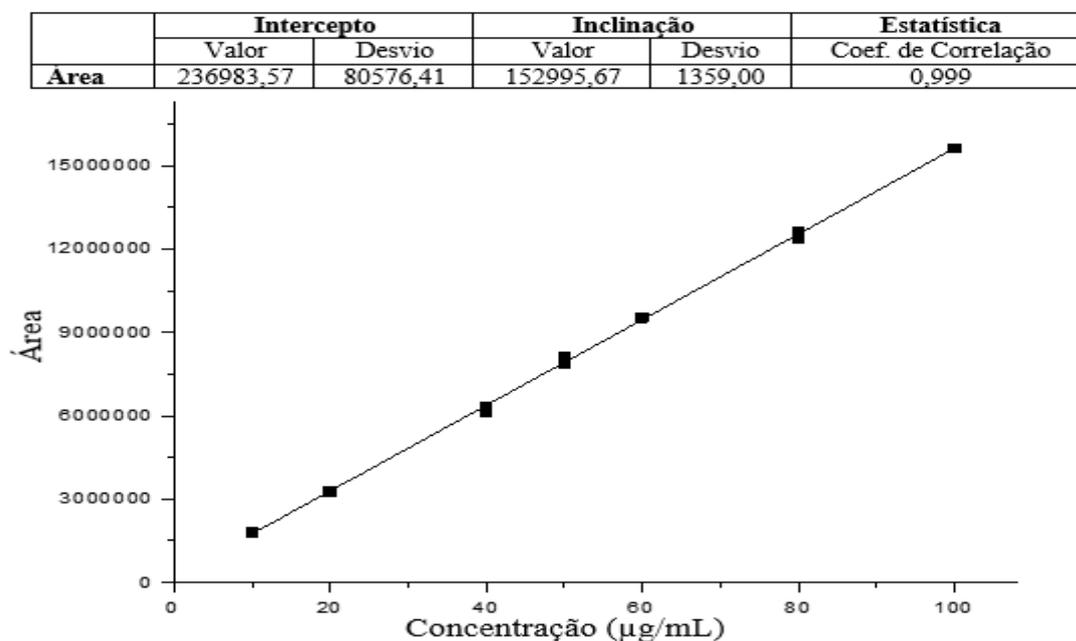
do coeficiente de correlação. Esta análise gerou um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,999 e a equação dada por:

$$Y = 1,53 \times 10^5 C + 2,37 \times 10^5 \quad \text{Equação 8}$$

Onde  $Y$  é a área do pico e  $C$  é a concentração da solução padrão em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O valor de  $r$  próximo a 1 está de acordo com a ANVISA (2003), que determina que o valor de  $r$  seja superior a 0,99, e indica linearidade no intervalo proposto e baixa dispersão entre os pontos. A validade do teste foi confirmada por uma análise de variância, que mostrou que a regressão linear foi significativa e o desvio da linearidade não foi significativo ( $p < 0,01$ ). Dessa maneira a linearidade da curva garante a qualidade do método para análise do  $(\text{PhSe})_2$  assegurando uma confiança no uso da equação da reta obtida.

**Figura 9.** Curva analítica do  $(\text{PhSe})_2$ , fase móvel metanol:água acidificada (90:10, v/v) em 240 nm. O *slope* da curva ( $b$ ), o desvio padrão do intercepto em  $y$  ( $\sigma$ ) e o coeficiente de correlação ( $r$ ) são relatados ( $n = 3$ ).



### 5.1.3.3. Precisão

A precisão é uma medida do erro relativo do método, expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR), em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Três soluções padrões ( $10$ ,  $50$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram preparadas e analisadas em um dia ou três

dias diferentes, com a finalidade de avaliar a variação intra-dia e inter-dia, respectivamente. Os desvios padrão das respostas foram calculados em cada caso, e estão mostrados na Tabela 3, os quais confirmaram que a precisão foi obtida, uma vez que o valor máximo de DPR foi de 3,52%. É preconizado que o DPR para uma boa precisão do método seja, inferior a 5% (ICH, 2005). Dessa forma, as análises puderam comprovar que o método analítico para o  $(\text{PhSe})_2$  foi preciso, tanto na precisão intra-corridas como na precisão inter-corridas.

**Tabela 3.** Ensaio de precisão para a análise do  $(\text{PhSe})_2$ .

| <b>Solução Padrão (<math>\mu\text{g.mL}</math>)</b> | <b>Concentração Quantificada <math>\pm</math> DP<br/>(<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b> | <b>DPR (%)</b> |
|---|---|----------------|
| <b>Repetibilidade (n=5)</b>                         |   |                |
| 10  | 9,86 $\pm$ 0,28   | 2,81           |
| 50  | 49,91 $\pm$ 1,75  | 3,52           |
| 100   | 101,40 $\pm$ 1,55   | 3,50           |
| <b>Solução Padrão (<math>\mu\text{g.mL}</math>)</b> | <b>Concentração Quantificada <math>\pm</math> DP<br/>(<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b> | <b>DPR (%)</b> |
| <b>Precisão Intermediária (n=3)</b>                 |   |                |
| <b>Dia 1</b>  |   |                |
| 10  | 10,38 $\pm$ 0,02  | 0,22           |
| 50  | 53,47 $\pm$ 0,60  | 1,12           |
| 100   | 101,60 $\pm$ 0,56   | 0,56           |
| <b>Dia 2</b>  |   |                |
| 10  | 10,35 $\pm$ 0,16  | 1,54           |
| 50  | 51,60 $\pm$ 1,05  | 2,04           |
| 100   | 102,90 $\pm$ 1,49   | 1,45           |
| <b>Dia 3</b>  |   |                |
| 10  | 9,89 $\pm$ 0,28   | 1,24           |
| 50  | 50,42 $\pm$ 0,79  | 1,57           |
| 100   | 98,86 $\pm$ 0,24  | 2,89           |

#### 5.1.3.4. Exatidão

A exatidão foi verificada como porcentagem de recuperação e DPR da concentração média do analito em três diferentes concentrações. Soluções de 10, 50 e 100

$\mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas e analisadas como descreve o método proposto. Os resultados detalhados estão apresentados na Tabela 4, e mostram que o método desenvolvido foi exato, uma vez que a porcentagem de recuperação ficou entre 98,86 e 100,85% e o desvio padrão relativo máximo foi de 0,79%. Esses dados demonstram a concordância entre os valores experimentais e os teóricos (ICH, 2005).

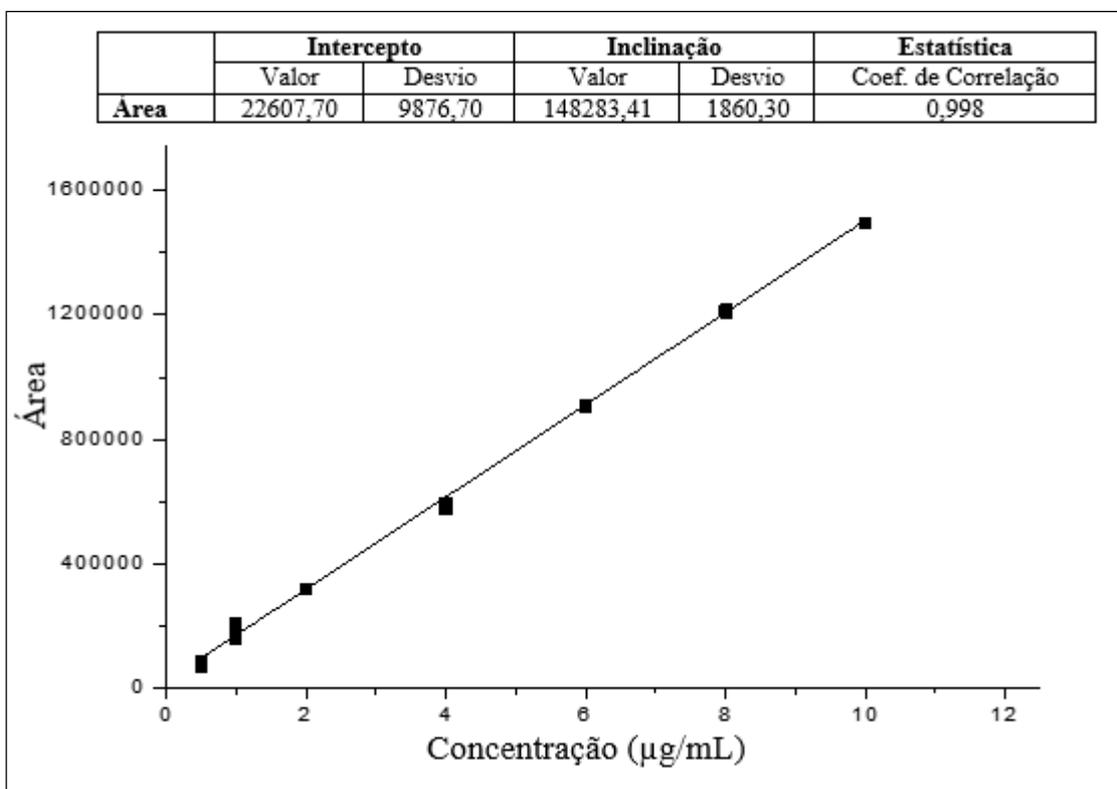
**Tabela 4.** Porcentagem de recuperação e DPR obtido a partir da análise de exatidão.

| <b>Solução Padrão (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b> | <b>Recuperação (%)</b> | <b>DPR (%)</b> |
|--|------------------------|----------------|
| 10 (n=3)   | 98,92                  | 0,29           |
| 50 (n=3)   | 100,85                 | 0,79           |
| 100 (n=3)  | 98,86                  | 0,24           |

#### 5.1.3.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LQ representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, já o LD é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada (ICH, 2005; ANVISA, 2003). Para determinar o LD e o LQ, foram empregadas as equações 1 e 2 (item 4.3.2.), respectivamente, onde foram realizadas utilizando o desvio padrão médio e a inclinação de coeficiente angular (*slope*), obtido a partir da curva de calibração específica, abaixo do intervalo utilizado para avaliar a linearidade, demonstrado na Figura 10 ( $0,5\text{-}10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O método foi linear neste intervalo, pois o valor de  $r$  foi 0,998. Os valores de LD e LQ obtidos foram 0,219 e  $0,666 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores demonstram a sensibilidade do método e confiabilidade para análises de concentrações baixas de analito, como é o caso da quantificação de  $(\text{PhSe})_2$  no sobrenadante das nanopartículas e detecção em ensaios de liberação prolongada.

**Figura 10.** Curva analítica para o LD e LQ (área do pico versus concentração de  $(\text{PhSe})_2$ ). O *slope* da curva (b), o desvio padrão do intercepto em y ( $\sigma$ ) e o coeficiente de correlação (r) são relatados (n = 3).



#### 5.1.3.6. Robustez

A robustez é uma medida da influência de pequenas alterações nos processos/parâmetros de análise sobre a resposta. Algumas alterações no método cromatográfico foram aplicadas para testar a capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. As variações foram: alterações de proporções da fase móvel (91:09 e 89:11) e alteração no fluxo de vazão do aparelho (0,9 e 1,1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). A robustez foi avaliada com base na taxa de recuperação e nos valores de Desvio Padrão Relativo (DPR). Na Tabela 5, pode-se observar que o método mostrou-se robusto no que diz respeito a estas alterações nos parâmetros cromatográficos, já que o DPR máximo obtido foi de 1,98%.

**Tabela 5.** Taxa de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações na fase móvel e fluxo, n=3.

| Modificações no método original | Porcentagens de recuperação $\pm$ DPR |                          |                           |
|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                                 | 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$              | 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ |
| <b>FM (89-11)</b>               | 97,37 $\pm$ 1,88                      | 102,20 $\pm$ 1,54        | 97,23 $\pm$ 1,98          |
| <b>FM (91-09)</b>               | 102,62 $\pm$ 1,81                     | 101,72 $\pm$ 1,16        | 100,92 $\pm$ 1,16         |
| <b>Fluxo 0,9</b>                | 102,51 $\pm$ 1,74                     | 102,33 $\pm$ 1,59        | 101,50 $\pm$ 1,03         |
| <b>Fluxo 1,1</b>                | 102,73 $\pm$ 1,89                     | 99,49 $\pm$ 0,43         | 99,82 $\pm$ 0,13          |

## 5.2. Obtenção de nanopartículas contendo (PhSe)<sub>2</sub>

A técnica de emulsificação/evaporação do solvente, pelo método de emulsão simples óleo em água (O/A) a partir de polímeros pré-formados, foi utilizada para obtenção das nanopartículas contendo o (PhSe)<sub>2</sub>, uma vez que o método é capaz de encapsular tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos. Além disso, a relativa simplicidade de reprodução do método, a indicação para produção de nanopartículas a partir de polímeros biodegradáveis, fácil transposição em larga escala, bem como a possibilidade de controlar alguns parâmetros envolvidos na preparação (velocidade de homogeneização, intensidade da sonicação, volume das fases aquosas ou orgânicas, etc) (RAO e GECKELER, 2011; COUVREUR et al., 2002), fez com que esse método fosse eleito como ideal para o presente trabalho.

O método demonstrou ser eficaz para obtenção de nanopartículas de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub>, pois a porcentagem de encapsulação, assim como o diâmetro médio foram excelentes. As nanopartículas, quando armazenadas em água, apresentaram aspecto leitoso de cor amarelada, e quando liofilizadas apresentaram aspecto macroscópico pulverulento de coloração amarela.

### 5.3. Caracterização Físico-Química das nanopartículas

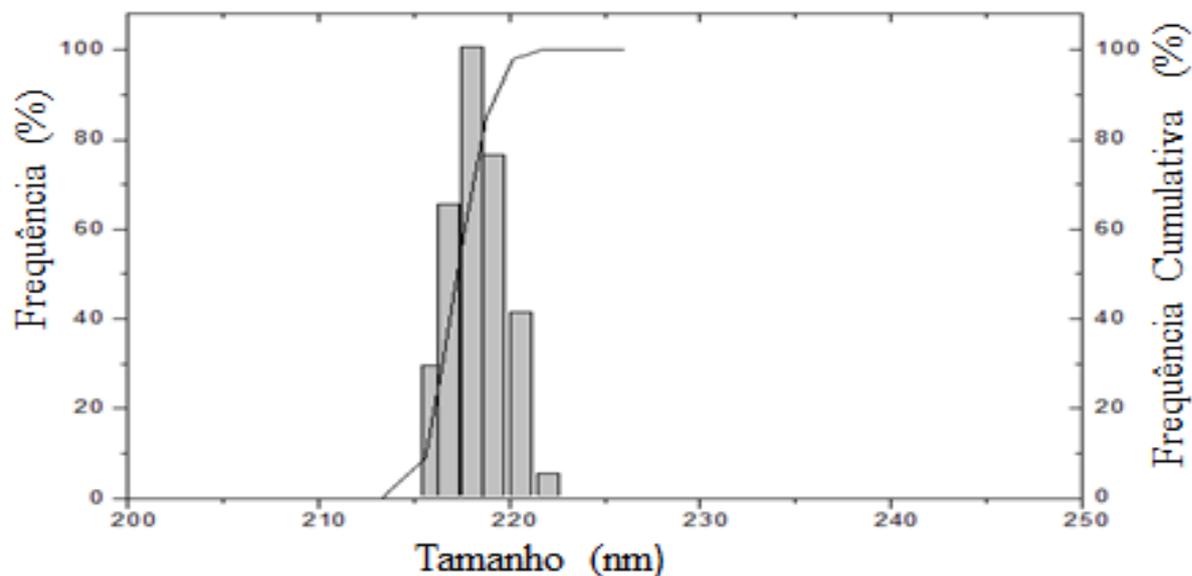
#### 5.3.1. Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão

O tamanho e o índice de polidispersão estão entre as principais formas de caracterização das nanopartículas, além de ser úteis também nos estudos de estabilidade. A técnica de correlação de fótons, também conhecida como Dynamic Light Scattering é amplamente utilizada para essas determinações, por se tratar de uma técnica não invasiva (WU, ZHANG e WATANABE, 2011).

A determinação do diâmetro médio e IP foram realizados conforme descrito no item 4.3.4.1. O diâmetro médio obtido foi de  $210,4 \pm 9,1$  nm e o índice de polidispersão foi de  $0,106 \pm 0,020$ . De maneira geral todos os lotes produzidos apresentaram um perfil monomodal, com um intervalo de distribuição de diâmetro médio reduzido. As nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  mesmo após liofilizadas apresentaram tamanho médio de  $219,3 \pm 6,4$  nm, e o índice de polidispersão de  $0,140 \pm 0,025$ , indicando que o procedimento não alterou esses parâmetros.

Na Figura 11 está apresentado o gráfico de uma amostra representativa das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$ , a qual apresentou um diâmetro médio de 219,1 nm e um índice de polidispersão de 0,095. Essa amostra apresentou um perfil monomodal, onde 100% da distribuição dos diâmetros médios das nanopartículas ficaram no intervalo de 214,6 a 221,7 nm. As nanopartículas vazias apresentaram tamanhos médios e índices de polidispersão de  $212,70 \pm 8,57$  e  $0,110 \pm 0,03$  respectivamente. Analisando-se estatisticamente, essa variação não foi significativa (Teste *t*,  $p > 0,05$ ) quando comparados aos valores encontrados para as nanopartículas carregadas.

**Figura 11.** Distribuição do tamanho de uma amostra representativa das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$ . Diâmetro médio de 219,1 nm e índice de polidispersão de 0,10, perfil monomodal.



Alguns autores citam que as nanopartículas produzidas com a finalidade de carreamento de fármacos devem possuir diâmetros inferiores a 300 nm e apresentar uma distribuição monomodal e um baixo índice de polidispersão (GUPTA, KOMPELLA, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003). Os valores de IP podem variar entre 0 a 1, sendo que, valores próximos a 0 indicam homogeneidade da dispersão e valores maiores ou próximos a 0,5 indicam uma alta heterogeneidade nos diâmetro das partículas (AVADI et al., 2010). Nesse contexto, as nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  foram obtidas com sucesso, pois o diâmetro médio das formulações ficou em aproximadamente 210 nm, com uma distribuição monomodal e um baixo índice de polidispersão. Outros trabalhos utilizando o mesmo método de emulsão simples e o mesmo polímero (PLA) também encontraram diâmetros médios próximos a 200 nm (KARAM, 2015 e LINDNER, 2014).

### 5.3.2. Determinação da eficiência de encapsulação

A porcentagem de eficiência de encapsulação do  $(\text{PhSe})_2$  nas nanopartículas foi determinada de maneira indireta pela leitura do sobrenadante obtido após ultracentrifugação das nanopartículas, valor este que foi subtraído da quantidade de droga inicialmente utilizada na formulação (10 mg). A formulação teve uma média de EE% de  $91,6 \pm 3,2\%$ .

Esse elevado índice de eficiência de encapsulação está em concordância com as características do  $(\text{PhSe})_2$ , pois este composto apresenta alta lipofilicidade, tendo portanto

elevada afinidade pela fase orgânica, que por sua vez constitui a fase interna da emulsão. Esse excelente resultado comprova que o método desenvolvido foi eficiente para associar o fármaco à estrutura polimérica. O resultado obtido foi semelhante a um estudo em que foram produzidas nanocápsulas de PCL contendo (PhSe)<sub>2</sub>, onde a porcentagem de encapsulação obtida foi de 99,97±0,0% (GIORDANI et al., 2014).

### 5.3.3. Potencial Zeta

O potencial zeta é a medida da carga superficial. As partículas de uma suspensão coloidal podem conter grupamentos químicos ou adsorver íons capazes de conferir uma carga de superfície à partícula. A medida dessa carga é fundamental porque permite inferir propriedades diretamente relacionadas com a resposta biológica da substância associada, além de controlar a estabilidade das nanopartículas em suspensões, predizendo estados de dispersão e agregação (SCHAFFAZICK et al., 2003; KLANG e BENITA, 1998; HEURTAULT et al., 2003).

As cargas de potencial zeta podem ser atribuídas aos possíveis compostos adsorvidos as nanopartículas, os tensoativos e polímeros utilizados. De uma forma geral, as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor do potencial zeta é próximo de 30 mV, em módulo, pois nessa situação a repulsão eletrostática tende a evitar possíveis agregações da fase interna, enquanto que potenciais próximos a 0 e 5 mV podem produzir o fenômeno de floculação com maior facilidade (NEVES et al., 2013; KLANG e BENITA, 1998).

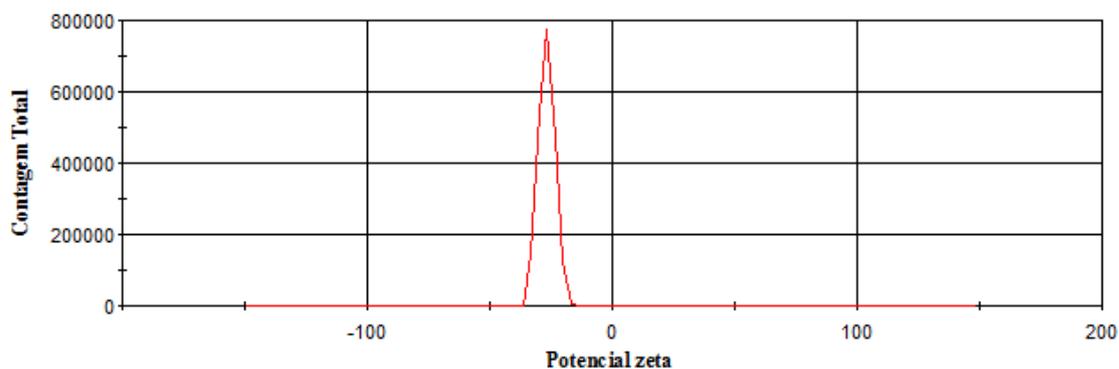
**Tabela 6.** Potencial zeta das nanopartículas de PLA na ausência e presença de (PhSe)<sub>2</sub> e nanopartículas contendo (PhSe)<sub>2</sub> após liofilização n=3, expressos em média ± DP.

| Formulações  | Potencial Zeta (mV)        |
|--|----------------------------|
| Nanopartícula vazia  | -27,24 ± 2,19 <sup>a</sup> |
| Nanopartícula contendo (PhSe) <sub>2</sub>                   | -24,68 ± 1,89 <sup>a</sup> |
| Nanopartícula contendo (PhSe) <sub>2</sub> após liofilização | -23,92 ± 1,05 <sup>a</sup> |

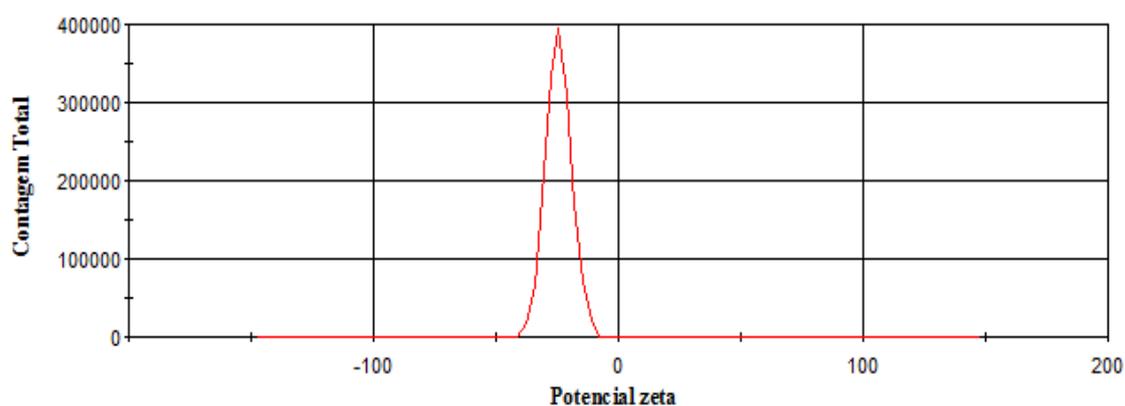
Média das triplicatas ± desvio padrão analítico por coluna. Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA com pós teste Tukey,  $\alpha = 0,05$ )

Como demonstrado na Tabela 6e nas Figuras 12, 13 e 14, as análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, fato esse que pode ser explicado pela presença do PLA, um polímero aniônico que tende a fornecer potencial negativo a interface, devido à presença de grupamentos carboxílicos nas extremidades da cadeia polimérica (ALLEN, 1994; SCHAFFAZICK et al., 2003). Todas as amostras apresentaram uma média elevada de potencial negativo (média de  $-25,28$  mV), independentemente da incorporação de  $(\text{PhSe})_2$ , sugerindo que nem o fármaco e nem o processo de liofilização alteraram de forma significativa o potencial zeta das nanopartículas poliméricas.

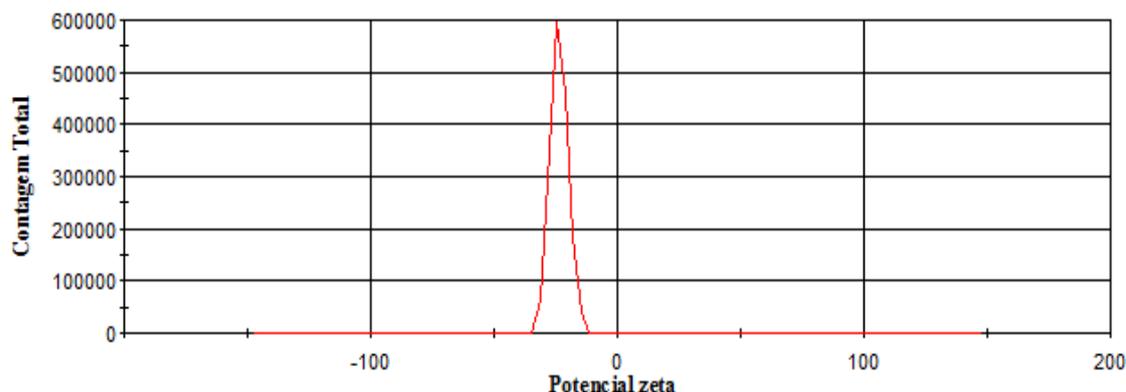
**Figura 12.** Potencial zeta das Nps-PLA vazias ( $-26,8 \pm 4,3$ ).



**Figura 13.** Potencial zeta das Nps-PLA- $(\text{PhSe})_2$  ( $-24,4 \pm 2,1$ ).



**Figura 14.** Potencial zeta das Nps-PLA-(PhSe)<sub>2</sub>após liofilização (-23,6± 3,64).



Apesar do potencial zeta ter se mostrado bastante negativo, uma possível explicação para este estar um pouco abaixo do valor considerado o ideal,  $|30\text{mV}|$ , é que apesar das lavagens realizadas para a retirada do PVA da formulação (tensoativo), resíduos do mesmo podem ser encontrados, os quais tornam-se adsorvidos sobre a superfície das nanopartículas, ocasionando modificações das propriedades físico-químicas (ESSA et al., 2010). De acordo com Schaffazick e colaboradores (2003), tensoativos como o poloxâmer e o PVA tendem a reduzir os valores absolutos de potencial zeta.

#### 5.3.4. Espectroscopia de Absorção na Região Do Infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do IV é uma técnica de identificação de grupos funcionais em substâncias orgânicas ou minerais, auxiliando na identificação dos mesmos. A técnica é baseada na mensuração da energia absorvida pela vibração de cada uma das ligações químicas presentes na substância em questão (GULLORY, 1999).

Para nanopartículas a metodologia é capaz de confirmar os principais grupamentos químicos dos compostos nas nanoformulações e averiguar a integridade do fármaco e dos outros componentes após sua encapsulação. O IV permite realizar a caracterização por meio da identificação de interações moleculares, pela comparação de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas (LOPES e FASCIO, 2004). Na Figura 15 estão apresentados os espectros obtidos para as amostras na região do infravermelho na faixa de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  do polímero PLA (a),

do (PhSe)<sub>2</sub> (b), das nanopartículas de PLA vazias (c) e das nanopartículas de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub> (d).

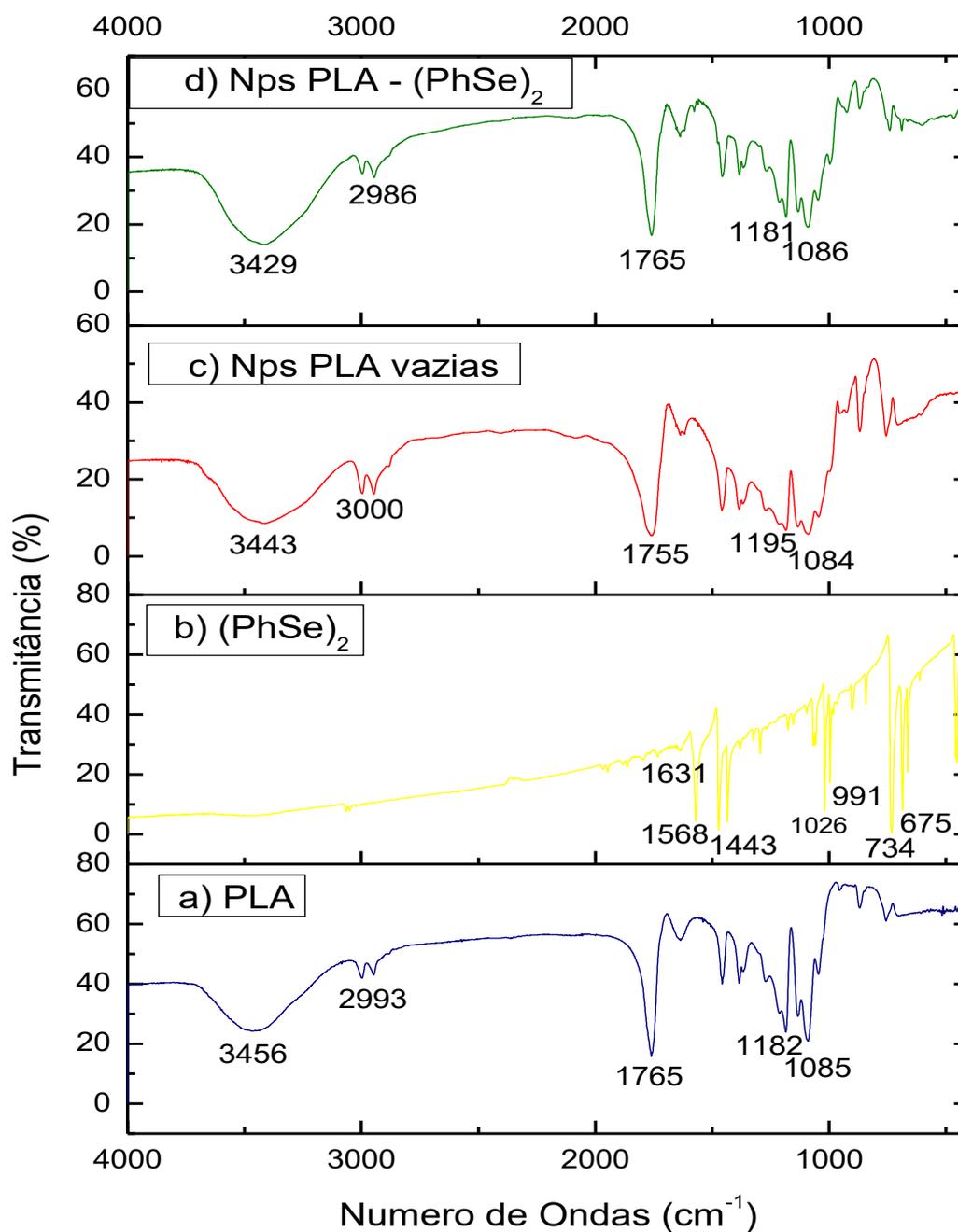
Na Figura 15 (a) o poliéster PLA apresentou bandas características. Em 3456 cm<sup>-1</sup> a banda referente aos grupos hidroxilas, em 2993 cm<sup>-1</sup> relacionado aos hidrocarbonetos, em 1765 cm<sup>-1</sup> a banda referente ao estiramento da ligação C=O, de éster. A banda devido ao estiramento assimétrico do C-O em 1182 cm<sup>-1</sup>, e, em cerca de 1085 cm<sup>-1</sup> a banda proveniente do estiramento simétrico C-O-C (BARWAL et al, 2013).

No espectro de absorção na região do IV do (PhSe)<sub>2</sub> (Figura 15 (b)) foram evidenciadas bandas que referem-se ao grupamento fenila, 1631, 1568, 1443 cm<sup>-1</sup> (C=C) aromático, em 1026 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-H aromático no plano, em 991 e 734 cm<sup>-1</sup> C-H aromático fora do plano e, em 675 cm<sup>-1</sup> a banda proveniente de C=C aromático fora do plano. Esses resultados foram condizentes com os encontrados por Vicenti (2007).

Para as nanopartículas de PLA vazias (Figura 15 (c)), as absorções características observadas (3433, 3000, 1755, 1195 e 1084 cm<sup>-1</sup>) são as mesmas da molécula de PLA isolada. Ao analisar a Figura 15 (d), referente ao espectro das nanopartículas contendo (PhSe)<sub>2</sub>, observa-se uma sobreposição ou se deduz que as bandas características do (PhSe)<sub>2</sub> foram sobrepostos pelo espectro do PLA. Em 3429 cm<sup>-1</sup> a banda é referente à deformação axial O-H do grupamento álcool e grupo carboxílico do polímero, em 2986 cm<sup>-1</sup> é referente aos hidrocarbonetos presentes na estrutura do PLA, a absorção em 1765 cm<sup>-1</sup>, é atribuída a ligação C=O presente no PLA. Além disso, os picos característicos do (PhSe)<sub>2</sub> foram sobrepostos pelas bandas em 1181 e 1086 cm<sup>-1</sup> atribuídas ao estiramento assimétrico do C-O, e ao estiramento simétrico C-O-C do PLA, respectivamente (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 2006).

Portanto, os resultados indicam que não ocorreram interações químicas que alterassem a estrutura do fármaco ou dos componentes da partícula, durante o processo de produção, devido ao fato de não serem observadas mudanças significativas nem o desaparecimento ou o aparecimento de novas bandas.

**Figura 15.** Espectros na região do infravermelho: a) PLA, b)  $(\text{PhSe})_2$ , c) Nanopartículas de PLA vazias, d) Nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$ .



### 5.3.5. Difração de Raios X (DRX)

Uma substância sólida pode se apresentar na forma cristalina e/ou amorfa, a análise dessa conformação é de suma importância, pois afeta significativamente as demais

características, como a saturação da solubilidade e a velocidade de dissolução no processo de entrega (DHIRENDRA et al., 2009).

As substâncias cristalinas são moléculas que possuem uma disposição de ordem definida, dependente de energia para desarranjar sua estrutura, sendo que quanto mais fortes forem suas forças de atração, maior será seu ponto de fusão. Já os sólidos amorfos não apresentam essa característica de organização, e também não apresentam ponto fusão, uma vez que sua organização não necessita da mesma energia que os cristais para desarranjar sua estrutura, portanto de maneira geral, sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas devido à energia livre (VLACK, 1970; BRITAIN, 1999).

A DRX identifica em materiais sólidos as fases cristalinas e amorfas, sendo que as substâncias cristalinas apresentam picos bem definidos, enquanto que os compostos amorfos apresentam-se de forma contrária, sem os picos definidos (DHIRENDRA et al., 2009; BEYERLEIN et al., 2010).

Fármacos cristalinos, como é o caso do  $(\text{PhSe})_2$ , possuem baixa solubilidade aquosa e portanto baixa biodisponibilidade em meio fisiológico (SENNA e NAKAYAMA, 2009). Em vista disso, diversos estudos têm se preocupado em encontrar mecanismos capazes de aperfeiçoar essas características. Kürti e colaboradores (2011) comprovaram que o processo de nanoencapsulação melhora o perfil de dissolução e biodisponibilidade do fármaco devido ao aumento da área de superfície e amorfização do fármaco.

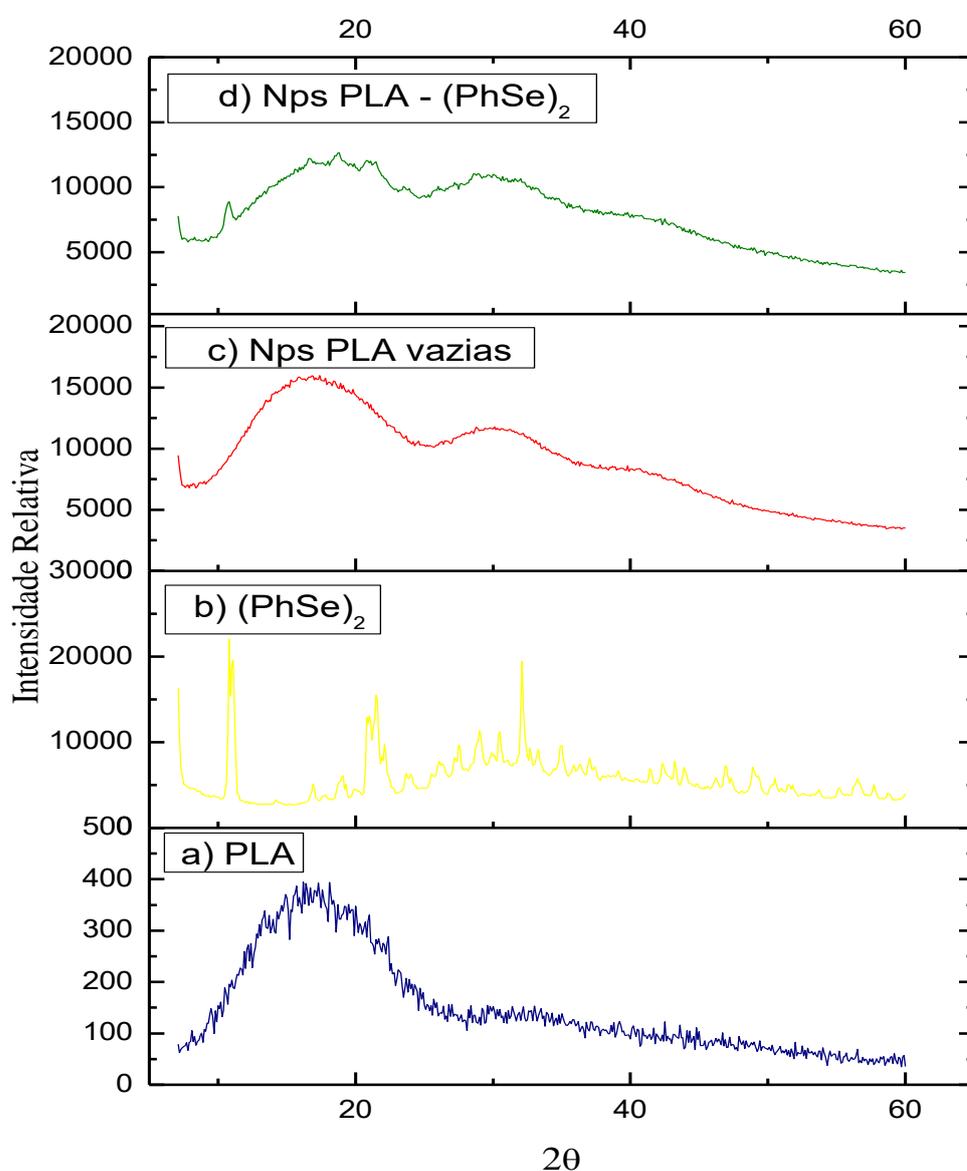
Os padrões de DRX do PLA, do  $(\text{PhSe})_2$  e das nanopartículas com ou sem  $(\text{PhSe})_2$  estão apresentados na Figura 16. De acordo com o difratograma obtido para o PLA (Figura 16 (a)), foi possível observar que o polímero utilizado na produção das Nps apresenta estrutura amorfa quanto ao estado de ordenação das moléculas, representada por um halo largo entre aproximadamente 0 e 25°. Na Figura 16 (b), o perfil do difratograma do  $(\text{PhSe})_2$  mostra uma substância cristalina, com picos bem definidos e intensos em aproximadamente 11°, 20°, 21,8° e 32°. Este difratograma é bastante semelhante ao encontrado na literatura (ANDRADE, 2014).

Os difratogramas referentes às nanopartículas vazias e carregadas, representados pela Figura 16 (c) e Figura 16 (d) apresentaram grandes semelhanças entre si, e uma mudança significativa quando comparado à cristalinidade do  $(\text{PhSe})_2$ . O desaparecimento dos picos cristalinos intensos característicos do  $(\text{PhSe})_2$ , indica que a formulação obtida encontra-se na forma amorfa. Tal amorfização vem sendo muito relatada (KÜRTI et al.,

2011; SEJU, KUMAR e SAWANT, 2011; PAPADIMITRIOU, 2008) e pode ser resultante do processo de complexação do fármaco com o polímero.

A obtenção de nanopartículas no estado amorfo foi importante, uma vez que suas moléculas estão dispostas de forma aleatória, o que resulta em um menor consumo de energia, apresentando uma dissolução mais rápida, diferentemente dos cristais. Outra vantagem de se obter uma substância em estado amorfo é o fato que pode ocorrer o aumento da atividade biológica, porém nesse estado podem acontecer mudanças na estabilidade da substância (RIEKES et al., 2011).

**Figura 16.** Difrátogramas obtidos por DRX: a) PLA, b)  $(\text{PhSe})_2$ , c) Nanopartículas PLA vazias, d) Nanopartículas PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$ .

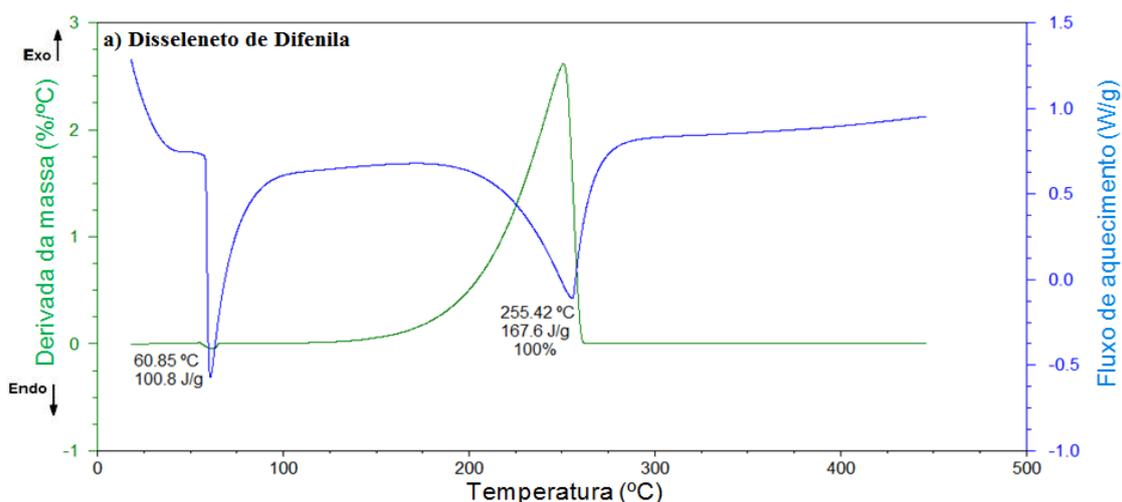


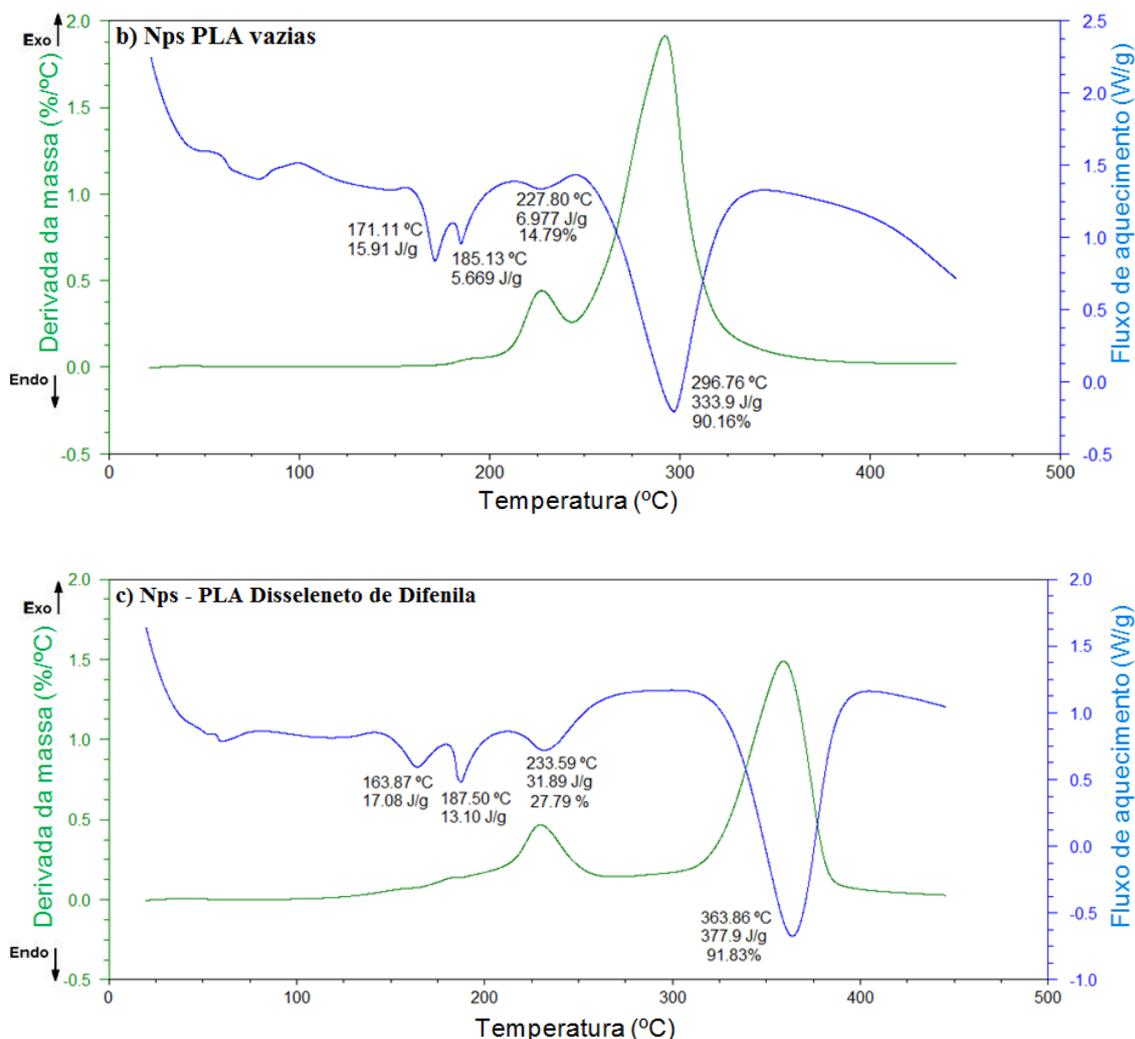
### 5.3.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)

A técnica de DSC permite medir a alteração de energia em função da mudança de temperatura, sendo possível realizar análises estruturais, térmico-comportamentais e de variações físicas (BARKAI et al., 1990). Nas nanopartículas, a técnica vem sendo empregada a fim de se obter informações sobre as propriedades físicas como natureza cristalina ou amorfa e investigar possíveis interações e incompatibilidades que possam ocorrer entre os polímeros e a droga nas formulações (NARANG; DELMARRE e GAO, 2007). As curvas DTG e DSC das nanopartículas são comparadas aos perfis dos compostos em separado e as observações são realizadas por meio de análises de deslocamentos, redução significativa ou desaparecimento de pico (FORD e MANN, 2012; CALVO et al, 1996).

Na Figura 17 (a) é possível observar dois picos na curva DSC, ambos endotérmicos, sendo que o primeiro ocorre em  $60,85^{\circ}\text{C}$  ( $100,8 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e é referente a fusão da droga, confirmando a natureza cristalina do fármaco. O outro pico que se inicia próximo aos  $200^{\circ}\text{C}$  com perda máxima de massa em  $255^{\circ}\text{C}$  ( $167,6 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ ) é referente ao processo de decomposição térmica, que é confirmada pela derivada da curva termogravimétrica (DTG).

**Figura 17.** Curvas de DSC e DTG: a)  $(\text{PhSe})_2$ , b) Nanopartícula PLA vazias, c) Nanopartículas PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$ .





De acordo com a literatura (MAINARDES, 2007) o polímero PLA exibe um pico de relaxamento endotérmico relacionado à transição vítrea do polímero em aproximadamente 53°C. Ponto de fusão não é observado, já que o polímero se apresenta na forma amorfa. A decomposição é caracterizada por um efeito endotérmico entre 250 e 350°C aproximadamente.

Na Figura 17 (b) está representado as curvas DTG e DSC das nanopartículas de PLA vazias. Neste Figura observa-se um pico referente ao relaxamento endotérmico relacionado à transição vítrea do PLA iniciando-se em cerca de 56°C. Entre 150 e 250°C três picos de baixa intensidade são observados (171,11; 185,13 e 227,80°C), sucedidos por um pico intenso em 296,76 °C (333,9 J.g<sup>-1</sup>), que correspondem à decomposição térmica do polímero em questão. Através da curva derivada da TG, pode-se observar uma

perda de 14,79% de massa antes de atingir 250 °C, e em 340 °C uma perda de massa próxima aos 75%.

A curva DSC das nanopartículas de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub>, Figura 17 (c), apresentou um primeiro evento endotérmico por volta dos 50°C relacionada a transição vítrea do polímero. Os picos endotérmicos seguintes foram em 163,87; 187,50 e 233,59°C. Nesse último pico iniciou-se a decomposição térmica do composto, que se acentuou ao atingir 363,86°C, com um pico endotérmico intenso e uma perda de 64,04% da massa. O pico endotérmico relativo à fusão do (PhSe)<sub>2</sub> não foi observado.

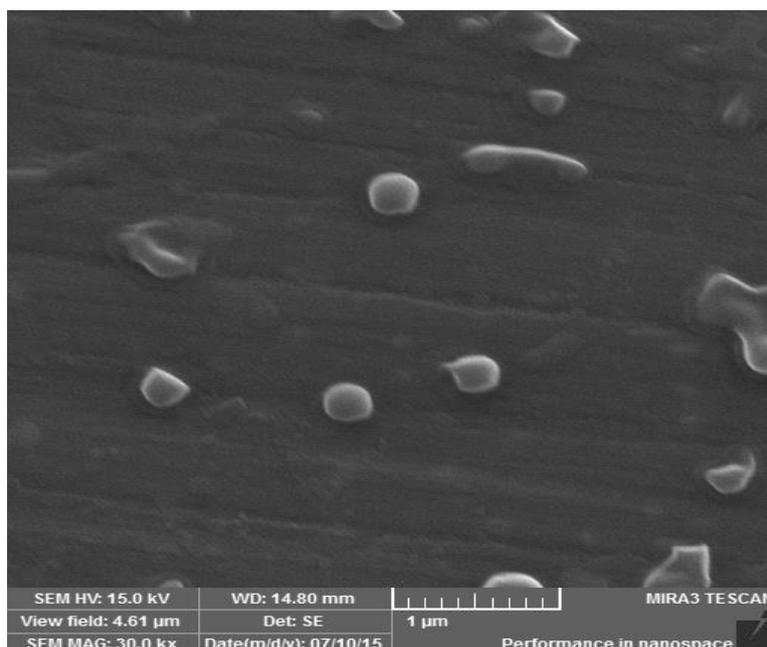
A ausência de picos na curva da nanopartícula contendo (PhSe)<sub>2</sub> diferentes dos apresentados na nanopartícula vazia, e o não aparecimento do pico endotérmico relacionado à fusão cristalina do (PhSe)<sub>2</sub>, indica que houve uma interação entre o fármaco e o PLA de forma que o fármaco no seu estado amorfo encontra-se disperso molecularmente na matriz polimérica. Esses dados corroboram com o que foi observado através do DRX e IV.

### 5.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) foi mais uma das técnicas utilizadas para a caracterização do sistema nanoestruturado obtido no trabalho. Essa técnica forneceu informações a respeito da morfologia, diâmetro das partículas, bem como a presença ou não de diferentes populações das nanopartículas de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub>.

A Figura 18 fornece uma imagem com uma ampliação de 30.000 vezes das nanopartículas, a partir desta foi possível observar que as partículas preparadas pelo método emulsificação- evaporação do solvente apresentaram formato arredondado, relativa homogeneidade de tamanho e diâmetro médio semelhante aos valores obtidos pelo Espalhamento de Luz Dinâmico, na faixa de 220 nm, indicando que o método utilizado para a preparação das mesmas foi adequado. Além disso, não foram observados indícios de agregação nas Nps.

**Figura 18.** Microscopia eletrônica de Varredura das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$ , aumento de 30000 vezes.



## 5.4. Estudo de Estabilidade

### 5.4.1. Avaliação da Estabilidade do $(\text{PhSe})_2$ frente ao Tampão Fosfato pH 7,4

Estudos de estabilidade são realizados com o objetivo de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e das formulações obtidas dentro dos limites especificados, sob a influência de alguns fatores em função do tempo (SILVA et al., 2009). Os resultados decorrentes da exposição do padrão de  $(\text{PhSe})_2$  ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $n = 3$ ) em tampão fosfato, pH 7,4 em função do tempo estão demonstrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados do teste de estabilidade para os padrões de  $(\text{PhSe})_2$  em tampão fosfato pH 7,4.

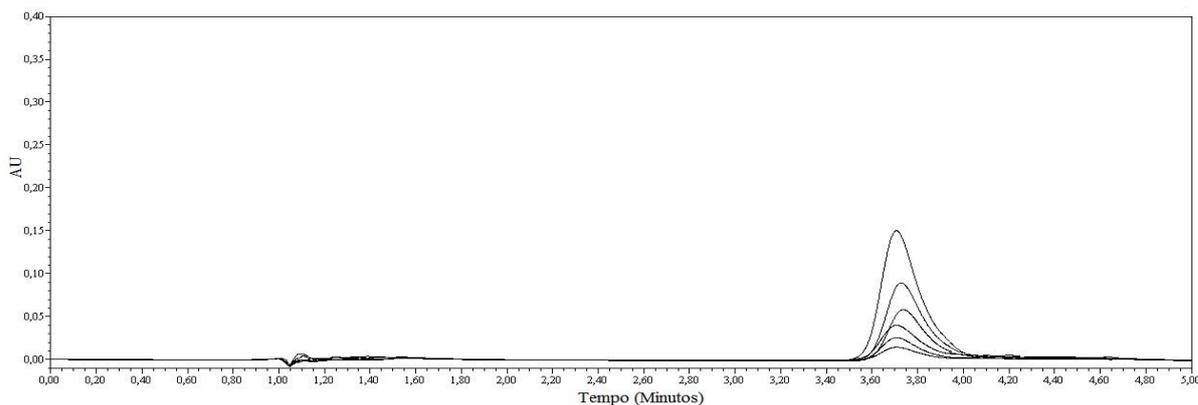
| Tempo (h)   | 0               | 1               | 2               | 4               | 8 | 24 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|----|
| Porcentagem de recuperação $\pm$ DPR <sup>a</sup> | 87,0 $\pm$ 2,5% | 43,5 $\pm$ 1,9% | 24,5 $\pm$ 3,2% | 10,6 $\pm$ 2,7% | - | -  |

DPR = Desvio Padrão Relativo ( $n = 3$ )

Como pode ser observado na Tabela 7, logo após o  $(\text{PhSe})_2$  ser colocado em contato com tampão fosfato ocorreu uma diminuição na sua porcentagem de recuperação. Com o passar do tempo essa recuperação diminui ainda mais, tanto que em 8 e 24 horas

os valores obtidos ficam abaixo do limite de quantificação estipulado pelo método. Essa queda de taxas de recuperação pode também ser observada na Figura 19, onde é nítida a diminuição na intensidade dos picos com o passar do tempo, porém o pico continua a aparecer no mesmo tempo de retenção e nenhum outro pico interferente pode ser observado.

**Figura 19.** Cromatogramas que mostram os resultados no teste de estabilidade para o padrão de  $(\text{PhSe})_2$  em tampão fosfato pH 7,4, em função do tempo.



Essa diminuição na resposta do  $(\text{PhSe})_2$  provavelmente é devido ao fármaco estar sofrendo algum tipo de degradação neste meio, precipitação ou ainda pode ser justificada pela lipofilicidade do  $(\text{PhSe})_2$ . Já que quando o  $(\text{PhSe})_2$  foi misturado no solvente hidrofílico com auxílio de um dispersor ultrassônico, inicialmente formou-se uma solução, porém com o passar do tempo o fármaco formou agregados e se separou da fase aquosa novamente. As nanopartículas são, portanto, uma estratégia para evitar a degradação prematura do fármaco e também para melhorar a solubilidade do fármaco em questão (SOPPIMATH et al., 2001; PUISIEUX et al., 1994; BENOIT et al., 1986). Para obtenção das nanopartículas são utilizados tensoativos uma vez que estes possuem capacidade de solubilização de substâncias e têm sido usadas para aumentar a estabilidade, a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos (CONSTANTINIDES et al., 1994; CONSTANTINIDES et al., 1996; WARGAFTIG, 2001; ACTIS, VOLPES e RIZZETTO, 1999).

#### 5.4.2. Avaliação da estabilidade das nanopartículas - $(\text{PhSe})_2$ em suspensão

A avaliação da estabilidade física das suspensões de nanopartículas poliméricas sob diferentes condições de armazenamento é de fundamental importância em aplicações farmacêuticas, por fornecerem indicações sobre o comportamento do produto em

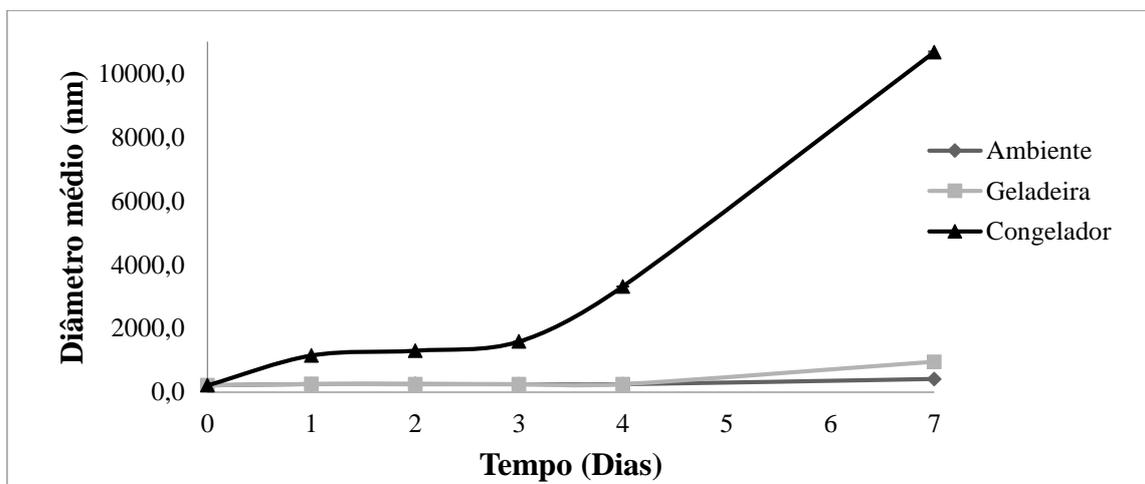
determinado intervalo de tempo, frente a diversas condições. Vários fatores são capazes de influenciar a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Apesar de muito importante, poucos estudos referentes à estabilidade de nanopartículas contendo diferentes fármacos são encontrados na literatura (SCHAFFAZICK et al., 2002; LACOUILONCHE et al., 1999; POHLMANN et al., 2002).

Considerando a importância desse estudo, as suspensões de nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$ , foram armazenadas à temperatura ambiente ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ), refrigeradas a  $8\text{ }^\circ\text{C}$  e congeladas a  $-12\text{ }^\circ\text{C}$  sendo avaliados em tempos pré-determinados (1, 2, 3, 4 e 7 dias), os parâmetros de avaliação macroscópica, tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

Todas as formulações estudadas foram obtidas como suspensões coloidais e apresentaram um aspecto leitoso característico. Tanto nas nanopartículas mantidas a temperatura ambiente, quanto nas mantidas refrigeradas nenhuma alteração macroscópica foi observada durante os primeiros quatro dias, tais como cremagem, sedimentação ou floculação. Entretanto, ao 7º dia observou-se separação de fases, com precipitado amarelo e sobrenadante incolor para as nanopartículas refrigeradas, e agregados nas formulações mantidas a temperatura ambiente. Para as nanopartículas mantidas congeladas ( $-12\text{ }^\circ\text{C}$ ), logo no primeiro dia houve separação de fases, com precipitado amarelo e sobrenadante incolor.

Na Figura 20 avaliação do diâmetro médio, demonstrou que em relação ao tamanho inicial das nanopartículas, as amostras armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeradas ( $8\text{ }^\circ\text{C}$ ) não apresentaram diferenças estatísticas significantes até o 4º dia. Porém no 7º dia, ambas as condições apresentaram tamanhos com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos iniciais. Já as congeladas ( $-12\text{ }^\circ\text{C}$ ) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) desde o primeiro dia de incubação.

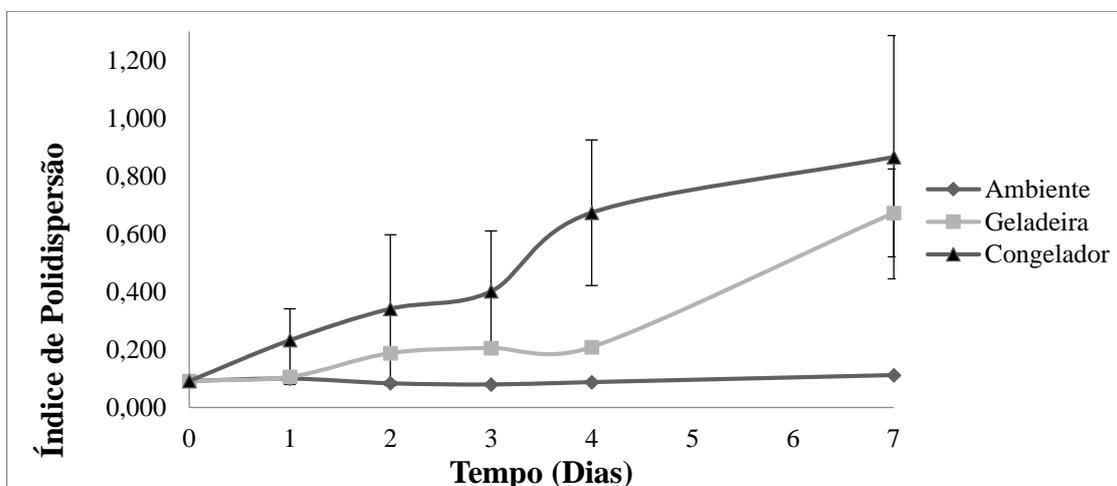
**Figura 20.** Diâmetro médio das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  (suspensão) em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento,  $n=3$ .



As alterações do diâmetro provavelmente ocorreram devido à degradação do polímero. O processo de degradação diminui o efeito estabilizador da cobertura polimérica, facilitando assim os processos de agregação e coalescência que consequentemente aumentam o tamanho médio das partículas (SARTORI, 2007). Através da avaliação macroscópica das formulações, foi possível observar que ambas as formulações apresentaram alterações como aglomerados e precipitados, o que certamente contribuiu para o aumento do tamanho médio das partículas. O aumento drástico de tamanho das nanopartículas que foram armazenadas congeladas pode ser somado também ao fato de não ter sido utilizado nenhum tipo de crioprotetor, uma vez que a presença deste é fundamental nesses casos, para manutenção das características iniciais (MOLPECERES et al., 1997; SAEZ et al., 2000; KONAN et al., 2002; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

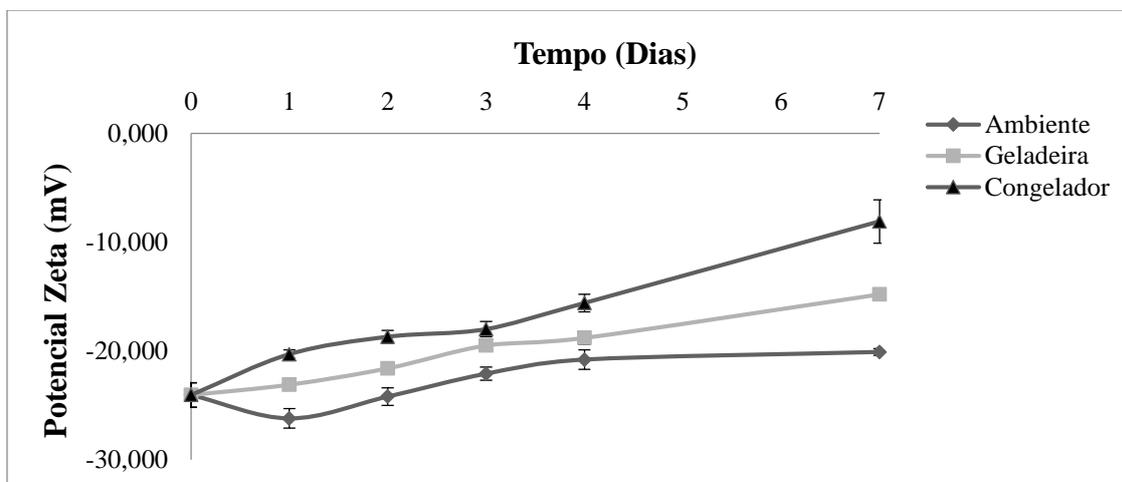
Em relação ao índice de polidispersão, Figura 21, as nanopartículas armazenadas a temperatura ambiente mantiveram valores próximos aos iniciais durante todos os tempos, não apresentando diferenças estatísticas quando comparadas ao inicial, enquanto que para as nanopartículas armazenadas sob refrigeração, no 7º dia o índice encontrado foi muito superior as médias dos dias anteriores ( $p < 0,05$ ). Já para as nanopartículas congeladas uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pode ser observada no primeiro dia de estudo. Um valor aumentado para o índice de polidispersão ao longo do experimento indica a presença de diferentes populações de partículas dentro da mesma formulação, o que não é o ideal.

**Figura 21.** Índice de polidispersão das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  (suspensão) em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento,  $n=3$ .



O último parâmetro avaliado neste estudo de estabilidade foi o potencial zeta, que representa um indicativo da estabilidade física, devido à repulsão eletrostática causada na superfície das nanopartículas (FAZIL et al., 2012; RIDOLFI et al., 2012). É possível observar que o potencial zeta mensurado logo após a preparação das nanopartículas foi de  $-24,05 \pm 1,13$  mV, e ao final dos 7 dias os potenciais encontrados para o armazenamento em temperatura ambiente,  $8^\circ\text{C}$  e  $-12^\circ\text{C}$  foram respectivamente de  $-20,17 \pm 1,47$ ,  $-14,85 \pm 1,10$  e  $-8,12 \pm 2,03$  mV ( $p < 0,05$ ). Analisando-se a Figura 22, observa-se claramente uma diminuição nos valores em módulo do potencial zeta para as três condições, porém mais intensificado para as nanopartículas armazenadas refrigeradas e congeladas. Essa diminuição nas cargas superficiais das partículas talvez também se deva ao fato do polímero estar sofrendo degradação. Como o PLA trata-se de um polímero aniônico que tende a fornecer potencial negativo a interface (ALLEN, 1994; SCHAFFAZICK et al., 2003), conforme este vai se degradando a cobertura polimérica vai sendo prejudicada, e os valores das cargas tendem a ficar menos negativos.

**Figura 22.** Potencial zeta das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  (suspensão) em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.



Apesar de inicialmente, a formulação apresentar um valor de potencial zeta bastante elevado que pressupõe um longo período de estabilidade, durante o estudo verifica-se que esse valor é modificado com o passar dos dias, e a diminuição do potencial zeta faz com que conseqüentemente, diminuam as forças repulsivas entre as partículas favorecendo a coalescência.

Estudar a estabilidade de cada formulação específica é uma etapa fundamental, pois dessa forma é possível prever quanto tempo às mesmas podem ser mantidas armazenadas, assim como quais condições são as melhores para esse armazenamento. Para este estudo em particular, o armazenamento das nanopartículas em suspensão não se mostrou uma boa opção, devido aos pouquíssimos dias de estabilidade. A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas. Além disso, é importante enfatizar que formas farmacêuticas líquidas são propensas à proliferação microbiana, havendo necessidade de adição de conservantes (LE HIR, 1997).

Tendo em vista que esses problemas físico-químicos e microbiológicos possam ser retardados ou evitados através de uma operação de secagem (FRANKS, 1998), vem crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas, ampliando as perspectivas para utilização clínica desses sistemas carreadores de fármacos (SCHMIDT e BODMEIER, 1999; MULLER et al., 2001; MURAKAMI, et al., 2000). A desidratação das suspensões de nanopartículas tem sido

realizada através das operações de sublimação (liofilizadas) (SAEZ et al., 2000) ou aspersão (spray-drying ou nebulização) (MULLER, et al., 2000; MULLER et al., 2001).

#### 5.4.3. Avaliação da estabilidade das nanopartículas - (PhSe)<sub>2</sub> liofilizadas

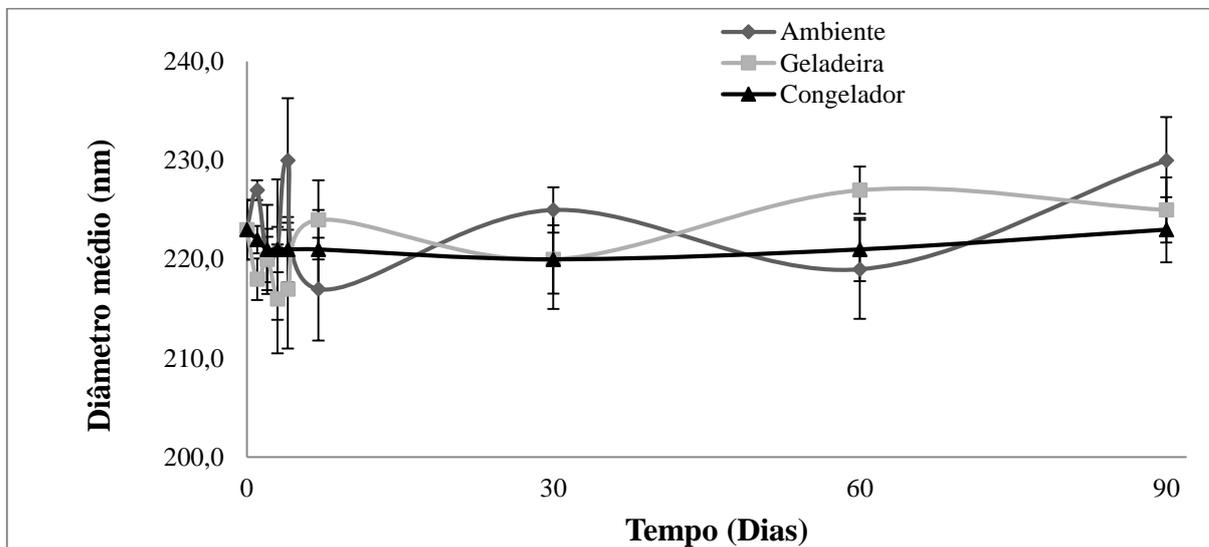
A liofilização consiste na remoção da água através de sublimação (ADAMS, 1991) e tem sido empregada para a secagem de suspensões de nanopartículas (MOLPECERES et al., 1997; SAEZ et al., 2000; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). A liofilização das nanopartículas geralmente é feita com a presença de um crioprotetor, fundamental para a desidratação de suspensões. Os crioprotetores mais comuns, citados na literatura são os carboidratos (glicose, sacarose, manitol, frutose), sendo os mono e dissacarídeos os mais efetivos na manutenção das características iniciais de tamanho das partículas. Este efeito crioprotetor ou lioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando, assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as ressuspendíveis (MOLPECERES et al., 1997; SAEZ et al., 2000; KONAN et al., 2002; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

A liofilização foi o método empregado para a secagem das suspensões de nanopartículas de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub>, e o crioprotetor de escolha foi a sacarose em uma concentração de 5%. Após as nanopartículas serem liofilizadas, estas foram armazenadas em um dessecador e estocadas em temperatura ambiente (25 °C), refrigeradas (8 °C) e congeladas (-12 °C). Alíquotas dos produtos liofilizados foram reidratadas para analisar o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta durante um período de 3 meses (1, 2, 3, 4, 7, 30, 60, 90 dias), afim de certificar se as características iniciais se mantiveram após o processo de secagem.

A Figura 23 *Figura 23* apresenta a avaliação do diâmetro médio das nanopartículas após a liofilização. A partir da Figura é possível observar que no período de 3 meses, o diâmetro médio das nanopartículas - (PhSe)<sub>2</sub> permaneceu praticamente inalterado, sem diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) em todas as condições estudadas. Assegurando dessa forma, que o método de secagem em questão, além de garantir a preservação do diâmetro médio após o processo, contribuiu evitando a agregação das partículas durante a estocagem. Sabe-se que a estabilidade do tamanho é um requisito

importante para a administração segura e para a liberação controlada e uniforme do fármaco encapsulado.

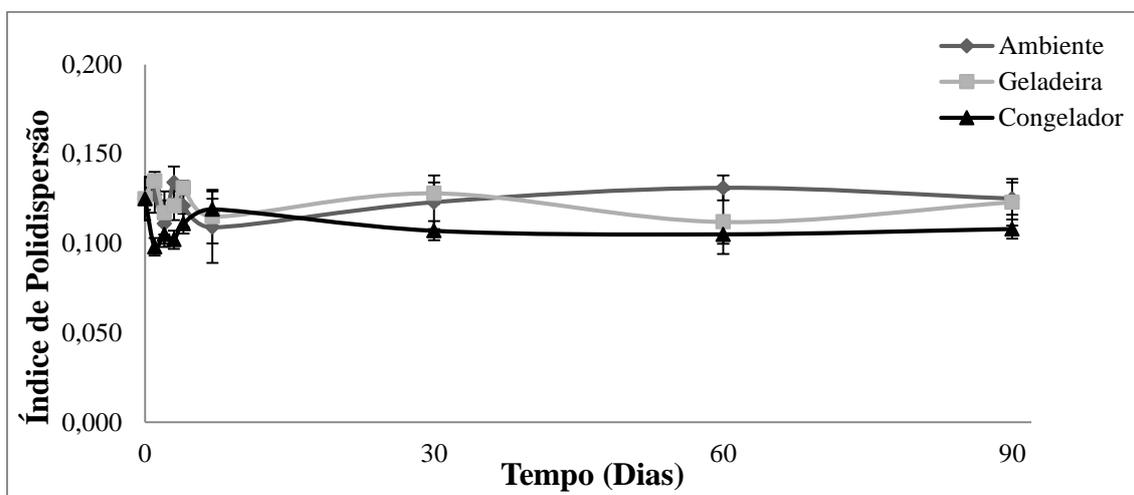
**Figura 23.** Diâmetro médio das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  liofilizadas em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento,  $n=3$ .



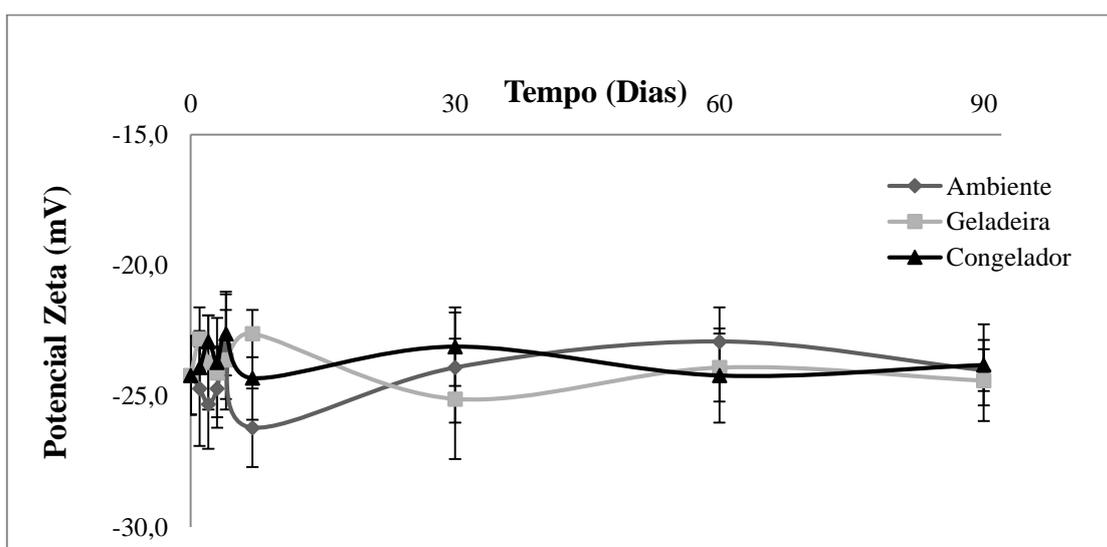
Os índices de polidispersão em função do tempo estão demonstrados na Figura 24. Assim como o diâmetro médio, não houve alteração no índice de polidispersão durante os 3 meses de estudo em todas as condições ( $p > 0,05$ ). Estes baixos índices de polidispersão ( $< 0,15$ ) fornecem informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, indicando a manutenção de sistemas monodispersos. Nesse caso, as nanopartículas  $(\text{PhSe})_2$  foram congeladas na presença de crioprotetor sacarose 5% antes da liofilização, que conferiu proteção para as nanopartículas durante o congelamento, uma vez que as baixas temperaturas podem danificar ou alterar as propriedades físico-químicas das partículas (SAEZ et al., 2000; KONAN et al., 2002).

Na Figura 25 pode-se observar as variações do potencial zeta ao longo do tempo. Durante os 3 meses de análise, pequenas alterações nas cargas superficiais das partículas podem ser notadas, porém quando aplicado análise estatística, estes valores não apresentaram diferença significativa quando comparado ao valor inicial ( $p > 0,05$ ). A manutenção do potencial zeta por volta dos  $-24$  mV, é influenciado nesse caso pelo polímero PLA, o qual fornece um potencial negativo a interface. Esse resultado é importante garantindo uma boa estabilidade físico-química, pois as forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas.

**Figura 24.** Índice de polidispersão das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  liofilizadas em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.



**Figura 25.** Potencial zeta das nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  liofilizadas em função do tempo, em diferentes temperaturas de armazenamento, n=3.



O desenvolvimento de formulações de nanopartículas do  $(\text{PhSe})_2$  mais estável foi um desafio. Inicialmente as nanopartículas apresentaram problemas de baixa estabilidade física quando mantidas em suspensão aquosa, tanto em temperatura ambiente quanto refrigerada e congelada. Esse inconveniente foi contornado através da liofilização. Esse método com auxílio de um crioprotetor que auxiliou na desidratação de suspensões, demonstrou boa estabilidade. Os resultados comprovaram o desenvolvimento de uma forma farmacêutica sólida estável, ampliando as perspectivas para utilização clínica destes sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos.

## 5.5. Estudo de Liberação *in vitro*

### 5.5.1. Estudo da solubilidade

Para um estudo de liberação é preciso garantir que as condições *sink* sejam mantidas, ou seja, a concentração do soluto não deve alcançar mais do que 10-15% da sua solubilidade máxima (ABDOU, 1989), a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do ensaio (MARQUES, BROWN, 2002). Esta condição é fundamental para a realização de análises matemáticas da liberação, uma vez que as equações de difusão tornam-se de difícil resolução em condições de acúmulo do ativo no meio de dissolução (COLOMÉ, 2006).

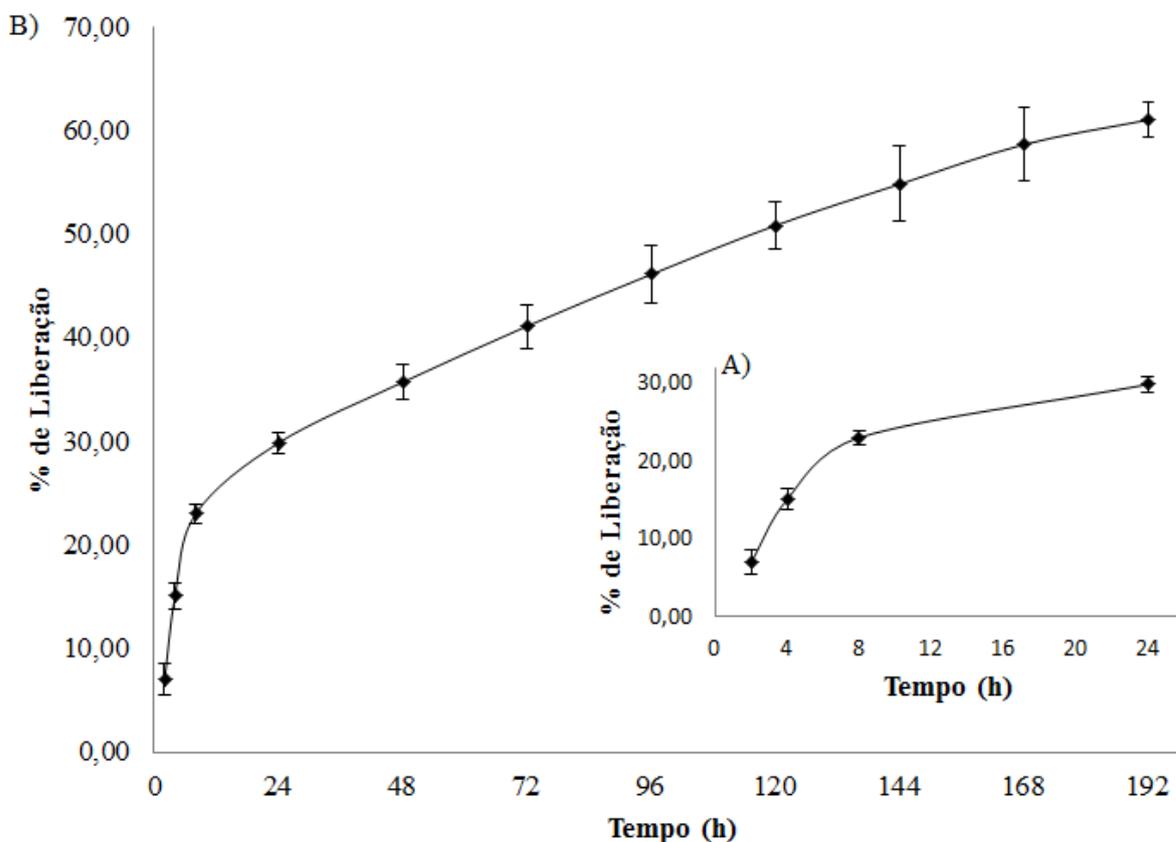
Nos testes de solubilidade do (PhSe)<sub>2</sub> em meios utilizados para os ensaios de liberação, observou-se melhor solubilidade da droga em questão no tampão PBS 50 mM pH 7,4 com tween 80 a 5% (400 µg.mL<sup>-1</sup>), e por isso foi selecionado este meio para dar continuidade aos estudos de liberação *in vitro*.

### 5.5.2. Determinação do perfil de liberação *in vitro*

A obtenção de sistemas nanoparticulados contendo fármaco possibilita modificar a biodisponibilidade deste sem alterar a sua estrutura química, assegurando uma distribuição em concentrações adequadas no organismo e proteção contra a degradação. O perfil de liberação *in vitro* de um fármaco associado à nanopartículas depende de uma infinidade de fatores, como condições do ensaio de liberação (pH do meio, temperatura, tempo de contato, entre outros); natureza, biodegradabilidade, peso molecular e concentração do polímero; concentração e características físico-químicas do fármaco; tamanho das partículas, dentre outros.

Neste contexto, o ensaio para determinação do perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas de PLA contendo (PhSe)<sub>2</sub> foi realizado por meio de ultracentrifugação conforme descrito no item 4.3.6.2, o qual utilizou como meio receptor de (PhSe)<sub>2</sub> o tampão PBS 50 mM, pH 7,4 com tween 80 a 5%. Na Figura 26, o perfil de liberação foi determinado pela relação do percentual de liberação cumulativa em função do tempo.

**Figura 26.** Porcentagem de liberação cumulativa *in vitro* de nanopartículas do  $(\text{PhSe})_2$  em solução de PBS tween 80 a 5% (50 mM, pH=7,4 à 37 °C).



Na Figura 26 (A), foi possível verificar que em 8 h a porcentagem de liberação do  $(\text{PhSe})_2$  foi de aproximadamente 23%, e atingiu cerca de 30% durante as primeiras 24 h. Após esse período, como mostra a Figura 26 (B) a liberação continuou de forma constante e lenta, e ao final das 192 horas, houve uma liberação cumulativa de  $61,02 \pm 1,74\%$ . O tempo necessário para que a formulação liberasse 50% do fármaco encapsulado ( $t_{50\%}$ ) foi de aproximadamente 120 horas. A liberação do fármaco a partir das nanopartículas ocorreu em duas fases: uma liberação rápida inicial, denominada efeito “burst” ocasionado provavelmente pelo fármaco adsorvido na parede das nanopartículas, seguida por um perfil de liberação mais lenta, demonstrando um efeito de liberação prolongado e sustentado mantendo a concentração efetiva do  $(\text{PhSe})_2$  durante um longo período.

A definição da cinética de liberação do fármaco é de fundamental importância, pois dessa forma é possível elucidar mecanismos que possam influenciar nos efeitos biológicos, relacionados ao comportamento do fármaco quando nanoencapsulado. Porém

sabe-se que a liberação de fármacos a partir de formulações poliméricas pode ser guiada por diversos mecanismos:

- Dessorção do fármaco da superfície das nanopartículas;
- Difusão do fármaco a partir da matriz;
- Erosão da matriz polimérica;
- Combinação dos processos de difusão e erosão (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O uso de modelos cinéticos é frequentemente útil na elucidação dos mecanismos de liberação. Para definir qual é o modelo matemático mais adequado ao perfil de liberação do (PhSe)<sub>2</sub>, foram observados os maiores coeficientes de correlação e valores de critério de seleção do modelo (CSM) dados pelo software. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Análise da cinética de liberação do (PhSe)<sub>2</sub> a partir das nanopartículas de PLA em tampão PBS-tween 80 a 5% (50 mM, pH=7,4).

| Modelo                | R      | CSM    | K (h <sup>-1</sup> )         |
|-----------------------|--------|--------|------------------------------|
| <b>Ordem Zero</b>     | 0,9529 | 0,3977 | 0,388                        |
| <b>Primeira Ordem</b> | 0,9771 | 0,9638 | 0,006                        |
| <b>Segunda Ordem</b>  | 0,9998 | 7,4318 | $\alpha=0,0035/ \beta=0,291$ |
| <b>Higuchi</b>        | 0,9529 | 0,3977 | 0,235                        |

r=coeficiente de correlação, CSM = critério de seleção de modelo, k= constante de liberação

A modelagem matemática dos dados de liberação mostrou que, de acordo com os coeficientes de determinação e critérios de seleção de modelo, os dados de liberação *in vitro* foram a favor da cinética de segunda ordem para a formulação, uma vez que o mesmo apresentou valores de r e CSM maiores que os demais modelos. As formulações que seguem este perfil são orientadas por duas constantes de liberação, a  $\alpha$  ou constante cinética da etapa rápida de liberação e a  $\beta$ , constante verificada na etapa lenta de liberação (PEREIRA et al., 2006) e estas duas fases são facilmente percebidas quando observa-se a Figura 26.

Também aplicou-se o modelo de Korsmeyer-Peppas a fim de verificar qual/quais mecanismos de liberação do fármaco predominaram durante o experimento. Geralmente esse modelo é usado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido, como neste caso. O modelo

descreve a liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico e pode ser utilizado para analisar os primeiros 60% de fármaco liberados (SIEPMANN e PEPPAS, 2001; GRASSI e GRASSI, 2005).

O valor de  $n$  obtido neste modelo é indicativo do mecanismo de liberação do fármaco a partir das nanoesferas. Se o  $n$  é igual ou menor a 0,45, o mecanismo de liberação segue a difusão fickiana; valores entre 0,45 e 0,89 indicam transporte anômalo do ativo, ou seja, a liberação é controlada por uma combinação de difusão e de relaxamento do polímero. Quando  $n$  atinge um valor igual ou superior a 0,89, o mecanismo de liberação do fármaco é considerado como o transporte caso II, que envolve o relaxamento e a desestruturação da cadeia do polímero (SIEPMANN e PEPPAS, 2001). Por meio dessa avaliação é possível prever que o  $(\text{PhSe})_2$  é liberado das nanopartículas de PLA por meio de difusão, uma vez que o  $n$  obtido foi de 0,366. Num sistema de difusão a água ou solvente difunde-se para a membrana ou para a matriz polimérica, o fármaco dissolve-se e finalmente difunde-se para fora do polímero (MANADAS, PINA, VEIGA, 2002).

Uma liberação controlada do fármaco, assim como a demonstrada pelas nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  seria capaz de proporcionar uma redução dos efeitos adversos e tóxicos, prolongamento da meia vida biológica *in vivo* do fármaco, diminuição do número de doses, e consequentemente maior facilidade da adesão do paciente ao tratamento mantendo o efeito terapêutico desejado, um resultado fundamental na área da nanotecnologia (LANGNER, UGORSKI, 2000).

## 5.6. Aplicabilidade das Nanopartículas

### 5.6.1 Estudo do potencial antioxidante das nanopartículas de (PhSe)<sub>2</sub> frente ao HOCl

Uma substância que em baixas concentrações, em comparação as concentrações de um substrato oxidável, inibe ou minimiza de maneira significativa sua oxidação, propiciando assim, a diminuição da produção de espécies reativas ou as suas ações, pode ser definida como uma substância antioxidante (APAK et al., 2007; DEVASAGAYAM et al., 2004). A importância dessas substâncias está ligada principalmente ao fato de que, o excesso de radicais livres podem causar efeitos deletérios sobre as células, causando ou agravando doenças cardiovasculares, o envelhecimento celular, alterações mutagênicas, neurológicas e o crescimento de tumores (APAK et al., 2007).

Em sistemas biológicos, o ácido hipocloroso HOCl é o agente oxidante mais tóxico e abundante. Produzido por neutrófilos nos sítios das inflamações, ele também pode atacar moléculas importantes e gerar outras espécies reativas de oxigênio altamente prejudiciais. Esta espécie reativa é formada como subproduto da atividade da mieloperoxidase (enzima que constitui 5% das proteínas totais do neutrófilo), que utiliza o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para oxidar íons cloretos a HOCl (CHANTEPIE et al., 2009, JERLICH et al., 2000). Acredita-se que a produção de HOCl por este sistema constitui um importante mecanismo de defesa contra microrganismos, entretanto, sua produção excessiva pode levar danos nos tecidos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como aterosclerose e câncer (CHANTEPIE et al., 2009).

Sabe-se que moléculas contendo selênio podem ser melhores antioxidantes do que os antioxidantes clássicos já conhecidos. O (PhSe)<sub>2</sub> sendo um organocomposto de selênio tem desempenhado um importante papel protetor em uma variedade de modelos experimentais associados à exacerbada produção de espécies reativas (ROSSATO et al., 2002; MEOTTI et al., 2004; GHISLENI et al., 2003; BURGER et al., 2004; BORGES et al., 2006). Baseando-se nessas informações, a atividade antioxidante do (PhSe)<sub>2</sub> foi avaliada frente ao HOCl, e além disso verificou-se também se o processo de nanoencapsulação tem influência na capacidade antioxidante do (PhSe)<sub>2</sub>.

Os resultados da atividade antioxidante do (PhSe)<sub>2</sub> livre e em nanopartículas pela inibição do ácido hipocloroso a partir das concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg.mL<sup>-1</sup> estão representados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Porcentagem de Inibição do Ácido Hipocloroso pelo (PhSe)<sub>2</sub> (livre e nanoencapsulado) em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4) ( $\lambda$  =650 nm).

| Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | (PhSe) <sub>2</sub> (%)       | Nps-PLA- (PhSe) <sub>2</sub> (%) |
|--|-------------------------------|----------------------------------|
| <b>0 horas</b>                         |                               |                                  |
| 5                                      | 53,26 $\pm$ 4,48 <sup>a</sup> | 42,93 $\pm$ 3,26 <sup>b</sup>    |
| 10                                     | 61,57 $\pm$ 4,31 <sup>a</sup> | 55,31 $\pm$ 6,40 <sup>a</sup>    |
| 15                                     | 80,78 $\pm$ 7,36 <sup>a</sup> | 57,44 $\pm$ 4,34 <sup>b</sup>    |
| 20                                     | 92,21 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup> | 64,46 $\pm$ 6,33 <sup>b</sup>    |
| <b>24 horas</b>                        |                               |                                  |
| 5                                      | 18,59 $\pm$ 6,04 <sup>a</sup> | 15,08 $\pm$ 2,03 <sup>a</sup>    |
| 10                                     | 38,65 $\pm$ 4,39 <sup>a</sup> | 25,25 $\pm$ 6,42 <sup>b</sup>    |
| 15                                     | 49,39 $\pm$ 5,89 <sup>a</sup> | 51,19 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>    |
| 20                                     | 52,65 $\pm$ 4,17 <sup>a</sup> | 62,65 $\pm$ 4,52 <sup>a</sup>    |
| <b>48 horas</b>                        |                               |                                  |
| 5                                      | 19,83 $\pm$ 6,15 <sup>a</sup> | 17,72 $\pm$ 4,86 <sup>a</sup>    |
| 10                                     | 23,97 $\pm$ 3,75 <sup>a</sup> | 26,25 $\pm$ 4,85 <sup>a</sup>    |
| 15                                     | 39,69 $\pm$ 5,01 <sup>a</sup> | 31,08 $\pm$ 6,46 <sup>a</sup>    |
| 20                                     | 44,61 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup> | 50,05 $\pm$ 3,92 <sup>a</sup>    |
| <b>72 horas</b>                        |                               |                                  |
| 5                                      | 18,57 $\pm$ 3,15 <sup>a</sup> | 27,74 $\pm$ 4,71 <sup>b</sup>    |
| 10                                     | 27,61 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup> | 28,24 $\pm$ 4,71 <sup>a</sup>    |
| 15                                     | 30,72 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup> | 38,36 $\pm$ 2,74 <sup>b</sup>    |
| 20                                     | 41,71 $\pm$ 2,84 <sup>a</sup> | 48,63 $\pm$ 4,70 <sup>a</sup>    |

<sup>a,b</sup> média de triplicata  $\pm$  desvio padrão analisados por linha. Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (Teste *t*,  $\alpha$  0.05)

Os resultados mostram um perfil de inibição concentração-dependente e decrescente em função do tempo tanto para o (PhSe)<sub>2</sub> livre quanto nanoencapsulado. No tempo zero, observa-se uma superioridade do (PhSe)<sub>2</sub> em inibir o ácido hipocloroso em relação as nanopartículas em todas as concentrações, exceto na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , onde estatisticamente não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Após 24 horas houve um decaimento na capacidade de inibição para ambas as amostras, porém

mais acentuado para a droga livre, que em sua concentração máxima ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) passou a inibir cerca de 52%, enquanto que essa mesma concentração do fármaco encapsulado inibiu aproximadamente 62% dos agentes oxidantes, de acordo com o estudo estatístico esses valores não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Nos tempos de 48 e 72 horas, um perfil muito semelhante é observado, as nanopartículas contendo  $(\text{PhSe})_2$  demonstraram atividade semelhante ao  $(\text{PhSe})_2$  livre em todas as concentrações testadas e em 72 horas especialmente, as nanopartículas ( $5$  e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) mostraram uma atividade superior do que o próprio  $(\text{PhSe})_2$  livre ( $p < 0,05$ ). Analisando-se o experimento como um todo, observa-se um decréscimo muito acentuado na atividade antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$ , apesar de inicialmente este apresentar valores de inibição muito elevados, ao final das 72 horas essa inibição não ultrapassa 50%, esse fato provavelmente se deve a diminuição de resposta apresentada pelo  $(\text{PhSe})_2$  quando em tampão pH neutro conforme foi demonstrado no item 5.4.1. Para as nanopartículas esse decréscimo também ocorre, mas de maneira menos intensa, pois as nanopartículas tem a capacidade de protegerem o fármaco e também de o liberarem de maneira lenta e progressiva para efetuar sua ação. As nanopartículas sem o fármaco apresentaram um efeito antioxidante insignificante e nenhuma das amostras demonstrou ser mais efetiva do que o padrão utilizado como controle (quercetina), com marcante atividade antioxidante.

Através desse ensaio pode-se confirmar o poder antioxidante deste composto, além de comprovar também que o método de emulsificação evaporação do solvente não tem influência sobre o potencial antioxidante do  $(\text{PhSe})_2$ . O efeito cumulativo promovido pela liberação contínua da droga a partir das nanopartículas, associada com as vantagens farmacocinéticas das nanopartículas, faz com que a nanoencapsulação possa expandir os efeitos biológicos, que são dependentes da propriedade antioxidante. As nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  podem ser exploradas para impedir o ataque sobre os lipídeos, aminoácidos, proteínas, bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular.

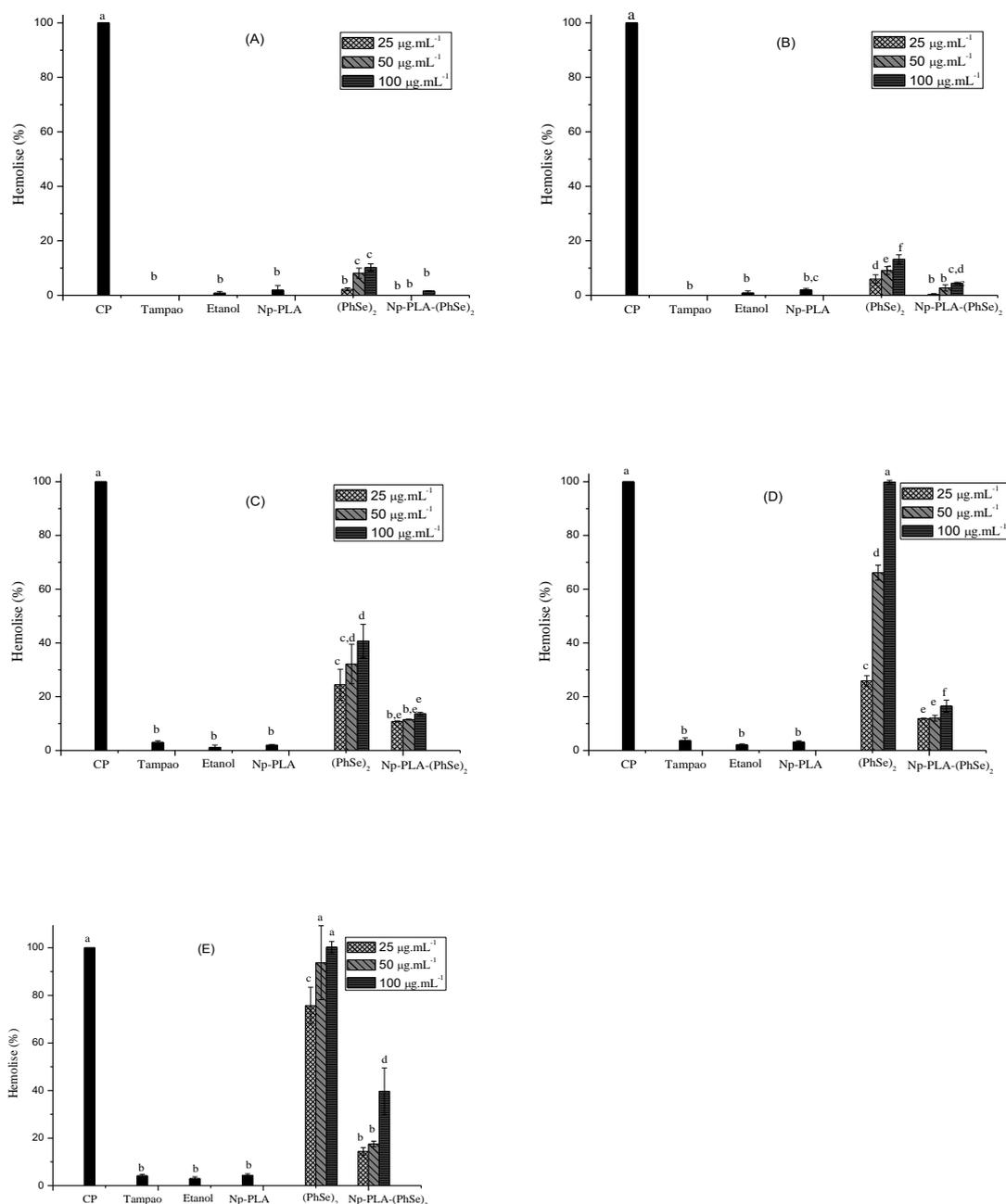
#### 5.6.2. Atividade Hemolítica das nanopartículas de $(\text{PhSe})_2$ sobre as hemácias.

Os estudos sobre o potencial terapêutico e tóxico do composto  $(\text{PhSe})_2$  apresentam dupla característica, sendo que seu comportamento é dependente da dose utilizada. Em baixas doses possui efeitos benéficos e em altas doses pode ser potencialmente tóxico

(NOGUEIRA e ROCHA, 2010). Em relação ao mecanismo de toxicidade molecular do  $(\text{PhSe})_2$ , este pode estar associado com a oxidação catalítica de importantes grupos tióis da GSH ou de diferentes proteínas ou enzimas endógenas sulfidrílicas. A inibição da atividade destas enzimas pela oxidação de grupos tióis pelo composto de  $(\text{PhSe})_2$  podem contribuir para sua toxicidade celular (KADE et al., 2009, NOGUEIRA e ROCHA, 2010).

Uma das alternativas para reduzir os danos causado por fármacos com elevada toxicidade é através de sistemas carreadores nanométricos, tais como as nanopartículas poliméricas, que são capazes de fornecer uma liberação lenta e controlada do fármaco, corroborando pra que este não atinja seus limites tóxicos (CASA et al., 2015; LASA-SARACÍBAR et al., 2014). Nesses casos é de extrema valia, a verificação do potencial hemolítico das nanopartículas, pois uma vez sendo administradas de maneira endovenosa, entrariam em contato primeiramente com os eritrócitos, que estão em maior proporção na corrente sanguínea (NAAHIDI et al., 2013). Dessa forma, o estudo de citotoxicidade sobre hemácias foi realizado a fim de verificar o efeito tóxico do  $(\text{PhSe})_2$  e das nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  sobre esse modelo. Na Figura 27 estão os resultados obtidos após 4, 8, 24, 48 e 72 h de estudo. Na Figura 27 o potencial hemolítico do  $(\text{PhSe})_2$  livre e encapsulado mostrou-se concentração-dependente e tempo-dependente, já a capacidade hemolítica do tampão, etanol e das Nps vazias foi inferior a 5% durante todos os tempos, enquanto que o controle positivo (água destilada) apresentou 100% de hemólise em todos os intervalos estudados. Analisando-se a maior concentração testada ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) é possível observar que em 4 h de incubação, o  $(\text{PhSe})_2$  livre hemolisou 10% dos eritrócitos e as nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  hemolisaram em torno de 1,6% ( $p < 0,05$ ). Após 24 horas de exposição das células com as nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  a hemólise máxima ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi cerca de 14%, já o  $(\text{PhSe})_2$  livre mostrou atividade hemolítica superior ( $p < 0,05$ ), próxima dos 41% para a mesma concentração. Com o passar do tempo o potencial hemolítico tanto do  $(\text{PhSe})_2$  livre quanto do encapsulado aumentou, porém esse aumento foi mais intenso para o  $(\text{PhSe})_2$  livre. Por fim, em 72 h, a concentração intermediária testada ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a máxima ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentaram lise de 94 e 100% dos eritrócitos. Em contrapartida as mesmas concentrações analisadas para nanopartículas, hemolisaram 18 e 40% das células ( $p < 0,05$ ).

**Figura 27.** Porcentagem de hemólise produzida pelo controle positivo (CP), tampão, etanol, nanopartículas de PLA (Np-PLA), Disseleneto de Difenila ( $(\text{PhSe})_2$ ) (25, 50 e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e nanopartículas de PLA contendo Disseleneto de Difenila (Np-PLA- $(\text{PhSe})_2$ ) (25, 50 e e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em a) 4 horas; b) 8 horas; c) 24 horas; d) 48 horas; e) 72 horas.

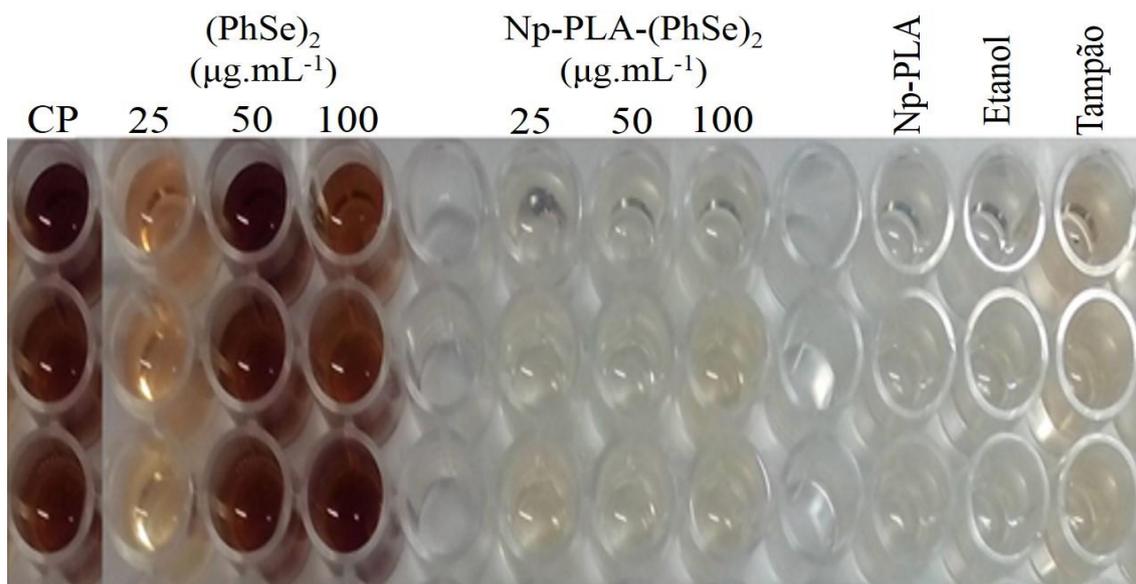


a,b,c,d,e,f Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e  $\alpha < 0,05$ )

Na Figura 28, a diferença entre a capacidade hemolítica do  $(\text{PhSe})_2$  livre e nanoencapsulado pode ser claramente observada através da tonalidade dos sobrenadantes após centrifugação. Pode-se perceber também que os sobrenadantes oriundos do tampão,

do etanol e das Nps PLA não apresentaram coloração vermelha nos sobrenadantes, o que ressalta o fato de que o padrão hemolítico está associado unicamente ao fármaco e não aos solventes utilizados. Além disso, o fato das Nps PLA não apresentarem capacidade hemolítica confirma a biocompatibilidade do polímero em questão e sua baixa toxicidade (ESSA et al., 2010).

**Figura 28.** Atividade hemolítica pela diferença de coloração do sobrenadante após a centrifugação.



O efeito tóxico do  $(\text{PhSe})_2$  relatado por pesquisadores como (NOGUEIRA e ROCHA, 2010, KADE et al., 2009) foi comprovado com esse estudo, porém as nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  mostraram uma capacidade de proteção dos eritrócitos, o que sugere que as nanopartículas podem reduzir a interação do fármaco com as células sanguíneas, possivelmente devido ao fato das nanopartículas poliméricas oferecerem como vantagem a liberação prolongada, que corrobora para que o fármaco encapsulado não atinja seus limites tóxicos. Dessa forma, este sistema nanoparticulado representa uma alternativa viável para reduzir os danos causados pelo  $(\text{PhSe})_2$  livre (SCHAFFAZICK et al., 2003, NAIR et al., 2010, BAMRUNGSAP et al., 2012).

### 5.6.3. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas de PLA contendo $(\text{PhSe})_2$ sobre linhagem tumoral B16-F10 e HEp-2

Os compostos organoselenados são agentes quimiopreventivos altamente eficazes com benefícios na redução das taxas totais de incidência e mortalidade por vários tipos

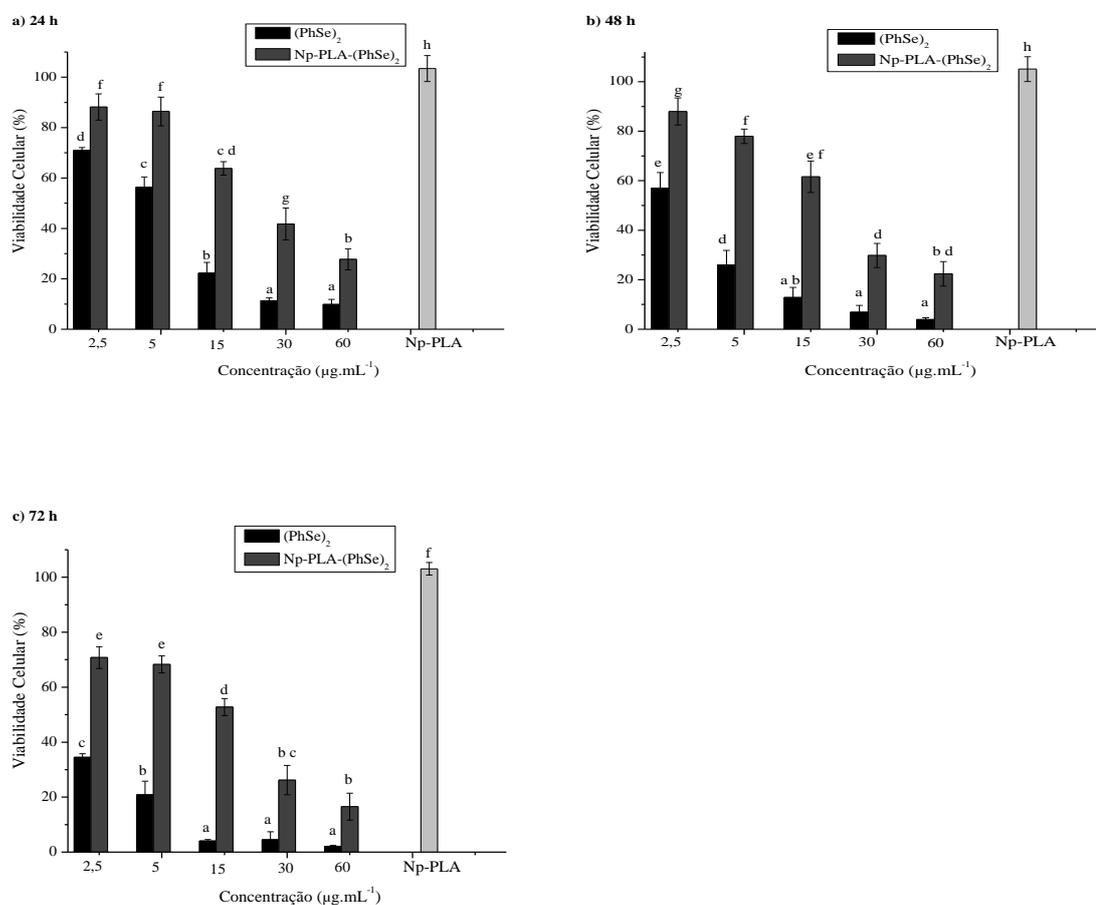
de câncer (NAITHANI, 2008; JACKSON e COMBS, 2008; KIM et al., 2010; LEE et al., 2009; BHATTACHARYA et al., 2009). Estudos têm demonstrado que  $(\text{PhSe})_2$  em concentrações adequadas pode apresentar efeitos antimutagênico e antitumoral, Rosa e colaboradores (2007) demonstraram através de sua pesquisa que o  $(\text{PhSe})_2$  em baixas concentrações, apresenta propriedades antimutagênicas, prevenindo os danos no DNA de células V79, induzidos por peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), metilmetano sulfonato e radiação UV. Barbosa e colaboradores (2008), também mostraram que a suplementação com  $(\text{PhSe})_2$  na dieta de ratos Wistar do sexo feminino foi capaz de diminuir a extensão de carcinoma mamário induzido por N-nitroso-N-metilureia.

Sabendo-se dessa importante propriedade, houve o interesse em avaliar a ação do  $(\text{PhSe})_2$  sobre o melanoma cutâneo maligno, visto que este é um dos mais perigosos cânceres de pele, além das incidências estarem aumentando mais que qualquer outro tipo de câncer. O tratamento quimioterápico apresenta resposta favorável em apenas uma minoria dos pacientes e além disso, sua capacidade de metástase faz com que poucas opções de tratamento sejam eficazes (HUNCHAREK et al., 2001; LOTZE et al., 2001; WACK et al., 2001). Em consonância, avaliou-se o potencial do  $(\text{PhSe})_2$  sobre o carcinoma laríngeo humano, tumor que ocorre predominante em homens e tem tratamento dificultado, uma vez que o mesmo desenvolve resistência a ação de várias substâncias antitumorais, entre elas, vincristina, cisplatina e 5-fluorouracil (YIN, et al., 2013; INCA, 2013). Os resultados obtidos nos estudos estão expressos em porcentagem de viabilidade celular na Figura 29 e 30, e mostram que tanto o fármaco livre quanto as nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  exibiram um efeito citotóxico concentração-dependente ou seja, a citotoxicidade é maior na medida que se aumenta as concentrações de  $(\text{PhSe})_2$ .

Em todos os tempos analisados e em ambas linhagens as Nps brancas e o solvente (metanol) demonstraram uma viabilidade celular próxima a 100%, indicando que estes não interferiam nos resultados obtidos.

A Figura 29 representa os resultados obtidos frente a linhagem B16-F10. Na Figura 29 (a), a qual representa as primeiras 24 h, as duas maiores concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  livre (60 e 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) apresentaram viabilidade celular semelhante, próximo a 10%. Enquanto isso as nanopartículas de  $(\text{PhSe})_2$  nas mesmas concentrações apresentaram viabilidade próxima a 30 e 40% respectivamente. Todas as concentrações avaliadas nesse tempo tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a Nps- $(\text{PhSe})_2$  e o  $(\text{PhSe})_2$  livre.

**Figura 29.** Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  encapsulado e não encapsulado sobre a linhagem B16-F10, em a) 24 h, b) 48 h e c) 72 h.



a,b,c,d,e,f,g Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e  $\alpha < 0,05$ )

Após 48 h de incubação (Figura 29 (b)), as três maiores concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  ( $60, 30$  e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentaram viabilidade celular inferior a 15%, mostrando-se mais citotóxicas em relação aos sistemas nanoestruturados, que apresentaram viabilidade próxima a 20, 30 e 60% respectivamente ( $p < 0,05$ ). Nas demais concentrações de nanopartículas, as células apresentaram viabilidade de cerca de 80%.

No tempo de 72 h (Figura 29 (c)), é possível observar que as células incubadas apresentaram uma taxa de viabilidade celular menor em relação aos demais tempos. As três maiores concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  ( $60; 30; 15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) demonstraram viabilidade celular estatisticamente iguais, próxima a 5%, enquanto que as nanopartículas

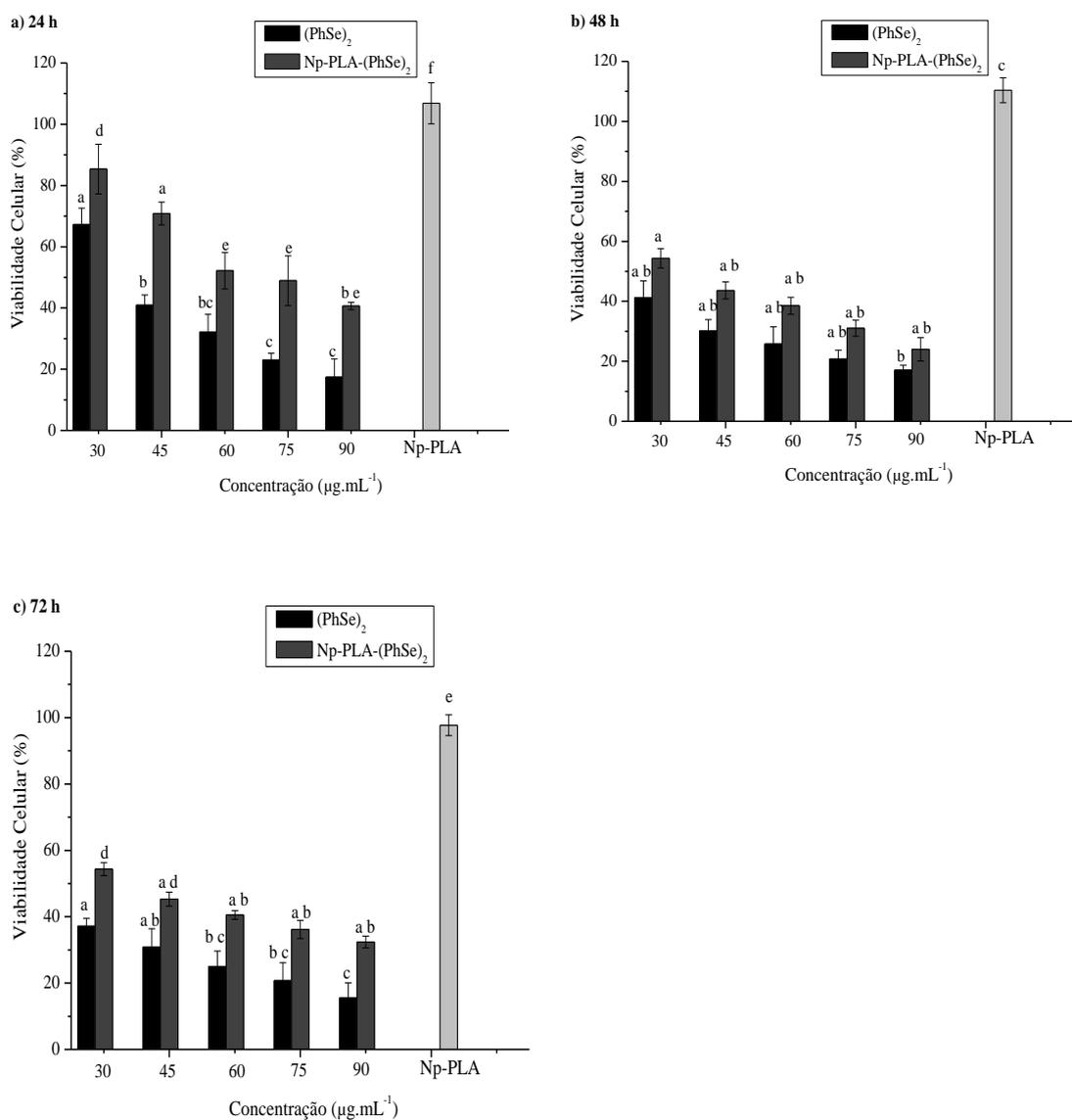
apresentaram viabilidade de 15, 25 e 60%. Nas demais concentrações testadas de Nps-(PhSe)<sub>2</sub>, os valores das viabilidades celulares foram em torno de 70 %.

Em relação à linhagem HEp-2, pode-se observar na Figura 30 (a), a qual representa as primeiras 24h, que as duas maiores concentrações de (PhSe)<sub>2</sub> livre (90, 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentaram viabilidade celular, próximo a 20%, enquanto que as nanopartículas de (PhSe)<sub>2</sub> nas mesmas concentrações apresentaram viabilidade próxima a 45%. Para a menor concentração testada (30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a viabilidade celular foi próximo a 70% e as nanopartículas contendo (PhSe)<sub>2</sub> foi em torno de 85%. De maneira geral, em todas as concentrações testadas o (PhSe)<sub>2</sub> mostrou capacidade citotóxica superior as Nps-(PhSe)<sub>2</sub>.

A partir de 48 h (Figura 30 (b)), é possível observar que as células incubadas na presença das Nps-(PhSe)<sub>2</sub> apresentaram uma taxa de viabilidade celular estatisticamente igual ( $p > 0,05$ ) aquelas incubadas com o (PhSe)<sub>2</sub> livre. Em 72 h (Figura 30 (c)) a viabilidade celular para a maior e menor concentração (90 e 30  $\mu\text{g.mL}$ ) de fármaco livre foi de 15 e 37%, enquanto que nessas mesmas concentrações, as Nps-(PhSe)<sub>2</sub> demonstraram um menor efeito citotóxico ( $p < 0,05$ ), com 32 e 54% de células viáveis. Porém nas concentrações intermediárias (75, 60 e 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a porcentagem de viabilidade celular das nanopartículas foi semelhante estatisticamente ( $p > 0,05$ ), ao do (PhSe)<sub>2</sub>, mostrando dessa maneira que as nanopartículas foram tão eficientes quanto o fármaco livre nas mesmas concentrações.

De um modo geral, as Nps-(PhSe)<sub>2</sub> apresentaram um menor percentual citotóxico em relação ao (PhSe)<sub>2</sub> livre, com exceção de 48 e 72 h na linhagem HEp-2. Esse fato pode ser explicado levando-se em consideração os resultados do ensaio de liberação *in vitro*, o qual demonstrou que somente cerca de 40% do (PhSe)<sub>2</sub> foi liberado após 72 h de estudo. Sendo assim, enquanto o (PhSe)<sub>2</sub> livre estava totalmente disponível desde o primeiro momento para interagir com as células e promover o seu efeito citotóxico, o (PhSe)<sub>2</sub> nanoencapsulado foi sendo liberado de maneira controlada e prolongada.

**Figura 30.** Porcentagem de viabilidade celular das concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  encapsulado e não encapsulado sobre a linhagem HEP-2, em a) 24 h, b) 48 h e c) 72 h



a,b,c,d,e Letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatística (ANOVA com pós-teste de Tukey e  $\alpha < 0,05$ )

Apesar das Nps liberarem lentamente o  $(\text{PhSe})_2$  e, conseqüentemente, influenciar na potencialidade das atividades *in vitro*, a estrutura nanométrica torna-se interessante ao pensarmos nas suas inúmeras vantagens *in vivo*, tais como proteção do fármaco contra degradação, aumento da biodisponibilidade, além do direcionamento passivo. Nos casos de tumores, as nanopartículas com diâmetros na faixa de 200 nm, como as obtidas neste trabalho, podem possuir facilidade de um direcionamento passivo devido principalmente ao aumento da permeabilidade e retenção (EPR) do tecido tumoral. Enquanto o endotélio

vascular normal possui fenestrações entre 5 e 10 nm, os neovasos dos tumores sólidos têm fenestrações bem maiores, entre 100 e 780 nm (HOBBS et al., 1998), portanto as nanopartículas são mais permeáveis as células tumorais, ocorrendo um maior acúmulo das nanopartículas no tumor e pouca ou nenhuma nanopartícula nos tecidos normais (PODDUTURI et al., 2013). De acordo com Oliveira e colaboradores (2012), a nanoencapsulação pode ocasionar o aumento da concentração do fármaco encapsulado nos tumores sólidos cerca de 70 vezes.

A liberação prolongada e controlada do  $(\text{PhSe})_2$  a partir das nanopartículas permite também a administração do fármaco em doses menores para produzir o mesmo efeito terapêutico que na forma farmacêutica convencional, o que pode por sua vez reduzir as oscilações do fármaco na corrente sanguínea, evitando as concentrações tóxicas e sub-terapêuticas (MEI et al., 2013)

Desse modo, os resultados obtidos são promissores, visto que o sistema nanométrico foi capaz de manter a propriedade antitumoral do  $(\text{PhSe})_2$ , demonstrando ser uma forma interessante de carrear e liberar o fármaco, minimizando as inconveniências do tratamento do câncer, reduzindo os efeitos colaterais, e podendo ainda aumentar a adesão do paciente ao tratamento.

## 6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE com detecção DAD com características de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez útil para quantificação de  $(\text{PhSe})_2$ , de acordo com as normatizações vigentes.

As nanopartículas de PLA contendo  $(\text{PhSe})_2$  foram obtidas com êxito a partir da técnica de emulsificação/evaporação do solvente, obtendo-se uma elevada eficiência de encapsulação, tamanho médio reduzido, potencial zeta distante da neutralidade e negativo, o que teoricamente garante estabilidade físico-química. Além disso, as análises de infravermelho, difração de Raios X, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria garantiram que o processo de nanoencapsulação promoveu amorfização do fármaco e interação do  $(\text{PhSe})_2$  com a matriz polimérica.

O estudo de estabilidade demonstrou que as nanopartículas em suspensão não apresentaram boa estabilidade, porém em contrapartida, após o processo de liofilização, estas mostraram-se estáveis durante 3 meses tanto em temperatura ambiente, quanto refrigeradas ou congeladas.

Além disso, no estudo de liberação *in vitro* ao final das 192 horas cerca de 61% do  $(\text{PhSe})_2$  encapsulado foi liberado, indicando que a formulação foi capaz de prolongar a liberação do organoselenado e conseqüentemente poderá reduzir efeitos adversos e tóxicos, além de diminuir os números de doses e facilitar a adesão do paciente ao tratamento mantendo o efeito terapêutico desejado.

As Nps- $(\text{PhSe})_2$  foram avaliadas quanto a capacidade de inativação do ácido hipocloroso (HOCl) e demonstraram um perfil de inibição concentração-dependente além de demonstrarem atividade semelhante ou superior ao  $(\text{PhSe})_2$  livre em todas as concentrações testadas a partir de 48h de estudo.

No teste de citotoxicidade frente a eritrócitos, o efeito tóxico do  $(\text{PhSe})_2$  foi comprovado, entretanto as Nps- $(\text{PhSe})_2$  mostraram-se menos tóxicas em relação ao fármaco na forma livre.

A avaliação da atividade citotóxica do  $(\text{PhSe})_2$  livre e nanoencapsulado sobre linhagem celular B16-F10 e HEP-2 demonstrou que as Nps mantiveram a ação antitumoral do fármaco, e frente a linhagem HEP-2 foram tão eficientes quando o  $(\text{PhSe})_2$  livre após 48 h de incubação.

Em resumo, com os resultados obtidos pode-se concluir que o sistema produzido possui características físico-químicas e biológicas adequadas para carregamento do

(PhSe)<sub>2</sub>, podendo ser aplicado como potencial sistema de liberação prolongada, reduzindo efeitos adversos tal como a toxicidade sobre hemácias, e mantendo o potencial antioxidante e antitumoral.

**REFERÊNCIAS**

ABDOU, H. M. **Dissolución, bioavailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989. p. 554.

ACTIS, G. C.; VOLPES, R.; RIZZETTO, M. Oral microemulsion cyclosporin to reduce steroids rapidly in chronic active ulcerative colitis. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 905-908, 1999.

ADAMS, G. D. J. Freeze-Drying of biological materials. **Drying Technology: An International Journal**, v. 9, n. 4, p. 891-925, 1991.

ALLEN, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 13, n. 3, p. 285-309, 1994.

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 05-24, 1997.

ANDRADE, F. C. D. **Hidrocalcogenação de derivados de álcoois propargílicos mediados por Calcogenolatos de zinco**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia- GO.

ANDRANDE, J. E. **Medidas de Tamanho e Potencial Zeta de nanopartículas utilizando Espalhamento de Luz**, Universidade Federal do Sergipe, 2008.

ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends in Biotechnology**, v.17, p. 409-421, 1999.

ANTÔNIO, E.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Bovine Serum Albumin Nanoparticles Containing Quercetin: Characterization and Antioxidant Activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.16, n. 2, p. 1346-1353, 2016.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE 889 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília: 02 de julho de 2003.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; CELIK, S. E.; BEKTASOGLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-1547, 2007.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1484-1490, 2007.

ARAUJO, J.; VEJA, E.; LOPES, C.; EGEEA, M. A.; GARCIA, M. L.; SOUTO, E. B. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 48-56, 2009.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental toxicology and Pharmacology**, v. 10, n.4, p.153-158, 2001.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58–63, 2010.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p. 1253-1271, 2012.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; SOARES, J. C. M.; WONDRACEK, D. C.; GONÇALVES, J. F.; SCHETINGER, M. R. C.; NOGUEIRA, C. W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ—induced toxicity. **Food and Chemical toxicology**, v. 46, n.1, p.186-194, 2008.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; WONDRACEK, D. C.; PEROTTONI, J.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl Diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chemistry Biology Interaction**, v. 163, n. 3, p. 230-238, 2006.

BARKAI, A.; PATHAK, Y. V.; BENITA, S. Polyacrylate (Eudragit Retard) Microspheres for Oral Controlled Release of Nifedipine. I. Formulation Design and Process Optimization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 16, n. 13, p. 2057-2075, 1990.

BARRAT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 1, p. 21-37, 2003.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p.163-171, 2000.

BARWAL, I.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SINGH, B.; YADAV, S. C. Development of stevioside Pluronic-F-68 copolymer based PLA-nanoparticles as an antidiabetic nanomedicine. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 101, n. 1, p. 510-516, 2013.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 167-179, 2007.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.173, p.1143-1149, 1990.

BENOIT, J. P.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J.P.; FESSI, H.; PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Les formes «vectorisées» ou a «distribution modulle», nouveaux systemes d'administration des medicaments. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 41, n. 5, p. 319-329, 1986.

BEYERLEIN, K. R.; SOLLA-GULLÓN, J.; HERRERO, E.; PAILLOUX, F.; LEONI, M.; SCARDI, P.; SNYDER, R. L.; ALDAZ, A.; FELIU, J. M. Characterization of (1 1 1) surface tailored Pt nanoparticles by electrochemistry and X-ray powder diffraction. **Materials Science and Engineering: A**, v. 528, n. 1, p. 83-90, 2010.

BORGES, L. P.; BORGES, V. C.; MORO, A. V.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T.; ZENI G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, v. 210, p. 1-8, 2005.

BORGES, L. P.; BRANDÃO, R.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cádmium-induced liver damage in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 15-25, 2008.

BORGES, L. P.; NOGUEIRA, C. W.; PANATIERI, R. B.; ROCHA, J. B.; ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 2, p. 99-107, 2006.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Tipos de câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>. Acesso em 01 de agosto de 2015.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 116, p. 1-9, 1995.

BRITAIN, H. G. Generation of Polymorphs, Hydrates, Solvates, and Amorphous Solids. In: **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, 1999. v. 95, cap. 5, p.183-225.

BURGER, M.; FACHINETTO, R.; CALEGARI, L.; PAIXAO, M. W.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin**, v. 64, n. 4, p. 339-345, 2004.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530 -536, 1996.

CASA, D. M.; CARRARO, T. C. M. M.; CAMARGO, L. E. A.; DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Poly(L-lactide) Nanoparticles reduce Amphotericin B cytotoxicity and maintain its in vitro antifungal activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 848-854, 2015.

CHANTEPIE, S.; MALLE, E.; SATTLER, W.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Distinct HDL subclasses present similar intrinsic susceptibility to oxidation by HOCl. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 487, n. 1, p. 28-35, 2009.

COLOMÉ, L. M. **Micropartículas contendo pantoprazol sódico: preparação, caracterização físico-química e avaliação anti-ulcerativa in vivo e da absorção intestinal ex vivo**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS

COMASSETO, J. Vinylic selenides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 253, p. 131-181, 1983.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCARLAT, J. P.; LANCASTER, C.; MARCELLO, J.; MARKS, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L. Formulation and Intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 10, p.1385-1390, 1994.

CONSTANTINIDES, P. P.; WELZEL, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L.; STURGIS, S.; YIV, S. H.; OWEN, A. B. Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids/salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 210-215, 1996.

CÓTICA, L. F.; FREITAS, V. F.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; VENDRAME, S. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M.; STARUCH, M.; JAIN, M. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 4, p. 559-563, 2012.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M.; ALMEIDA, L. M.; CUSTODIO, J. B. A. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. **Toxicology in vitro**, v. 15, n. 6, p. 615-622, 2001.

CRUZ SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M.; ALMEIDA, L. M.; CUSTODIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1464, n. 1, p. 49-61, 2000.

CUKIERMAN, E.; KHAN, D. R. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 762-770, 2010.

DE BEM, A. F.; FARINA, M.; PORTELLA, R. L.; NOGUEIRA, C. W.; TERESA, C. P.; LARANJINHA, J. A. N.; ALMEIDA, L. M.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 201, p. 92-100, 2008.

DE BEM, A. F.; PORTELLA R. L.; PEROTHONI, J.; BECKER, E.; BOHRER; PAIXÃO, M. W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. **Chemico-Biological Interactions**, v. 162, n. 1, p. 1- 10, 2006.

DE BEM, A. F.; PORTELLA, R. L.; COLPO, E.; DUARTE, M. M. M.; FREDIANE, A.; TAUBE, P. S.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M.; SILVA, E. L.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl Diselenide Decreases Serum Levels of Total Cholesterol and Tissue Oxidative Stress in Cholesterol-fed Rabbits. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 105, p. 17-23, 2009.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DESGOUILLES, S.; VAUTHIER, C.; BAZILE, D.; VACUS, J. The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. **Langmuir**, v. 19, p. 9504-9510, 2003.

DEVASAGAYAM, T. P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

DHINGRA, S.; BANSAL, M. P. Hypercholesterolemia and apolipoprotein B expression: regulation by selenium status. **Lipids in Health and Disease**, v.4, p. 28, 2006.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions: A Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 22, n. 2, p. 234-246, 2009.

DILNAWAZ, F. Nanotechnology and Drug Delivery. In: SATTER, K. D. (Ed) **Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics**. CRC Press, p. 27- 1-27-19, 2010.

DONG, Y.D.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 101-111, 2011.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 1304-1343, 2006.

DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 1468-1477, 2005.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 96-106, 2010.

FAZIL, M.; MD, S.; HAQUE, S.; KUMAR, M.; BABOOTA, S.; SAHNI, J.; ALI, J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 6-15, 2012.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews**, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.

FORD, J. L.; MANN, T. E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 422–430, 2012.

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 3, p. 221-229, 1998.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P. M. Pefloxacin mesilate and ofloxacin loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.84, n.7, p.895-902, 1995.

GANEA, G. M.; SABLIOV, C. M.; ISHOLA, A. O.; FAKAYODE, S. O.; WARNER, I. M. Experimental design and multivariate analysis for optimizing poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticle synthesis using molecular micelles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 280-292, 2008.

GHISLENI, G.; KAZLAUCKAS, V.; BOTH, F. L.; PAGNUSSAT, N.; IORRANZZA, S.; ROCHA, J. B. T.; SOUZA, D. O.; PORCIÚNCULA, L. O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1508-1515, 2008.

GHISLENI, G.; PORCIUNCULA, L. O.; CIMAROSTI, H.; BATISTA, T. R. J.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. **Brain research**, v. 986, n. 1-2, p. 196-199, 2003.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica – parte II. **Cerâmica**, v. 34, n. 225, p.163-164, 1988.

GIORDANI, C. F. A.; SOUZA, D.; DORNELLES, L.; NOGUEIRA, C. W.; ALVES, M. P.; PRIGOL, M.; RODRIGUES, O. E. D. Diphenyl Diselenide-Loaded Nanocapsules: Preparation and Biological Distribution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 755–766, 2014.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA–PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, n.1, p. 95-110, 2000.

GRASSI, M.; GRASSI, G. Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 97-116, 2005.

GULLORY, J. K. Generation of Polymorphs, Hydrates, Solvates, and Amorphous Solids. In: BRITAIN, H.G. **Polymorphism in Pharmaceutical**. New York: Marcel Dekker, 1999.

GUPTA, R. B.; KOMPPELLA, U. B. **Nanoparticles Technology for Drug Delivery**. New York: Taylor & Francis, 2006.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, n. 4, p. 319–327, 2002.

HARRISON, M. A.; RAE, I. F. **General techniques of cell culture**. New York: Cambridge University Press. p. 162, 1997.

HATLEY, R. H. M.; FRANKS, F. Applications of DSC in the development of improved freeze-drying processes for labile biologicals. **Journal of Thermal Analysis**, v. 37, n. 8, p. 1905-1914. 1991.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J-E.; BENOIT, J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, 2003.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review of Biochemistry**, v.54, p.237-271, 1985.

HUANG, K.; LIU, H.; CHEN, Z.; XU, H. Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats. **Atherosclerosis**, v.162, n.1, p.137-144, 2002.

HUSSEN, S. S.; SHENOY, P.; KRISHNA, M. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for tenofovir nanoparticle formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 245-248, 2013.

HUTTUNEN, J. K. Selenium and cardiovascular diseases--an update. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.10, n. 2-3, p. 220-226, 1997.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2B – validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

INEU, R. P.; PEREIRA, M. E.; ASCHNER, C. W.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T.; ZENI G. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3023-3029, 2008.

IONASHIRO, M. A.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v.26, n.121, p.17-24, 1980.

JAHANSHAH, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4926-4934, 2008.

JAIN, K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, v. 1, p. 37-54, 2005.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

JAIN, S.; HIRST, D. G.; O'SULLIVAN, J. M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. **The British Journal of Radiology**, v. 85, n. 1010, p. 101-113, 2012.

JERLICH, A.; FRITZ, G.; KHARRAZI, H.; HAMMEL, M.; TSCHABUSCHING, S.; GLATTER, O.; SCHAUR, J. R. Comparison of HOCl traps with myeloperoxidase inhibitors in prevention of low density lipoprotein oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1481, n. 1, p. 109-118, 2000.

KADE, I. J.; BORGES, V. C.; SAVEGNAGO, L.; IBUKUN, E. O.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 25, p. 415-424, 2009.

KANAKUBO, Y.; ITO, F.; MURAKAMI, Y. Novel one-pot facile technique for preparing nanoparticles modified with hydrophilic polymers on the surface via block polymer-assisted emulsification/evaporation process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p. 85-91, 2010.

KANDA, T.; ENGMAN, L.; COTGREAVE, I. A. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 8161-8169, 1999.

KARAM, T. K. **Obtenção, Caracterização físico-química e Avaliação biológica de nanopartículas de blendas de PLA-PEG contendo Álcool Perílico**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava - PR.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2005.

KHULLAR, M.; AL-SHUDIEFAT, A.A.; LUDKE, A.; BINEPAL, G.; SINGAL, P.K. Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 233–240, 2010.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsion as colloidal drug carries for intravenous administration. In: (Ed.). **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Harwood academic publishers, 1998. p. 119-146.

KONAN, Y.; KONAN, N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 239-252, 2002.

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

KÜRTI, L.; KUKOVECZ, A.; KOZMA, G.; MÁRIA, R. A.; DELI, A.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. **Powder Technology**, v. 212, n. 1, p. 210-217, 2011.

LACOULONCHE, F.; GAMISANS, F.; CHAUVET, A.; GARCIA, M. L.; ESPINA, M.; EGEA, M. A Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly-epsilon-caprolactone nanospheres. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 25, n. 9, p. 983-993, 1999.

LANGNER, M; UGORSKI, M. The macromolecular aggregate as a drug carrier. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 5, n. 4, p. 433-440, 2000.

LARA, V. C. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne**. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG.

LASA-SARACÍBAR, B.; AZNAR, M. A.; LANA, H.; AIZPÚN, I.; GIL, A. G.; BLANCO-PRIETO, M. J. Lipid nanoparticles protect from edelfosine toxicity *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1-2, p.1-5, 2014.

LE HIR, A. **Pharmacie Galenique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments**. 7 ed. Masson: Paris, 1997.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. **S.T.P. Pharma sciences**, v. 9, n.5. p. 411-418, 1999.

LEVANDER, O.A.; BURK, R.F. Selenium. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 242-251, 1994.

LI, S. D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496-504, 2008.

LIECHTY, W. B.; PEPPAS, N. A. Expert Opinion: Responsive polymer nanoparticles in câncer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 241-246, 2012.

LINDNER, G. R. **Desenvolvimento De Nanopartículas Poliméricas Contendo Resveratrol e Avaliação da Ação Neuroprotetora sobre um Modelo Experimental de Doença de Parkinson**. 2014. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava - PR.

LIU , H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v.28, n. 2, p.354-369, 2007.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LUCHESE, C.; PINTON, S.; NOGUEIRA, C. W. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. **Pharmacology Research**, v. 59, p.194-201, 2009.

MÄDER K.; MEHNERT W. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, p. 165-196, 2001.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara – SP.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; ENVAGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, p. 523 – 530, 2006.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 376-399, 2002.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MARTIN, J.L.; GERLACK, M.L. Selenium metabolism in animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 192, p.193-199, 1972.

MARTINS, I. M.; BARREIRO, M. F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 245, p. 191-200, 2014.

MEI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, L.; HUANG, L.; YANG, X. L.; TANG, J.; FENG, S. S. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, p. 880–890, 2013.

MENEZES, P. F. C.; BAGNATO, V. S.; JOHNKE, R. M.; BONNERUP, C.; SIBATA, C. H.; ALLISON, R. R.; PERUSSI, J. R. Photodynamic therapy for Photogem and Photofrin using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 7, p. 546-551, 2007.

MEOTTI, F. C.; STANGHERLIN, E. C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**, v. 94, n. 3, p. 276-282, 2004.

MEYDANI, M. Modulation of the platelet thromboxane A2 and aortic prostacyclin synthesis by dietary selenium and vitamin E. **Biological Trace Element Research**, v.33, p.79-86, 1992.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 5, p. 875-910, 2012.

MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; CHACÓN, M.; BERGES, L.; GUZMÁN, M. Stability of cyclosporine-loaded poly-sigma-caprolactone nanoparticles. **Journal Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 777-787, 1997.

MORA-HUERTAS, C. E. FESSI, H. ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p.113–142, 2010.

MORRIS, J. C. The acid ionization constant of hypochlorous acid from 5 to 35°C. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 3798-3805, 1966.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D, L- Lactide) Nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on Physicochemical and Structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p.614-626, 2000.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**. São Paulo: ieditora, 300 p, 2002.

MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 343-347, 2000.

MULLER, C. R; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA, F. L.; PESCE, S. N.; DALLA, C. T.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres preparation and physicochemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 11, p.864-867, 2001.

MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; AWASHIMA, Y. Utilization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for preparation of mini-depot tablets by direct compression. **Journal of Controlled Release**, v. 67, n. 1, p. 29-36, 2000.

NAAHIDI, S.; JAFARRI, M.; EDALAT, F.; RAYMOND, K.; KHADEMHOSEINI, A.; CHEN, P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 182-194, 2013.

NAHAR, M.; MISHRA, D.; DUBEY, V.; JAIN, N. K. Development, characterization and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 4, n. 3, p. 252-261, 2008.

NAIR, H. B.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Delivery of anti-inflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1833-1843, 2010.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 9-25, 2007.

- NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Science of the total Environment**, v. 249, n. 1, p. 347-371, 2000.
- NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do poli (D,L-lático) e copolímeros diblocos do poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 504-511, 2005.
- NETO, M. B. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.
- NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p.177-187, 2013.
- NOGUEIRA, C. W.; BORGES, L. P.; SOUZA, A. C. G. Oral administration of diphenyl diselenide potentiates hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, p. 156-164, 2009.
- NOGUEIRA, C. W.; MEOTTI, F. C.; CURTE, E.; PILISSAO, C.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v.183, n.1-3, p.29-37, 2003.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2055-2071, 2010.
- NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemistry Review**, v. 104, n. 12, p. 6255-6286, 2004.
- OLIVEIRA, C.O.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, p. 695-701, 2012.
- OLIVIER, J. C. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, n. 1, p. 108-119, 2005.
- PAINO, I. M. M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; KANEGAE, M. P. P.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I. L. Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 543-551, 2005.
- PAPADIMITRIOU, S.; BIKIARIS, D.; AVGOUSTAKIS, K.; KARAVAS, E.; GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 44-54, 2008.
- PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. **Molecules**, v. 10, n. 1 p. 146- 161, 2005.

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Progress in Drug Research**, v. 36, p. 9-47, 1991.

PARVEEN, R.; BABOOTA, S.; ALI, J.; AHUJA, A.; VASUDEV, S. S.; AHMAD, S. Oil based nanocarrier for improved oral delivery of silymarin: In vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, p. 245-253, 2011.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PATEL, S.K.; WONG, A.L.; CUEVAS, M.; HORN, H. V. Parenting stress and neurocognitive late effects in childhood cancer survivors. **Psychooncology**, v. 22, n.8, p. 1774-1782, 2012.

PAULMIER, C. **Selenium reagents and intermediates**. Organic Synthesis, Oxford: Pergamon, 1986.

PEEK, L. J.; MIDDAUGH, C. R.; BERKLAND, C. Nanotechnology in vaccine delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 8, p. 915-928, 2008.

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico Preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 198-205, 2006.

PINA, K. V.; PINTO, L. R.; MORATORI, R. B.; SOUZA, C. G.; BARBASTEFANO, R. G. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estudo da arte, perspectivas de inovações e investimentos. **Revista Gestão industrial**, v. 02, n. 2, p. 115-125, 2006.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V., MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 4-5, p. 305–312, 2002.

PRIGOL, M.; BRUNING, C. A.; GODOI, B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. M. Trifluoromethyl-diphenyl diselenide attenuates pentylenetetrazole-induced seizures in mice by inhibiting GABA uptake in cerebral cortex slices. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 1127-1133, 2009b.

PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, n. 4, p. 216-222, 2009a.

PRIGOL, M.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; BRONZE, M. R.; CONSTANTINO, L. In vitro metabolism of diphenyl diselenide in rat liver fractions. Conjugation with GSH and binding to thiol groups. **Chemico-Biological Interactions**, v. 200, n. 2-3, p. 65–72, 2012.

PRIGOL, M.; PINTON, S; SHUMACHER, R.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Convulsant action of diphenyl diselenide in rat pups: measurement and correlation with plasma, liver and brain levels of compound. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 373-378, 2010.

PRIGOL, M.; WILHELM, E.A.; STANGHERLIN, E.C.; BARANCELLI, D.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups: Possible interaction with glutamatergic system. **Neurochemical Research**, v.33, n.6, p.996-1004, 2008.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. Polymeric Micro and Nanoparticles as Drug Carriers. In: DUMITRIU, S. **Polymeric Biomaterials**. New York: Marcel Dekker, 1994, cap. 16.

QU, X.; HUANG, K.; DENG, L.; XU, H. Selenium deficiency-induced alterations in the vascular system of the rat. **Biological Trace Element Research**, v.75, n. 1-3, p. 119-128, 2000.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D, L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, n. 1, p. 107-119, 1998.

RAMADAN, S.; RAZAK, A. A.; RAGAB, A. M. Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. **Biological Trace Element Research**, v. 20, p. 225-232, 1989.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **The Lancet**, v. 356, p. 233-241, 2000.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, n.8, p. 1109-1143, 2005.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; VEIGA, A. J. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 36-40, 2012.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; BOHATCH, M. JR.; FARAGO, P.V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and EngineeringC**, v. 31, n. 5, p. 962-968, 2011.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37-42, 1987.

ROLLOT, J. M.; COUVREUR, P.; ROBLOT-TREUPEL, L.; PUISIEUX, F. Physicochemical and morphological characterization of polysobutyl cyanoacrylate nanocapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, p.361-364, 1986.

ROSA, R. M.; ROESLER, R.; BRAGA, A. L.; SAFFI, J.; HENRIQUES J. A. P. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 10, p. 1287-1304, 2007.

ROSSATO, J. I.; KETZER, L. A.; CENTURIAO, F. B.; SILVA, S. J.; LUDTKE, D. S.; ZENI, G.; BRAGA, A. L.; RUBIN, M. A.; ROCHA, J. B. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 4, p. 297-303, 2002.

SAEZ, A.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design a review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.

SANMARTIN, C.; PLANO, D., FONT, M.; PALOP, J.A. Selenium and clinical trials: new therapeutic evidence for multiple diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4635-4650, 2011.

SANTOS, F. W.; ORO, T.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; NASCIMENTO, P. C.; NOGUEIRA, C. W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 255-263, 2004.

SANTOS, F. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B.; WEIS, S. N.; FACHINETTO, J. M.; FAVERO, A.M.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. **Chemico Biological Interactions**, v. 151, p. 159-165, 2005.

SARTORI, T. **Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C. R.; PINTO, L. G.; ROCHA, J. B.; BARANCELLI, D. A.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 88, n. 4, p. 418-426, 2008.

SAVEGNAGO, L.; PINTO, L. G.; ROCHA, J. B.; BARANCELLI, D. A.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n. 2-3, p. 129-138, 2007.

SAVEGNAGO, L.; TREVISAN, M.; ALVES, D.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environmental toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 86-92, 2006.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo Diclofenaco. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHMIDT, C.; BODMEIER, R. Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 115-125, 1999.

SCHWARTZ, K.; CALVIN, M.; FOLTZ, P. J. Selenium as an integral part of facto 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal American Chemistry Society**, v. 79, p. 200-214, 1957.

SEJU, U.; KUMAR, A.; SAWANT, K. K. Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 12, p. 4169-4176, 2011.

SENNA, M.; NAKAYAMA, S. Preparation and properties of nano-amorphous organic and inorganic particles via chemical and mechanochemical routes. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 483, n. 1-2, p. 265-270, 2009.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, 2001.

SILVA, A. C.; SANTOS, D.; FERREIRA, D. C.; SOUTO, E. B. **Advances in nanoparticulate carriers for oral delivery of peptides and proteins: polymeric versus lipid nanoparticles**. in: Encyclopaedia of Nanoscience and Nanotechnology, H.S. Nalwa (ed.), Los Angeles, 2010.

SILVA, K.; ALVES, L.; SOARES, M.; PASSOS, R.; FARIA, A.; ROLIM-NETO, P. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, 129-135, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, p. 215-223, 2009.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

STADTMAN, T.C. Selenium-dependent enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 93-110, 1980.

STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 12, p. 1604 - 1607, 1998.

SUTARIYA, V.; WEHRUNG, D.; GELDENHUYS, W. J. Development and validation of a novel RP-HPLC method for the analysis of reduced glutathione. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 3, p. 271-276, 2012.

SUZUKI, K.T.; SOMEKAWA, L.; SUZUKI, N. Distribution and reuse of <sup>76</sup>Se-selenoaçúcar in selenium-deficient rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 216, p.303 – 308, 2006.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

THOMAS, C. B.; BURG, K. J. L. Tissue Engineering Systems. In: SHALABY, W. S.; BURG, K. J. L. **Absorbable and Biodegradable Polymers**. Florida: CRC Press LLC, 2004.

THOMAS, J.P.; GEIGER, P.G.; GIROTTI, A.W. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions. **The Journal of Lipid Research**, v.34, p.479-490, 1993.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, n. 5432, p. 1393-1396, 1999.

VALENTINE, J.L.; KANG, H.K.; SPIVEY, G.H. Selenium levels in human blood, urine and hair in response to exposure via drinking water. **Environmental Research**, v.17, p.347-355, 1978.

VANDERHOFF, J. W.; EL ASSER, M. S.; UGELSTAD, J. **Polymer emulsification process**. US Patent 4 177 177, 4 dez. 1979.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VICENTI, J. R. M. **Síntese e análise estrutural de novos polímeros de coordenação envolvendo seleninatos de metais alcalinos e alcalinos terrosos**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

VLACK, V. H. L. Arranjos Atômicos. In: **Princípios de Ciência dos Materiais**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1970. cap.3, p. 45-75.

WARGAFTIG, T. N. **Desenvolvimento de microemulsões lipídicas estabilizadas com fosfatidilcolina de soja para veiculação de vacina de DNA contra tuberculose**. 2001. 167f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara - SP.

WHANGER, P.D.; PEDERSEN, N.D.; HATFIELD, J.; WESWING, P.H. Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.153, p.295- 295, 1976.

WILBER, C.G. Toxicology of selenium: a review. **Clinical Toxicology**, v.17, p.171-230, 1980

WILSON, S. R.; ZUCKER, P. A.; HUANG, R. R. C.; SPECTOR, A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **Journal of the American Chemical Society**, v.111, p.5936-5939, 1989.

WINGLER, K.; BRIGELIUS-FLOHÈ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. **Biofactors**, v.10, p.245-249, 1999.

WIRTH, T. **Organoselenium Chemistry: Modern Developments in Organic Synthesis**. Berlin: Springer Berlin / Heidelberg, p. 272, 2000.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456–469, 2011.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p.112–115, 2008.

XU, X.; XIANG, Q.; HE, Z.; LIU, Y.; ZHOU, D.; QIN, X.; FAN, T.; ZHANG, Z.; HUANG, Y. Crystalline Drug Aconitine-loaded Poly(d,l-Lactide-CoGlycolide) Nanoparticles: Preparation and in Vitro Release. **Yakugaku Zasshi**, v. 130, n. 3, p. 409-418, 2010.

YIN, W.; WANG, P.; WANG, X.; SONG, W.; CUI, X.; YU, H.; ZHU, W. Identification of microRNAs and mRNAs associated with multidrug resistance of human laryngeal cancer HEP-2 cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 546-554, 2013.

YOO, J-W.; DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S. Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 14-15, p. 1247-1256, 2011.

YOSHIZUMI, M.; FUJITA, Y.; IZAWA, I.; SUZAKI, Y.; KYAW, M.; ALI N.; TSUCHIYA, K.; KAGAMI, S.; YANO, S.; SONE, S.; TAMAKI, T. Ebselen inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced c-Jun N-terminal kinase activation and adhesion molecule expression in endothelial cells. **Experimental Cell Research**, v.292, n. 1, p.1-10, 2004.

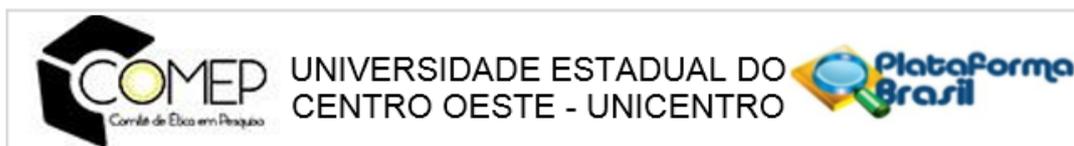
YOSHIZUMI, M.; KOGAME, T.; SUZAKI, Y.; FUJITA, Y.; KYAW, M.; KIRIMA, K.; ISHIZAWA, K.; TSUCHIYA, K.; KAGAMI, S.; TAMAKI, T. Ebselen attenuates oxidative

stress-induced apoptosis via the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1 signalling pathway in PC12 cells. **British Journal of Pharmacology**, v.136, n. 7, p.1023-1032, 2002.

ZENG, H.; COMBS, G.F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **Journal Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2008.

## ANEXO A

## Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE ÁCIDO URSÓLICO E DE DISSELENETO DE DIFENILA.

**Pesquisador:** Emilli Antônio Área

**Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 46433715.6.0000.0106

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.174.406

**Data da Relatoria:** 04/08/2015

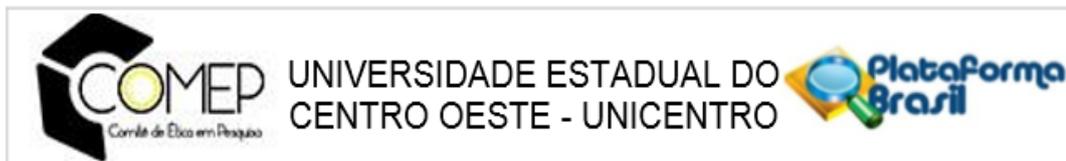
**Apresentação do Projeto:**

Trata-se da apreciação do projeto de pesquisa intitulado AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE ÁCIDO URSÓLICO E DE DISSELENETO DE DIFENILA, de interesse e responsabilidade do(a) proponente Emilli Antônio. A pesquisa pretende associar ÁCIDO URSÓLICO E DE DISSELENETO DE DIFENILA com as nanopartículas e espera-se que ocorra redução da citotoxicidade sobre outras células não tumorais. Acredita-se que as nanopartículas possam desempenhar um atividade protetora sobre as hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN). Avaliação da citotoxicidade in vitro sobre hemácias: Serão coletados 10 mL de sangue total de três indivíduos voluntários sadios adultos, na região da fossa antecubital, em tubo de ensaio contendo 10µL de heparina, no laboratório de nanotecnologia. Esses indivíduos serão abordados e convidados a participar do estudo no próprio laboratório de nanotecnologia, dias antes de realizar a coleta. Os voluntários que aceitarem participar assinarão o TCLE e receberão todas as orientações incluindo a data que deverão retornar para coleta do sangue. A coleta será realizada com materiais descartáveis, pela pesquisadora responsável, que possui graduação em farmácia.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste estudo, que faz parte de um projeto de pós-graduação, é desenvolver um sistema nanoestruturado polimérico capaz de carrear o AU e (PhSe)<sub>2</sub>, com finalidade de reduzir a

|                  |   |                   |                              |
|------------------|---|-------------------|------------------------------|
| <b>Endereço:</b> | Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição) |                   |                              |
| <b>Bairro:</b>   | Vila Carli  | <b>CEP:</b>       | 85.040-080                   |
| <b>UF:</b>       | PR  | <b>Município:</b> | GUARAPUAVA                   |
| <b>Telefone:</b> | (42)3629-8177   | <b>Fax:</b>       | (42)3629-8100                |
|                  |   | <b>E-mail:</b>    | comep_unicentro@yahoo.com.br |



Continuação do Parecer: 1.174.406

Página 01 de

toxicidade sobre hemácias e leucócitos polimorfonucleares (LPMN).

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

Os riscos que podem ocorrer é em relação à contaminação de possíveis doenças transmissíveis por sangue ao coletor, mas utilizando-se de maneira adequada as técnicas de biossegurança, as chances de contaminação serão menores. Para o paciente, há riscos físicos e psicológicos (pela perfuração da fossa antecubital com agulha para a coleta de sangue) como hematomas, dor, lesão de nervos, medo, ansiedade, porém os riscos deste se justificam pelo benefício esperado da pesquisa, e serão minimizados pela permanência do braço esticado, sem dobrar, assim como compressas com gelo no local da coleta, que reduzirão o surgimento de manchas avermelhadas e roxas. No caso da formação de hematomas, abscesso cutâneo ou qualquer dano decorrente da pesquisa, o pesquisador se responsabiliza pela assistência integral, imediata e gratuita.

##### **Benefícios:**

O desenvolvimento de nanopartículas de AU e de (PhSe)<sub>2</sub> é benéfico, pois pode ser capaz de reduzir os efeitos tóxicos dos fármacos sobre as células normais

##### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante, uma vez que serão investigadas a redução da citotoxicidade dos quimioterápicos sobre células não tumorais pela utilização da nanotecnologia.

Apresenta como critérios de inclusão: Pacientes saudáveis e adultos Não apresenta critérios de exclusão.

##### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

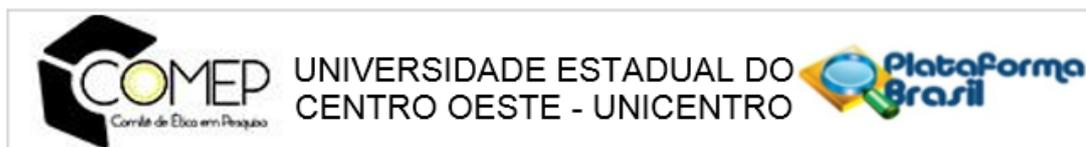
(1) Folha de rosto: adequada

(2) Carta de anuência: adequada

(3) TCLE: adequado

(4) Cronograma: anexado

|                  |   |             |               |
|------------------|---|-------------|---------------|
| <b>Endereço:</b> | Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição) |             |               |
| <b>Bairro:</b>   | Vila Carli  | <b>CEP:</b> | 85.040-080    |
| <b>UF: PR</b>    | <b>Município:</b>   | GUARAPUAVA  |               |
| <b>Telefone:</b> | (42)3629-8177   | <b>Fax:</b> | (42)3629-8100 |
|                  | <b>E-mail:</b> comep_unicentro@yahoo.com.br   |             |               |



Continuação do Parecer: 1.174.408  
(5) Orçamento: anexado

Página 02 de

(6) Projeto completo: anexado

(7) Instrumento para coleta dos dados: não se aplica

**Recomendações:**

Ressalta-se que segundo a Resolução 466/2012:

XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL - f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

PARECER APROVADO: a presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

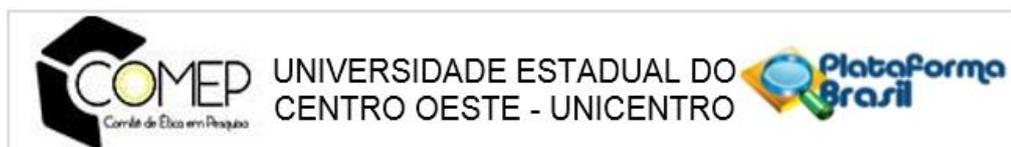
**Considerações Finais a critério do CEP:**

PROJETO APROVADO.

Em atendimento à Resolução 466/2012 CNS-MS, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e final em até trinta dias após o término da Pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê, por meio de emenda.

|                  |   |                   |               |
|------------------|---|-------------------|---------------|
| <b>Endereço:</b> | Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição) |                   |               |
| <b>Bairro:</b>   | Vila Carli  | <b>CEP:</b>       | 85.040-080    |
| <b>UF:</b>       | PR  | <b>Município:</b> | GUARAPUAVA    |
| <b>Telefone:</b> | (42)3629-8177   | <b>Fax:</b>       | (42)3629-8100 |
|                  | <b>E-mail:</b> comep_unicentro@yahoo.com.br   |                   |               |



Continuação do Parecer: 1.174.408

GUARAPUAVA, 06 de Agosto de 2015

Página 03 de

---

**Assinado por:**  
**Tatiane Baratieri**  
**( Coordenador )**

**Endereço:** Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)  
**Bairro:** Vila Carlí **CEP:** 85.040-080  
**UF:** PR **Município:** GUARAPUAVA  
**Telefone:** (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep\_unicentro@yahoo.com.br